

**POTENCIACIÓN DE LOS
MECANISMOS ENDÓGENOS DE
PROTECCIÓN MIOCÁRDICA FRENTE
AL SÍNDROME DE ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN.**

Eva M^a Calderón Sánchez

Sevilla, 2009

**POTENCIACIÓN DE LOS MECANISMOS ENDÓGENOS DE
PROTECCIÓN MIOCÁRDICA FRENTE AL SÍNDROME DE
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.**

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla

Doctorando: Eva M^a Calderón Sánchez

Laboratorio de Investigación Cardiovascular, Departamento de
Cirugía, IBIS, Hospital Virgen del Rocío

Directores: Antonio Ordóñez y Tarik Smani

Tutor: Salvador Morales Méndez

Sevilla, 2009



Prof. Dr. Antonio Ordóñez Fernández, Profesor Asociado y el Dr. Tarik Smani Hajami, Investigador contratado Ramón y Cajal, ambos adscritos al Departamento de Cirugía de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

que Eva M^a Calderón Sánchez ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Potenciación de los mecanismos endógenos de protección miocárdica frente al síndrome de isquemia-reperusión”, que presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Fdo: Antonio Ordóñez Fernández

Fdo: Tarik Smani Hajami

Agradecimientos

Quisiera empezar agradeciendo en primer lugar a mis directores de tesis: el Dr Antonio Ordóñez por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y bajo su dirección, por sus consejos, su experiencia y sus ánimos; y al Doctor Tarik Smani cuya llegada al grupo fue un gran impulso gracias a sus conocimientos, su capacidad para orientarnos y organizarnos en el laboratorio y sobre todo gracias por su paciencia y por su dedicación.

Agradecer sinceramente al Doctor Salvador Morales por tutelar esta tesis doctoral.

Agradecer entrañablemente a mis padres por darme los medios para mi desarrollo personal y por animarme y confiar en mis decisiones.

A mi marido, Jesús, por aguantarme y apoyarme durante esta etapa de mi vida, y en ocasiones por ayudarme en las madrugadas que se quedó sin dormir por acompañarme y esperarme en el laboratorio.

A mis compañeros del grupo María y Ale por su comprensión en unos momentos y por su aguante en otros.

A todos mis compis de la caracola por enseñarme cosas nuevas para mi trabajo. Os he conocido tarde en esta empresa, pero me habéis acompañado y ayudado como si os conociera de siempre. Gracias por hacer el día a día más agradable, dinámico y sobre todo por nuestras evasiones para comer algo mejor.

También quisiera agradecer a Paco Palma, a Pedro Carrasco y a las personas que trabajan en el quirófano experimental por su inestimable ayuda su simpatía y sus ánimos.

Dedicada a mis padres, mis
hermanos y a “mi Jesús”.

ABREVIATURAS:

| | |
|---------------------|---|
| AA: | Acido Araquidónico |
| ACTP | Angioplastia Coronaria Transluminal Percutánea |
| AMPc: | Adenosin Monofosfato Cíclico |
| ATPasa: | Bomba dependiente de ATP |
| Bel | Bromoenuol-lactona |
| CEC | Circulación Extracorpórea |
| CK-MM: | Creatín Kinasa de músculo |
| CK-MB: | Creatín Kinasa de músculo cardiaco |
| CK-BB: | Creatín Kinasa de cerebro |
| CK-Mito: | Creatín Kinasa Mitocondrial |
| CMO ² : | Consumo miocárdico de oxígeno |
| CF: | Creatín Fosfato |
| dP/dt | derivada 1ª de la curva de presión del ventrículo izquierdo |
| Endo 5'NT: | 5' nucleotidasa citosólica |
| Ecto 5'NT: | 5' nucleotidasa extracelular |
| EDRF: | Factor Relajante Dependiente de Endotelio |
| FAE: | Fosfatos de Alta Energía |
| FI: | Fluido Intersticial |
| HSP: | Proteínas calientes de Shock |
| IAM: | Infarto Agudo de Miocardio |
| IMP: | Inosina Monofosfato |
| iNOS: | Óxido Nítrico Sintasa inducible |
| iPLA ₂ : | Fosfolipasa A ₂ independiente de calcio |
| I-R: | Isquemia-Reperfusión |
| MAPK: | Kinasa Activada por Mitógeno |
| MnSOD: | Superóxido Dismutasa Manganeso |
| PADP | Precondicionamiento farmacológico con ADP |
| Pdipy | Precondicionamiento farmacológico con dipyridamol |
| PGI ₂ : | Prostaciclina |
| PKA: | Proteína Kinasa A |
| PKC: | Proteína Kinasa C |
| PLC: | Fosfolipasa C |
| PLD: | Fosfolipasa D |

PPCPresión de Perfusión Coronaria
PVD.....Presión Ventricular Diastólica
PVM.....Presión Ventricular Media
PVS.....Presión Ventricular Sistólica
RMN:Resonancia Magnética Nuclear
RVResistencias vasculares
SAH:s-adenosil homocisteina
8-SPT:.....8-p-sulphophenyl theophylline
TNF α :Factor de Necrosis Tumoral
Ucn:.....Urocortina
VSMC:Células de Músculo Liso Vascular

INDICE

| | |
|--|----------|
| 1.- INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1.- La Isquemia Miocárdica | 10 |
| 1.2.- Lesiones por Isquemia-Reperfusión..... | 13 |
| 1.2.1.- Isquemia..... | 14 |
| 1.2.1.1.- Caída de la reserva energética durante la isquemia..... | 15 |
| 1.2.1.2.- Alteración en el funcionamiento de bombas iónicas..... | 16 |
| 1.2.1.3.- Activación de la fosfolipasa A ₂ independiente de calcio y papel del ácido araquidónico | 16 |
| 1.2.1.4.- Producción de metabolitos secundarios..... | 17 |
| 1.2.2.- Reperfusión..... | 17 |
| 1.2.2.1.- Disminución de la reserva de fosfatos de alta energía..... | 18 |
| 1.2.2.2.- Alteración de la homeostasis del calcio | 19 |
| 1.2.2.2.1.- Sobrecarga de calcio | 20 |
| 1.2.2.2.2.- Deterioro de la sensibilidad de los miofilamentos al calcio | 21 |
| 1.2.2.2.3.- Disfunción del retículo sarcoplásmico y de la mitocondria | 22 |
| 1.2.2.3.- Disfunción endotelial | 22 |
| 1.2.2.4.- Radicales libres de Oxígeno | 23 |
| 1.2.2.5.- Otros factores responsables de la lesión por I-R..... | 26 |
| 1.3.- Precondicionamiento Isquémico | 27 |
| 1.3.1.- Concepto | 28 |
| 1.3.2.- Evidencias de la protección proporcionada por el Precondicionamiento Isquémico..... | 29 |
| 1.3.2.1.- Reducción de la lesión isquémica irreversible | 29 |
| 1.3.2.2.- Protección contra las arritmias | 30 |
| 1.3.2.3.- Disminución de la disfunción ventricular postisquémica | 30 |
| 1.3.2.4.- Efectos metabólicos | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.3.- Precondicionamiento temprano y precondicionamiento tardío.. | 33 |
| 1.4.- Perspectivas futuras en la protección miocárdica | 36 |
| 1.4.1.- Adición de Insulina en las soluciones de preservación | 37 |
| 1.4.2.- Óxido Nítrico/ L-Arginina..... | 37 |
| 1.4.3.- Precondicionamiento Farmacológico | 38 |
| 1.4.4.- Intervención sobre receptores desencadenantes | 39 |
| 1.4.5.- Intervención sobre los mediadores | 39 |
| 1.4.6.- Intervenciones sobre los efectores finales | 40 |
| 1.5.- Papel de la adenosina en el daño por isquemia-reperfusión | 41 |
| 1.5.1.- Metabolismo de la adenosina | 42 |
| 1.5.2.- Efectos beneficiosos de la Adenosina en el fenómeno de isquemia- reperfusión | 43 |
| 1.5.3.- Receptores purinérgicos y vías de señalización..... | 45 |
| 1.5.4.- Papel de la adenosina en la regulación de la expresión de genes durante el precondicionamiento tardío | 48 |
| 1.6.- Canales de potasio regulados por ATP (K_{ATP}) | 48 |
| 1.7.- Precondicionamiento isquémico en la especie humana | 51 |
| 1.8.- Otras alternativas de precondicionamiento endógeno | 54 |
| 2.- HIPÓTESIS y OBJETIVOS..... | 56 |
| 3.- MATERIALES | 59 |
| 3.1.- Modelo animal y extracción del corazón | 60 |
| 3.2.- Sistema Langendorff y accesorios | 62 |
| 3.3.- Pasos previos a los experimentos | 68 |
| 3.4.-Preparación y Montaje del corazón en el sistema Langendorff | 70 |
| 3.5.- Estabilización y medidas de parámetros basales | 73 |
| 3.6.- Solución salina utilizada | 73 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7.- Parámetros y mediciones..... | 74 |
| 3.7.1.- Datos generales..... | 75 |
| 3.7.2.- Evaluación de la mecánica cardiaca..... | 75 |
| 3.7.2.1.- Presión Pico (valor máximo de la Presión Ventricular Sistólica, PVS)..... | 75 |
| 3.7.2.2.- Presión Ventricular Media (PVM)..... | 75 |
| 3.7.2.3.- Presión Ventricular Diastólica (PVD) | 77 |
| 3.7.2.4.- Presión de Perfusión Coronaria (PPC) | 77 |
| 3.7.2.5.- Resistencias vasculares (RV) | 77 |
| 3.7.2.6.- Frecuencia Cardiaca espontánea | 78 |
| 3.7.2.7.- Presión liberada por el ventrículo izquierdo | 78 |
| 3.7.2.8.- \pm dP/dt | 78 |
| 3.8.- Fármacos | 79 |
| 4.- MÉTODOS | 81 |
| 4.1.- Fases de la experiencia y recogida de los datos | 82 |
| 4.1.1.- Protocolos de acondicionamiento | 83 |
| 4.1.2.- Fase de isquemia crónica | 88 |
| 4.1.3.- Reperusión..... | 88 |
| 4.1.4.- Finalización de la experiencia | 88 |
| 4.2.- Monitorización | 89 |
| 4.3.- Análisis de Parámetros morfológicos..... | 90 |
| 4.4.- Tinción de Hematoxilina-Eosina | 90 |
| 4.5.- Análisis Estadístico..... | 91 |
| 5.- RESULTADOS | 93 |
| 5.1.- El Precondicionamiento Isquémico (PI) mejora las funciones hemodinámicas del miocardio sometido a una situación de isquemia-reperusión | 94 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.- La adenosina exógena y la endógena proporcionan la recuperación de la función contráctil ante la lesión por isquemia-reperusión..... | 100 |
| 5.3.- Ausencia de efectos sumatorios de la protección por el PI y el preconditionamiento farmacológico con adenosina, exógena o endógena | 106 |
| 5.4.- La adenosina lleva a cabo su papel protector mediante su interacción con los receptores purinérgicos para la misma A ₁ , A ₂ {A _{2a} y A _{2b} } y A ₃ | 109 |
| 5.5.- Los canales de K _{ATP} son fundamentales en la protección proporcionada por el PI y por la adenosina | 114 |
| 5.6.- En presencia del PI, la adenosina consigue revertir el efecto inhibidor de la glibenclamida..... | 119 |
| 5.7.-Otras vías de protección miocárdica: Papel de la iPLA ₂ en la protección endógena del miocardio. | 123 |
| 5.8.- Perspectivas en el estudio de nuevas rutas endógenas de protección cardiaca ante la lesión por isquemia-reperusión | 125 |
| 6.- DISCUSIÓN | 130 |
| 6.1. Modelo de experimentación | 131 |
| 6.2. El Precondicionamiento Isquémico (PI) mejora las funciones hemodinámicas del miocardio sometido a una situación de isquemia-reperusión | 134 |
| 6.3. La adenosina exógena y la endógena proporcionan la recuperación de la función contráctil ante la lesión por isquemia-reperusión..... | 134 |

| | |
|---|-----|
| 6.3.1. Implicación del transportador de la adenosina en su efecto | 135 |
| 6.3.2. La adenosina lleva a cabo su papel protector mediante su interacción con los receptores purinérgicos para la misma A_1 , A_2 { A_{2a} y A_{2b} } y A_3 | 137 |
| 6.4. Los canales de K_{ATP} son fundamentales en la protección proporcionada por el PI y por la adenosina | 138 |
| 6.5. Otras vías de protección miocárdica: Papel de la $iPLA_2$ en la protección endógena del miocardio | 138 |
| 6.6. Protección proporcionada por péptidos producidos y liberados en situaciones de Isq-Rep: La Urocortina | 139 |
| 7.- CONCLUSIONES | 141 |
| 8.- BIBLIOGRAFÍA | 143 |

1.-INTRODUCCIÓN

En la cirugía cardiaca convencional el corazón es sometido a un periodo de isquemia controlada y a una reperfusión, lo que genera graves lesiones en el miocardio (1). Esto llevó al desarrollo de técnicas para tratar de proteger el miocardio contra este daño denominado síndrome de isquemia-reperfusión (I-R). Por ello, desde los años 50 existe una intensa labor investigadora en el terreno de la protección miocárdica, cuyo objetivo es caracterizar que mecanismos celulares y moleculares se ponen en marcha para proteger el miocardio cuando éste ha sido sometido a un proceso de I-R.

En esta labor investigadora están implicados gran cantidad de profesionales. Por un lado los cirujanos, que se ven obligados a detener el corazón para poder trabajar sobre él, de manera que se inflija el menor deterioro posible de la función cardiaca, como biólogos que llevan a cabo el trabajo de laboratorio a nivel celular y molecular, para poder desarrollar técnicas que nos permitan activar, previo a la parada, los mecanismos de protección del miocardio, de forma que se disminuyan las lesiones ocasionadas por I-R.

Todos estos trabajos, incluido el presente, llevan a un fin común que es el de proteger el miocardio contra la lesión por I-R ocasionada por la parada obligatoria del miocardio, tanto en cirugía cardiaca como en el caso de los trasplantes.

1.1.- La Isquemia miocárdica

La oclusión coronaria aguda es la principal causa identificable de infarto de miocardio y, por tanto, de mortalidad y morbilidad cardiovascular en las sociedades occidentales. Se origina cuando, por una obstrucción coronaria, hay zonas del corazón que no son bien perfundidas, de manera que el equilibrio entre el consumo de nutrientes y el aporte se rompe. Esto da lugar a lesiones celulares de distinto grado según el nivel de insuficiencia del aporte de nutrientes y oxígeno al tejido (2).

En cuanto a la falta de O₂, hay distintos términos conceptuales según la

presión parcial del mismo presente que hay que distinguir, ya que cada una de ellas implica consecuencias distintas:

Normoxia: Es la situación fisiológica basal en la que la presión parcial de oxígeno en sangre es de aproximadamente 80 a 100 mmHg con una perfusión adecuada del corazón entre 60 y 90 ml/min ⁽³⁾.

Hipoxia: Se define como la situación en la que el aporte de oxígeno es insuficiente (menor a 20 mmHg), a pesar de una adecuada perfusión ⁽³⁾.

Anoxia: Es la ausencia de aporte total de oxígeno, a pesar de una adecuada perfusión ⁽²⁾.

Isquemia: Se define como la situación en la que se produce un desbalance en el aporte de oxígeno y nutrientes y la demanda de los mismos en el corazón, ya sea por una perfusión reducida (isquemia por bajo flujo) o nula (isquemia total) ⁽³⁾, es decir, un estado en el que el aporte de oxígeno y nutrientes es insuficiente tanto para mantener el metabolismo en su estado basal como el adecuado nivel de rendimiento cardíaco.

Esta falta de oxígeno y la acumulación de metabolitos tisulares es considerada como un importante condicionante de la extensión de las anomalías contráctiles, metabólicas y morfológicas producidas durante la isquemia. Esta isquemia puede ser aguda (< 10 minutos) o crónica (> 10 minutos), dependiendo del tiempo de duración de la misma ⁽²⁻⁵⁾.

En los últimos 15 años, el conocimiento de los procesos fisiopatológicos implicados en la isquemia miocárdica aguda y crónica se ha desarrollado considerablemente. Es evidente en la actualidad la diversidad de consecuencias debidas a la I-R del corazón, no limitándose exclusivamente al dolor torácico transitorio con cambios electrocardiográficos también transitorios o al infarto agudo de miocardio, sino que también puede dar lugar a arritmias y a miocardiopatía dilatada con insuficiencia cardíaca provocada por la isquemia.

Este desarrollo de los conocimientos sobre la isquemia miocárdica ha dado

lugar a una serie de conceptos, conocidos hoy día como los Nuevos Síndromes Isquémicos. Estos son:

Isquemia Silente: Es la isquemia miocárdica asintomática, en la que se pueden objetivar mediante exploraciones clínicas las consecuencias de la isquemia en el miocardio (2).

Miocardio aturdido: Consiste en una disfunción mecánica reversible del miocardio sometido a I-R de duración proporcional al tiempo de isquemia previo. Durante un periodo de isquemia agudo (no más de 10 minutos) se produce lo que se denomina “**stunning**” o **miocardio aturdido** (4). Durante esta breve isquemia el potasio (K^+) se eleva y provoca una despolarización de la membrana plasmática que induce una liberación de catecolaminas desde los terminales nerviosos, se estimula la glicólisis anaerobia y aumenta la producción de lactato, lo que conlleva a una menor producción de adenosín trifosfato (ATP) y concentración de lactato, el cual es tóxico para las células (5). En la reperfusión la concentración de K^+ externa se recupera completamente e incluso puede bajar transitoriamente del nivel basal. Los niveles de fosfato de alta energía se mantienen por la activación de la glicólisis anaerobia (5).

Hibernación Miocárdica: Se trata de un estado de alteración persistente del miocardio y de la función ventricular izquierda debido a un flujo sanguíneo coronario insuficiente que puede regresar a la normalidad parcial o total dependiendo de si la relación aporte/demanda de oxígeno se modifica favorablemente, ya sea por un aumento del aporte o por la reducción de la demanda (2).

Precondicionamiento Isquémico (PI): Consiste en la protección adquirida por el miocardio frente a la lesión por I-R tras su exposición a un breve periodo de isquemia previo (2). Este fenómeno es el que más nos interesa y sobre el que vamos a tratar con más detenimiento más adelante.

Para tratar de comprender los procesos moleculares y celulares que tienen

lugar durante el PI, primero debemos hacer una revisión de que lesiones o daños tienen lugar durante la isquemia y, sobre todo, durante la reperfusión.

1.2.- Lesiones por Isquemia-Reperfusión

Se conoce como lesión por I-R a la disfunción o muerte de los miocitos cardiacos, inducida por la reperfusión, cuando han sido sometidos previamente a un periodo de isquemia (4). La duración de esta isquemia precedente tiene gran importancia a la hora de estimar los daños celulares y tisulares durante la reperfusión (figura 1.1).

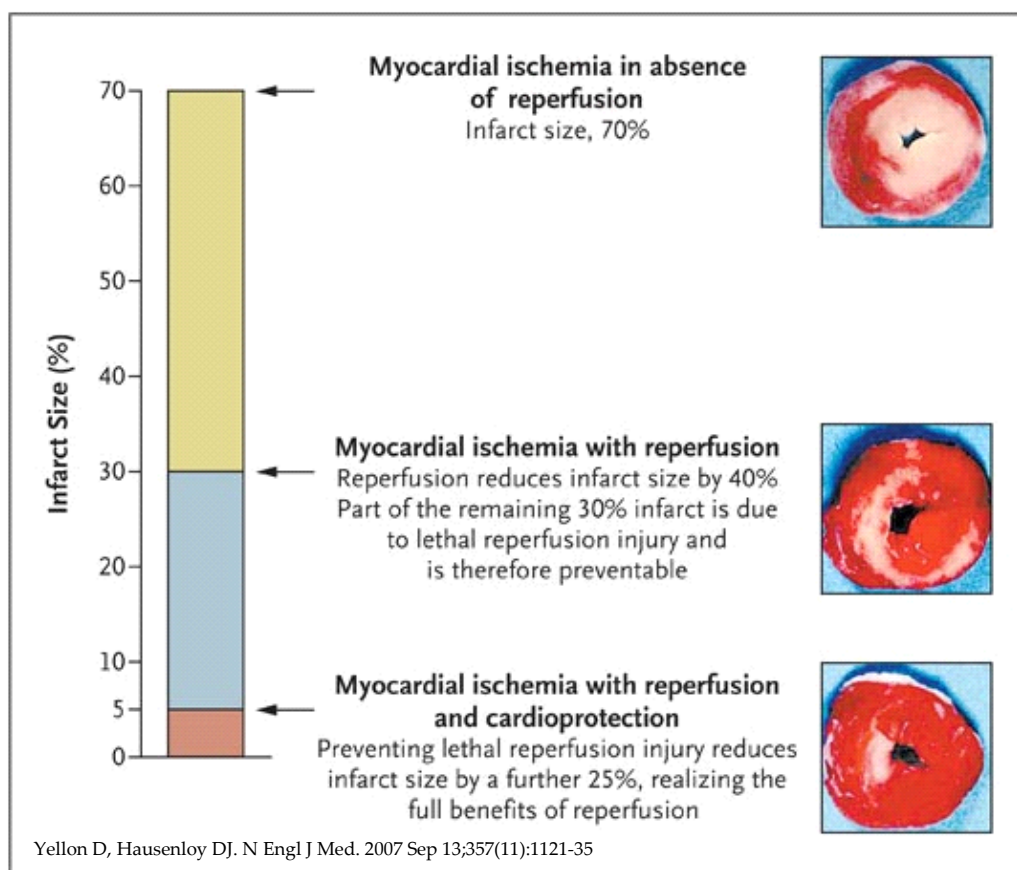
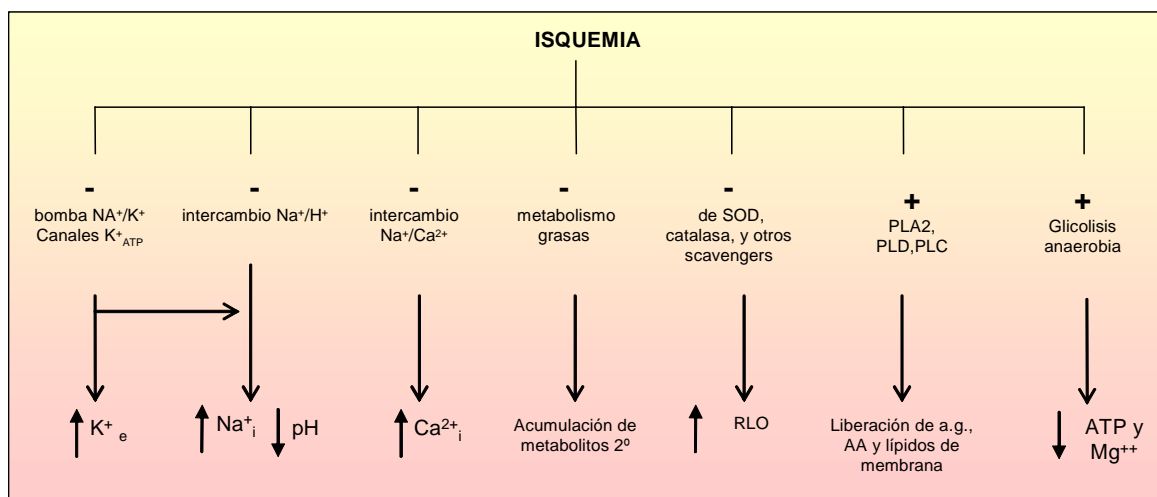


Fig 1.1.- Lesiones por I-R y su repercusión en el tamaño del infarto.

Los acontecimientos fisiopatológicos que tienen lugar durante la isquemia y cuyo daño se pone de manifiesto durante la reperfusión, se detallan en los siguientes puntos (Véase esquema en figura 1.2):



Dependiendo de la duración de la isquemia precedente, las alteraciones producidas durante la misma serán reversibles o no durante la reperfusion. En el caso de una isquemia de corta duración (menos de 10 minutos) las alteraciones ocasionadas se revierten totalmente de forma más o menos rápida

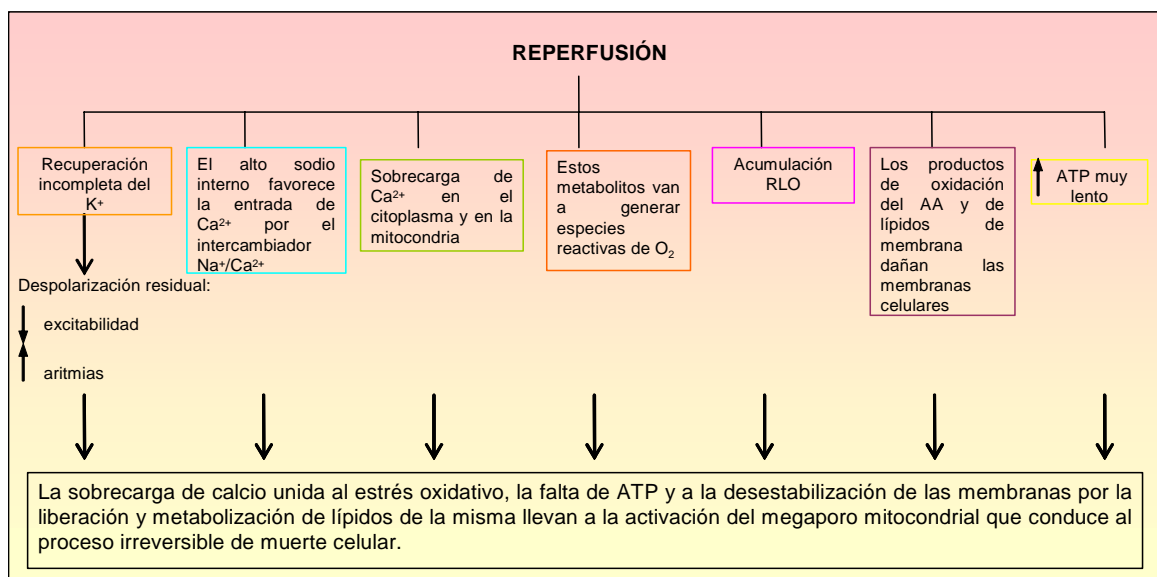


Fig 1.2.- Esquema de las alteraciones que se producen durante la isquemia y que se ponen de manifiesto durante la reperfusion. La severidad de estas alteraciones durante la reperfusion depende de la duración de la isquemia precedente.

1.2.1.- Isquemia

El miocárdio es un tejido funcionalmente aeróbico, es decir, que depende casi exclusivamente de la oxidación de sustratos para la generación de energía y a penas tiene capacidad para desarrollar una pequeña reserva de Oxígeno, de modo que en condiciones normales, la determinación de la tasa de consumo miocárdico de oxígeno proporciona una medida fiable y bastante aproximada del metabolismo

cardiaco total ⁽⁶⁾. De este metabolismo global, la mayor parte (80%) corresponde a la actividad contráctil de este órgano y el 20% restante a aquellos procesos fisiológicos no relacionados con la contracción ⁽³⁾.

1.2.1.1.- Caída de la reserva energética durante la isquemia (figura 1.2)

Mientras que la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) en condiciones aerobias es adecuada para mantener altas demandas metabólicas de un miocardio perfundido y normalmente funcionando, la tasa de ATP producido por la glucólisis anaerobia es extremadamente menor e insuficiente para soportar la viabilidad del miocardio durante la isquemia, debiendo mantener la actividad contráctil y la función de las bombas iónicas.

Prácticamente de forma inmediata a la interrupción del flujo coronario, se reduce la fosforilación oxidativa y el metabolismo aerobio da paso al insuficiente metabolismo anaerobio ⁽⁵⁾. La producción de fosfatos de alta energía (FAE) (ATP y creatín fosfato) disminuye, siendo superada ampliamente por su consumo. Los depósitos de ambos, por tanto, se deplecionan rápidamente. En ausencia de fosforilación oxidativa el adenosín difosfato (ADP) es convertido en adenosín monofosfato (AMP), que a su vez es metabolizado a adenosina y por último a inosina e hipoxantina y xantina ⁽⁷⁾.

Cuando los depósitos de ATP están al 60% todavía la lesión puede ser reversible con la reperfusión, y la microscopía electrónica tan sólo revela pérdida de glucógeno, agrupamientos de cromatina nuclear, edema intermiofibrilar e hinchazón mitocondrial ⁽³⁾. Sin embargo, cuando las reservas de ATP descienden por debajo del 20%, la célula se vuelve incapaz de regenerar dichos depósitos de ATP y de mantener los gradientes iónicos celulares por afectación de las bombas iónicas dependientes de energía de los miocitos cardiacos.

Otros metabolitos, como los protones de Hidrógeno (H^+) y el lactato, también se acumulan y progresivamente inhiben la glucólisis, disminuyendo de este modo la producción de ATP ⁽⁵⁾.

1.2.1.2.- Alteración en el funcionamiento de bombas iónicas (figura 1.2)

El deterioro de la bomba de calcio (Ca^{2+}) dependiente de ATP (ATPasa) disminuye el flujo de este ión desde el citosol, acumulándose en este espacio intracelular (5, 8), mientras que la disfunción de la ATPasa del intercambiador de Na^+/K^+ produce una disminución de éste y un aumento de aquél en el interior de la célula. Este aumento en la concentración de Na^+ , que se ve potenciado también por la bomba de intercambio de Na^+/H^+ conducida por el aumento de H^+ intracelular (9), potencia a su vez el aumento de la concentración de Ca^{2+} por el intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, que invierte su funcionamiento (5).

El aumento resultante de Ca^{2+} intracelular, produce una sobrecarga mitocondrial de este ión, lo que lleva a una disminución adicional de la síntesis de ATP. Por otro lado, la activación de las ATPasas de Ca^{2+} aumenta el consumo de ATP y activa a las fosfolipasas del sarcolema, produciendo la degradación de los fosfolípidos de las membranas celulares e iniciando el daño irreversible de estas (10).

1.2.1.3.- Activación de la fosfolipasa A₂ independiente de calcio y papel del ácido araquidónico (figura 1.2)

Durante isquemia, el metabolismo de las grasas cesa debido a la falta de oxígeno. Esto hace que se acumulen fosfoacilcarnitinas y acilcarnitinas de cadena larga. Se activan muchas lipasas como fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD), fosfolipasa A₂ (PLA₂) y diacilglicerol lipasas que liberan ácido araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de membrana. Aún no se conoce en que momento durante la isquemia se produce esta activación (5).

Estos metabolitos secundarios junto con los ácidos grasos liberados de la membrana plasmática por acción de las fosfolipasas, y en concreto el AA liberado por la PLA₂, son los precursores, durante la reperfusión, de la formación de radicales libres que van a originar daños en el comportamiento de las proteínas de membrana y desorganización de membranas tanto de orgánulos como del sarcolema (11). El AA por si solo es capaz de alterar el funcionamiento de canales iónicos de las

membranas tanto del sarcolema como de la mitocondria (5, 12).

1.2.1.4.- Producción de metabolitos secundarios (figura 1.2)

Al inhibirse el metabolismo de las grasas debido a la falta de O₂, se produce una acumulación de metabolitos secundarios (lisofosfoacilcarnitinas de cadena larga) que van a ocasionar la formación de compuestos altamente reactivos por acción de las lipooxigenasas y las ciclooxigenasas en el momento en que el O₂ aparezca con la reperfusión. Al mismo tiempo, la actividad de los “scavengers” endógenos de radicales libres del O₂ (RLO) disminuye (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa), lo que conlleva a un aumento de estas sustancias (anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH[·])). Este cúmulo de radicales libres provoca la peroxidación de los lípidos de membrana continuando así la desorganización de las membranas estructurales y organelas (5).

Sin embargo, la liberación y acción de los RLO no tiene lugar hasta la aparición del mismo, con lo que todas estas alteraciones que se ocasionan por la isquemia permanecen silentes hasta la reperfusión, por lo que este mecanismo de lesión celular parece más relacionado con la siguiente fase que con la isquemia.

1.2.2.- Reperfusión (Véase esquema en figura 1.2)

El efecto potencialmente lesivo de la reperfusión fue descrito por primera vez en la década de los 70, primero en modelos experimentales de oclusión de arterias coronarias (13, 14) y posteriormente sobre el estudio de la insuficiencia cardiaca tras cirugía cardiaca con bypass coronario (15). Sorprendentemente estos investigadores encontraron bandas de necrosis en áreas contráctiles que habían sido correctamente reperfundidas por bypass mientras que no encontraban estas mismas lesiones en aquellas zonas que no habían sido reperfundidas por la intervención.

Aunque la reperfusión es lógicamente necesaria para la supervivencia del miocardio sometido a isquemia, se sabe que la lesión isquémica se ve aumentada en

la fase de reperfusión ⁽¹⁶⁾. Se puede definir la lesión de reperfusión como la lesión tisular manifestada o desarrollada tras la reperfusión y que puede ser modificada (aumentada o disminuida) por la variación de las condiciones de dicha reperfusión ⁽¹⁷⁾.

La reversibilidad o no de las lesiones que se ponen de manifiesto durante la reperfusión están íntimamente ligadas a la duración del periodo de isquemia y cantidad de tejido isquémico ^(18, 5).

Han sido muchos los factores relacionados con estas lesiones y que se detallan a continuación:

1.2.2.1.- Disminución de la reserva de fosfatos de alta energía

La isquemia reduce drásticamente los niveles de fosfatos de alta energía por el cese de la fosforilación oxidativa mitocondrial, proceso que requiere la presencia del oxígeno, el cual está ausente en isquemia. Este déficit de energía está relacionado con la disfunción del miocardio y, en caso extremo, con la muerte celular. Tras el inicio de la reperfusión, los niveles de ATP y la reserva total de nucleótidos de adenosina están disminuidos, produciéndose una recuperación gradual hasta sus niveles basales en el transcurso de unos días ⁽¹⁹⁾.

El que la recuperación de los niveles de energía tarde, sugiere un deterioro en la capacidad de resíntesis de fosfatos de alta energía, que podría atribuirse a una depleción del sustrato principal, la adenosina, que se pierde por lavado durante la reperfusión, ya que la fosforilación oxidativa parece retornar precozmente a la normalidad, como se deduce del hecho de la rápida restitución de los niveles de fosfo creatina durante la reperfusión ⁽²⁰⁾.

La creatín kinasa (CK) juega un papel central en la distribución de la energía en el miocito. Se conocen 4 isoenzimas de la CK:

- CK-MM, predominante en el tejido muscular. Dentro de este tipo hay tres isoenzimas (MM1, MM2 y MM3).

- CK-MB, predominante en el tejido cardiaco. Hay dos isoenzimas (MB1 y MB2).
- CK-BB, predominante en el tejido cerebral.
- CK mitocondrial.

Cuando se produce isquemia cardiaca aparecen las isoenzimas CK-MM y MB en sangre, por lo que se utilizan como marcadores de isquemia cardiaca (21).

El ATP producido en la mitocondria es trasportado al citosol mediante el intermediario fosfo creatina, con la transferencia de un fosfato de alta energía desde la molécula de ATP a la creatina, reacción que es catalizada por la CK mitocondrial. En la miofibrilla, el ATP es regenerado por la transferencia de ese fosfato desde la fosfo creatina al ADP (22). La amplia distribución de la CK en el miocito proporciona múltiples sitios en los que una reducción de la actividad de la enzima podría causar una disfunción contráctil. Sin embargo, la rápida restitución de los niveles de fosfo creatina tras la reperfusión sugiere que la disfunción de la CK mitocondrial es improbable. De los resultados de algunos trabajos se deduce que es más bien la velocidad de la reacción de formación de ATP en la mitocondria la que está limitada por el déficit de sustrato (ADP) en el miocardio aturdido (23).

1.2.2.2.- Alteración de la homeostasis del calcio

El Ca^{2+} tiene un papel fundamental en la función del miocito, mediando en la contracción sistólica, la relajación diastólica, la actividad enzimática y la función mitocondrial.

La contracción mecánica del miocito es disparada por el potencial de acción a través de un proceso denominado acoplamiento excitación-contracción. El evento principal de este acoplamiento es un dramático aumento en la concentración del Ca^{2+} citosólico, a partir del retículo sarcoplásmico (RS), de donde es liberado por efecto de la despolarización de la membrana del miocito. El desencadenante específico de esta liberación parece ser la entrada de Ca^{2+} externo en la célula a través de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. La alta concentración de Ca^{2+} citosólico

provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por rianodina del RS y la salida masiva del catión al citosol. La entrada de Ca^{2+} desde el exterior es pequeña en comparación con el liberado desde el RS. Esta pequeña cantidad es muy importante, no sólo para disparar la salida de Ca^{2+} del RS, sino también para el mantenimiento de los niveles normales en la célula.

Cuando se eleva la concentración de Ca^{2+} en la célula, este interactúa con la troponina C, causando un cambio conformacional y anulando la inhibición sobre la actina de los filamentos finos. La interacción entre actina y miosina, que en último término determina el acortamiento de los sarcómeros y la contracción muscular, necesita el aporte de energía en forma de ATP.

La disminución de la concentración de Ca^{2+} en el citosol da lugar al cese de la contracción. Aproximadamente el 80% del Ca^{2+} es introducido en el RS por la acción de las bombas de Ca^{2+} ATPasa localizadas en la membrana del RS (La acción de esta bomba es regulada por el fosfolamban. Cuando esta proteína es fosforilada, la tasa de secuestro de Ca^{2+} aumenta y se favorece la relajación diastólica). El 20% restante es retirado hacia el espacio extracelular vía intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o por las bombas de Ca^{2+} ATPasa del sarcolema (24).

Teniendo en cuenta el importante papel desempeñado por el Ca^{2+} en el proceso de la contracción y relajación del miocardio, una disfunción de este potente sistema mediador podría ser uno de los elementos fundamentales en la disfunción postisquémica.

1.2.2.2.1.- Sobrecarga de calcio

En la lesión de isquemia-reperfusión, se produce una sobrecarga de Ca^{2+} en la célula, que puede tener múltiples efectos deletéreos en ésta, como desencadenar una depleción de ATP por activación de ATPasas, activación de proteasas y fosfolipasas, producción de radicales libres de oxígeno o desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (17).

La excesiva concentración de Ca^{2+} intracitosólico parece ser debida al

intercambiador iónico de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ alimentado con la acumulación de Na^+ que se produce, como se ha comentado anteriormente, durante la isquemia ⁽²⁵⁾. Este intercambiador iónico es reactivado en el momento de la reperusión por la resíntesis de ATP y el lavado de H^+ , este último es un inhibidor de este mecanismo de intercambio iónico, y puede favorecer la entrada de Ca^{2+} en la célula con la salida del Na^+ acumulado en el citoplasma ⁽²⁶⁾.

La fuerza máxima de contracción desencadenada por el Ca^{2+} está reducida, probablemente según algunos autores, por una disminución de la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} , requiriendo concentraciones más altas de Ca^{2+} para obtener una fuerza de contracción similar a la de un grupo control, es decir, se produce una aparente disminución de la eficiencia de la excitación-contracción ⁽²⁷⁾. Sin embargo, una respuesta disfuncional del miofilamento al Ca^{2+} , no establece una relación directa, por sí sola, entre la fisiopatología del Ca^{2+} y el aturdimiento.

1.2.2.2.- Deterioro de la sensibilidad de los miofilamentos al calcio

La observación de un $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular elevado tras I-R y sin embargo una función contráctil disminuida llevó a la hipótesis de una sensibilidad disminuida del aparato contráctil del Ca^{2+} , hipótesis que se vio apoyada por las observaciones de Kusoaka y col. ^(28, 29), que indicaron que el tránsito de Ca^{2+} no estaba disminuido en el miocardio aturcido, que los miofilamentos se vuelven menos sensibles a la concentración intracelular de Ca^{2+} durante la sístole es consistente, además, con los datos publicados por Hess y col. ⁽³⁰⁾ que observaron una actividad de la ATPasa miofibrilar y una sensibilidad de ésta al Ca^{2+} intracelular disminuidas. El mecanismo directo por el que se produce esta desensibilización es poco claro, pero puede ser secundario a la sobrecarga de Ca^{2+} durante la reperusión.

Un elemento implicado en la homeostasis del Ca^{2+} y cuya disfunción constituye causa potencial de aturdimiento es el RS, que es fuente y almacén del Ca^{2+} desencadenante del acoplamiento de la excitación-contracción.

1.2.2.3.- Disfunción del retículo sarcoplásmico y de la mitocondria

El RS es altamente sensible a la isquemia, de modo que con tan sólo 20 o 30 minutos de isquemia, ya aparecen evidencias histológicas de distorsión de sus membranas ⁽³¹⁾. Numerosas observaciones han mostrado una reducción de la recaptación y depresión de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} y un desacoplamiento del transporte de Ca^{2+} con un aumento de la permeabilidad al mismo en la membrana del RS ⁽⁵⁾. Esta disfunción del RS se correlaciona cronológicamente con el incremento de Ca^{2+} citosólico durante la isquemia.

En la mitocondria se produce una sobrecarga de Ca^{2+} que unida al deterioro de las membranas y a la producción de RLO por la activación de la cadena respiratoria, conducen a la apertura del megaporo que lleva a la muerte celular irreversible ⁽⁵⁾.

1.2.2.3.- Disfunción endotelial

El endotelio es el responsable del control y mantenimiento del tono vascular, produciendo una serie de agentes vasoactivos, tanto vasodilatadores como la prostaciclina (PGI_2), el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) ⁽³²⁾ como vasoconstrictores entre los que están la endotelina 1 y la angiotensina II ⁽³³⁾. Entre otras cosas, por tanto, la función endotelial es esencial para mantener el flujo sanguíneo y el aporte de O_2 ⁽⁴⁾.

Bajo condiciones normales las células endoteliales secretan un autocoide vasoactivo, el EDRF actualmente identificado como Oxido Nítrico (NO) ⁽³⁴⁾, que puede prevenir la adhesión de los neutrófilos a las células del endotelio vascular. Las células endoteliales son metabólicamente muy activas y, como los miocitos, son muy sensibles a la lesión por I-R. Tras I-R se produce una disfunción endotelial consistente en una reducción en la producción y liberación de NO ⁽³⁵⁾, que se traduce en un deterioro en la vasodilatación dependiente del mismo y, sobre todo, en una disminución de la capacidad para evitar la adherencia de los neutrófilos, lo cual desencadena la cascada de lesiones mediadas por éstos. Esta adherencia de los

neutrófilos se ve favorecida además por la activación de la fracción C5b del complemento que se produce directamente en el endotelio tras el inicio de la reperfusión. En definitiva, este descenso en la liberación de NO parece jugar un papel fundamental en la patogénesis de la lesión por I-R (17).

El papel del daño endotelial en la lesión miocárdica irreversible está bien establecido, sin embargo en el aturdimiento miocárdico el papel del endotelio parece depender de otro factor intermedio. Muchos investigadores han demostrado que con la lesión por I-R se produce una inhibición de la actividad EDRF, principal mediador vasodilatador, lo cual compromete el balance entre el aporte y demanda de sangre y O₂ al tejido. Sin embargo, no está claro si se produce una inhibición de su producción y liberación o si, por lo contrario hay una inactivación del EDRF, puesto que se sabe que éste es rápidamente inactivado por el anión superóxido (36). Además, se ha observado una prevención de la disfunción vasodilatadora cuando se administra superóxido dismutasa tras la isquemia, pero antes de la reperfusión (37).

1.2.2.4.- Radicales libres de oxígeno (figura 1.2)

Los RLO son sustancias extremadamente reactivas, que interactúan ávidamente con numerosas moléculas biológicas, incluidas moléculas estructurales como las membranas fosfolipídicas, proteínas de membrana y material nuclear. Son producidos constantemente durante la actividad celular normal y son inactivados por una gran variedad de enzimas y “limpiadores” moleculares (5).

En periodo de isquemia previo, se produce una depleción de los sistemas antioxidantes endógenos de la célula, predisponiendo al miocardio a una lesión oxidativa (4). La relación directa de estos radicales libres de oxígeno con la lesión de reperfusión, está avalada por numerosos trabajos que muestran la generación de estas especies tóxicas de oxígeno (18) y su relación con la disfunción contráctil, existiendo una correlación entre la magnitud de la generación de estos radicales y la severidad de la disfunción, o estudios en los que se obtiene una mejoría de la función contráctil con la administración de sustancias antioxidantes en la

reperfusión (superóxido dismutasa, catalasa, N-2 mercaptopropionil glicina y N-acetilcisteína) ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Se sabe que el endotelio es una de las principales fuentes de RLO, y el importante papel que juegan estos en la lesión tisular postisquémica irreversible. Existen muchas evidencias que sugieren la participación de estos metabolitos tóxicos en el aturdimiento, como la administración exógena de RLO, que produce una disfunción contráctil similar al aturdimiento ^(41, 42) o el hecho de que la infusión de antioxidantes tras la isquemia, pero antes de la reperfusión, mejoren la función contráctil ^(40, 43), e incluso la demostración directa de la producción de estos metabolitos tóxicos al comienzo de la reperfusión ⁽⁴⁴⁾.

Estos radicales libres interactúan con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos esenciales de las células, por lo que pueden lesionar las membranas celulares, canales iónicos y funciones enzimáticas, explicando no solo el aturdimiento, sino la lesión isquémica irreversible ⁽⁴⁾ (Vease figura 1.2).

Las fuentes de RLO son:

- neutrófilos activados.
- sistemas de la xantina oxidasa.
- microsomas.
- sistemas citocromo mitocondrial ⁽⁴⁵⁾.

Algunos estudios han demostrado que la I-R está acompañada de una rápida acumulación de neutrófilos. Estos neutrófilos son activados por factores quimiotácticos y citoquinas, el factor activador de plaquetas y metabolitos del AA como el Leucotrieno B4 ⁽⁴⁵⁾. Los neutrófilos activados producen $\cdot\text{O}_2$ y H_2O_2 a partir del O_2 , gracias a la NADPH Oxidasa ligada a la membrana. Tanto el $\cdot\text{O}_2$ como el H_2O_2 son citodestructivos, pero además son el sustrato para la formación del altamente tóxico $\text{OH}\cdot$ mediante la reacción de Harber-Weiss o la reacción de Fenton (Catalizada por hierro) ⁽¹⁷⁾.

Otra importante fuente de radicales libres es el sistema de la xantina oxidasa localizada fundamentalmente en el endotelio vascular. La xantina deshidrogenasa, normalmente presente en el endotelio, es convertida en xantina oxidasa por la

acumulación de calcio durante la isquemia. En el momento de la reperfusión, el O_2 reacciona con la hipoxantina acumulada por la degradación del ATP durante la isquemia, con la xantina oxidasa como catalizador, formándose xantina y ácido úrico con la producción de $\cdot O_2$. Sin embargo, la presencia de la xantina oxidasa (en cantidad y función) es especie-específica, por lo que su contribución a la lesión de reperfusión en la especie humana es aún poco clara (17). Todas las alteraciones debidas al fenómeno de I-R vienen esquematizadas en la figura 1.3.

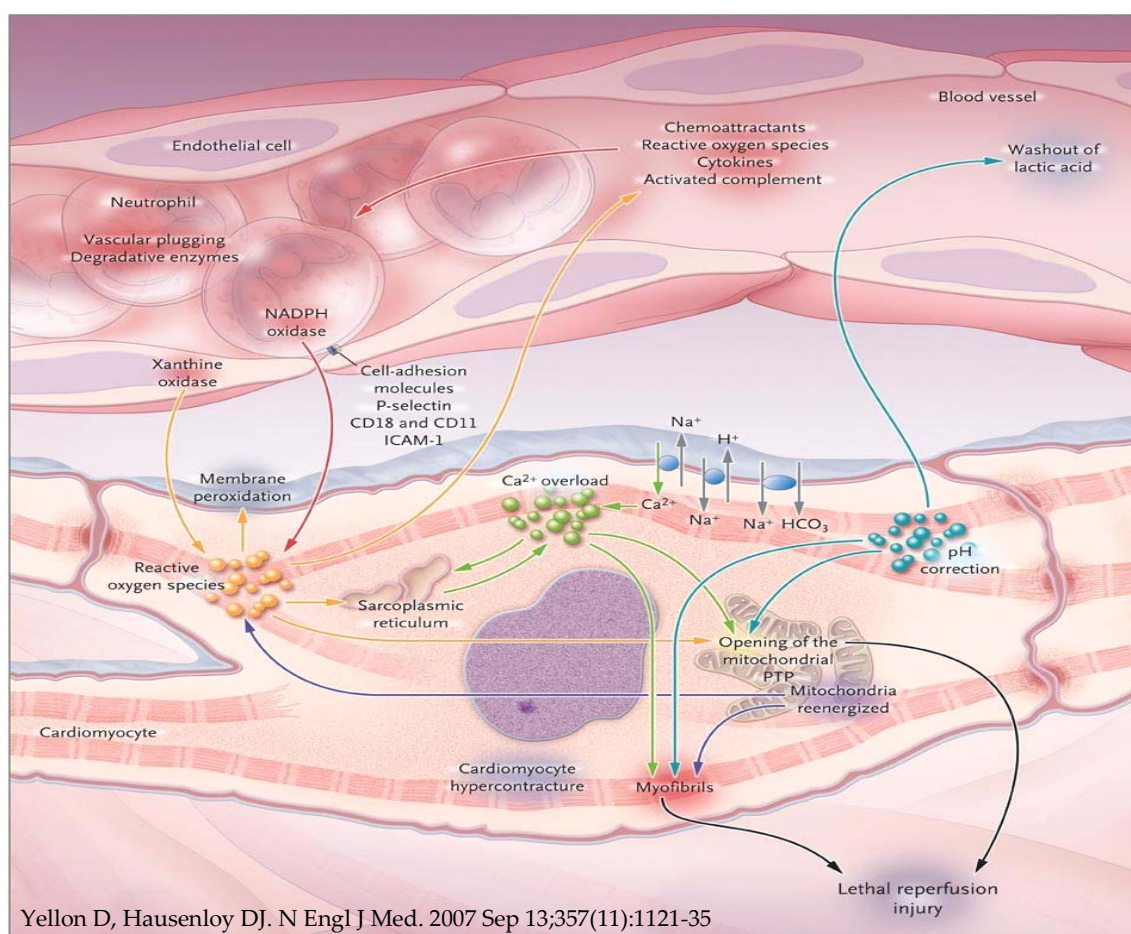


Fig 1.3.- Representación de las lesiones a nivel celular que tienen lugar durante el fenómeno de I-R.

1.2.2.5.- Otros factores responsables de la lesión por I-R

Disminución del flujo sanguíneo

El normalmente ajustado acoplamiento entre flujo sanguíneo, consumo de oxígeno y función contráctil hace del deterioro de la perfusión una atractiva hipótesis para la etiología de la disfunción contráctil. Sin embargo, muy pocos trabajos han podido demostrar un déficit de perfusión. De hecho, se ha observado a menudo una hiperemia reactiva persistente. En situaciones de isquemia prolongada regional, sí parece tener una mayor importancia el déficit de flujo sanguíneo que se ha observado en estas situaciones, sobre todo específicamente en el subendocardio, con una respuesta inmediata de hiperemia reactiva, pero un deterioro progresivo de la perfusión, coherente con el fenómeno de No-Reflujo ⁽⁴⁶⁾.

Denervación funcional simpática

La estimulación inotrópica exógena mejora la función contráctil en el miocardio aturdido, lo que sugiere que el receptor adrenérgico permanece intacto ⁽⁴⁷⁾. Importantes investigaciones han demostrado una reducción de la respuesta a la estimulación simpática endógena tras isquemia miocárdica prolongada (más de 30 min.) conservando la capacidad de respuesta si la estimulación simpática era exógena ⁽⁴⁷⁾. Sin embargo, se ha podido demostrar que en periodos de isquemia de 15 min. de duración, la neurotransmisión simpática en el miocardio aturdido permanece intacta. Así pues, no existe una relación clara entre este mecanismo y la fisiopatología del aturdimiento, y probablemente hacen falta más estudios para clarificar el papel de la estimulación simpática en este fenómeno.

Ante estos efectos fisiopatológicos ocasionados por el fenómeno de I-R descritos previamente, el corazón presenta una serie de mecanismos de defensa endógenos que se ponen en marcha durante una isquemia de duración breve seguida de una correcta reperusión y que prepara al corazón ante futuros eventos de I-R. A este mecanismo endógeno de protección se le denominó Precondicionamiento Isquémico en el que están implicadas varias vías de

señalización intracelular.

1.3.- Precondicionamiento Isquémico

En 1986 Reimer, Jennings y Murry investigando los efectos de episodios isquémicos breves en perros anestesiados y en contra de sus expectativas encontraron un efecto protector sobre los siguientes episodios de isquemia. Ellos llamaron a este fenómeno de adaptación miocárdica PI ⁽⁶⁴⁾. Sus primeros objetivos fueron investigar si existía una disminución en los niveles de fosfatos de alta energía o si existía más bien una relación con la acumulación de catabolitos durante la isquemia. Tras varios experimentos hallaron que después del primer episodio isquémico, el ATP no había disminuido, ni tampoco disminuía en los periodos isquémicos breves posteriores ⁽⁴⁸⁾. En definitiva, al parecer, el primer episodio de isquemia breve había dado lugar a un cambio en la tolerancia de los miocitos a la isquemia de manera que un segundo episodio de isquemia similar ya no disminuía el ATP.

Estos experimentos dieron lugar a la hipótesis de que este estado de adaptación pudiera persistir y proteger al miocardio contra una lesión isquémica más severa que normalmente daría lugar a la muerte celular. Esta hipótesis fue confirmada en un nuevo trabajo con perros anestesiados que eran sometidos a una oclusión de la arteria coronaria circunfleja de 40 minutos, con 4 días de reperfusión, midiendo el tamaño del infarto como porcentaje del volumen del territorio de la circunfleja bajo riesgo. A un grupo de estos perros se les aplicó un protocolo de precondicionamiento consistente en cuatro periodos de isquemia de 5 minutos de duración, separados cada uno de ellos por 5 minutos de reperfusión, previos a los 40 minutos de isquemia. Encontraron una reducción significativa del área infartada (un 25 % del que se vio en el grupo control) y que este efecto era independiente del flujo colateral ⁽⁴⁹⁾.

1.3.1.- Concepto

El Precondicionamiento isquémico (PI) puede ser definido como una adaptación rápida en respuesta a un periodo breve de isquemia y reperfusión, que da lugar a un retraso de la muerte celular durante una agresión isquémica prolongada posterior (48).

Esta definición del fenómeno se basa en los hechos demostrados hasta la fecha, es decir, una reducción en el área de necrosis. Este efecto protector sobre la lesión anatómica subsiguiente a la isquemia es el hecho más evidente de mejora del Precondicionamiento, pero son muchos mas efectos beneficiosos los que proporciona, como veremos mas adelante. (Véase figura 1.4)

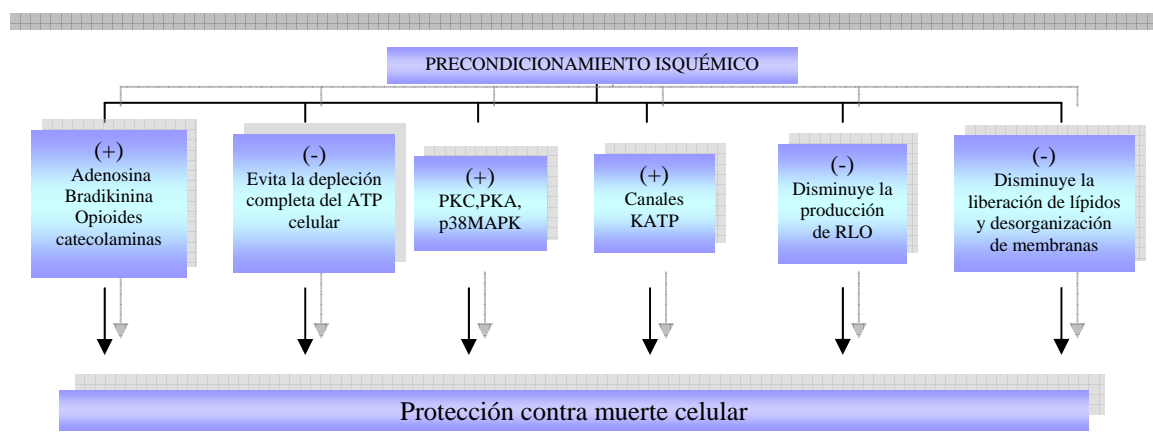


Fig 1.4.- Mecanismos de protección endógena que se activan por el Precondicionamiento Isquémico y que llevan a cabo el papel protector del mismo.

Este fenómeno se ha mostrado altamente reproducible como demuestra el hecho de haberse repetido estos mismos experimentos en distintas especies animales además del perro, como en cordero (50), conejo (51) y rata (52) con unos resultados similares.

Actualmente los trabajos que investigan este fenómeno para desentrañar los mecanismos subyacentes se han basado en la reducción del área infartada, sin embargo, no es éste el único efecto beneficioso del PI, pero sí el que se muestra de forma mas evidente y sin controversia, con lo que éste sigue siendo el principal

criterio para su definición en espera de que nuevos trabajos clarifiquen si el resto de los beneficios obtenidos son directos o si por el contrario, son un beneficio secundario a la ya mencionada protección anatómica.

Por tanto, cualquier hipótesis propuesta para explicar los efectos fisiopatológicos del PI debería incluir los siguientes hechos conocidos:

1. El proceso se activa por la propia isquemia.
2. El mecanismo de protección se activa de forma rápida y el efecto inicial es de breve duración, aunque vuelve a aparecer más tarde.
3. El fenómeno se presenta a nivel del miocito, y parece ser independiente de otros elementos celulares.
4. Se asocia a una menor acidosis intracelular y/o a un menor consumo de ATP.
5. El resultado final es un retraso en la muerte celular y posiblemente una mejoría en la función ventricular postisquémica.

1.3.2.- Evidencias de la protección proporcionada por el PI (Esquema en figura 1.4)

Hay numerosos efectos beneficiosos que hacen al PI como el mejor mecanismo de defensa para el miocardio ante el daño por isquemia-reperfusión, tanto a nivel fisiológico como a nivel metabólico. Estos son:

1.3.2.1.- Reducción de la lesión isquémica irreversible

Está bien establecido que al someter a los corazones a un ciclo o más de isquemia breve seguido de una también breve perfusión previos a la isquemia crónica, se produce una disminución de la muerte celular, como se observó al medir el tamaño del infarto de la zona en riesgo, que era menor en los corazones previamente precondicionados (49, 50).

1.3.2.2.- Protección contra las arritmias

Actualmente existen trabajos que demuestran que el Precondicionamiento disminuye las arritmias inducidas por la reperfusión que sigue a la isquemia regional en ratas, y que la evolución es la misma a la observada en el efecto de retrasar el infarto ⁽⁵³⁾.

En trabajos diseñados específicamente para analizar el efecto del PI sobre las arritmias, se demostró que este fenómeno producía una gran protección contra las arritmias ventriculares letales, no sólo un retraso en su aparición, sino una disminución absoluta de ellas y que esta protección era dosis dependiente, dando una mayor protección a un mayor número de ciclos de preconditionamiento ^(54, 55).

1.3.2.3.- Disminución de la disfunción ventricular postisquémica

Observar el efecto beneficioso del PI sobre la recuperación de la función contráctil es mas complicado que el de la reducción en el tamaño del infarto, fundamentalmente debido al hecho de que la disfunción ventricular postisquémica puede deberse tanto a la cantidad de lesión anatómica irreversible como a la disfunción miocárdica provocada por una lesión de I-R reversible (aturdimiento).

Hay muchos trabajos que apoyan el hecho de que el PI produce una mejoría de la función contráctil postisquémica en corazones aislados y perfundidos con respecto a un grupo control ^(43, 54, 56). Sin embargo, en muchos de estos experimentos se han utilizado tiempos de isquemia lo suficientemente prolongados como para provocar cierto grado de necrosis, con lo que es difícil asegurar, como mencionamos antes, si el efecto beneficioso se debe a una reducción de la necrosis o a una disminución del aturdimiento.

Para poder cumplir exactamente la definición de aturdimiento es preciso demostrar la recuperación completa tras la isquemia, con una ausencia total de lesión miocárdica irreversible, y el experimento no se puede prolongar nunca lo suficiente como para mostrar la recuperación completa tras la isquemia. Se ha intentado aislar estos dos efectos valorando por separado la función ventricular

postisquémica y el área infartada en corazones de conejo aislados y perfundidos revelando que se produce una reducción del área infartada sin que necesariamente se produzca una recuperación total de la función ventricular ⁽⁵⁷⁾.

En otros trabajos se ha utilizado un protocolo de preconditionamiento basado en tiempos más cortos de isquemia en un intento de eliminar la necrosis tisular, obteniéndose resultados contradictorios ^(58, 59). Según esto, parece más probable que la mejoría en la función miocárdica postisquémica inducida por el PI sea debida a la disminución de la necrosis del miocardio que por una verdadera reducción del aturdimiento, lo que convertiría a estos parámetros válidos, pero indirectos del efecto del PI.

1.3.2.4.- Efectos metabólicos

Fueron éstos los primeros indicios que llevaron a la caracterización del PI, por lo que fueron los efectos más detenidamente analizados en las primeras investigaciones que pretendieron dar una explicación a este fenómeno.

En 1986 Murry y colaboradores formularon la hipótesis en la que planteaban una disminución en la depleción de ATP como explicación al efecto beneficioso del PI, aunque desconocían la causa de esta menor depleción ⁽⁴⁸⁾. Posteriormente, ellos mismos confirmaron que existía una mayor cantidad de ATP en corazones preconditionados en los primeros minutos de la isquemia sostenida frente a corazones control, aunque tras treinta minutos de isquemia, el contenido final de ATP era similar en ambos grupos. Además, observaron que en el grupo preconditionado había habido una menor producción de lactato, lo que significaba una menor glicólisis anaerobia y, por consiguiente, una menor utilización del ATP, frente a la explicación de una mayor producción de estos fosfatos de alta energía ⁽⁴⁹⁾.(figura 1.4)

En algunos estudios, utilizando la resonancia magnética nuclear, han podido determinar el pH intracelular y el contenido en ATP de una forma no invasiva y repetida. En estos trabajos muestran que el preconditionamiento disminuye la

acidosis durante la isquemia y este hecho se correlaciona mejor con la recuperación funcional, en corazones aislados, que la conservación de los niveles de ATP ^(60, 61), aunque esta última afirmación es aún controvertida, ya que existen otros estudios en los que efectivamente una menor acidosis va acompañada de una mejora de la función postisquémica, pero también de una menor depleción de los niveles de ATP ⁽⁶²⁾. Este mantenimiento del pH parece deberse a una menor producción de protones más que a una mayor capacidad tampón ⁽⁶³⁾.

La diferencia en el contenido de ATP entre corazones control y preconditionados es escasa y temporal y, además, todos los corazones presentan niveles similares de ATP al final de una isquemia prolongada con lo que, según esto, es difícil entender como se relaciona este hecho con el retraso que se produce en la aparición del infarto en corazones preconditionados. Sin embargo, se sabe que los depósitos de ATP en el interior celular están compartimentados y, hasta el momento, sólo se puede cuantificar el ATP global en el tejido, por lo que la interpretación de los resultados anteriores es un tanto imprecisa ⁽⁵⁶⁾.

En cualquier caso, el concepto básico de que la conservación de la energía y la limitación de la acidosis pueden retrasar la muerte celular tiene lógica, por ello uno debe esperar que cualquier hipótesis que pretenda explicar el mecanismo intracelular del preconditionamiento debe relacionarse con estos cambios metabólicos.

La mayoría de las investigaciones que han dado lugar al todavía escaso conocimiento de PI se han basado en la aplicación de agonistas intentando mimetizar el efecto protector del preconditionamiento, o bien antagonistas intentando eliminar el efecto beneficioso, por ello la mayoría de las evidencias obtenidas son necesariamente indirectas. Esto es debido a la limitada capacidad actual de realizar mediciones sobre los sistemas de trasducción de señales intracelulares. El objetivo final de los experimentos ha sido, en la mayoría de los casos, la medición del área infartada determinada por histología o por la tinción con Tetrazolio ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾.

1.3.3.- Precondicionamiento Temprano y Precondicionamiento Tardío

El precondicionamiento presenta dos fases temporales distintas en las que se manifiestan sus efectos beneficiosos:

Fase de Precondicionamiento Temprana, en la que varias sustancias endógenas están implicadas como disparadores, incluidos agentes de unión a proteínas G_i unidas a receptor, así como adenosina, noradrenalina, bradikina y opiáceos (64-66), también como angiotensina II, acetilcolina, endotelina y radicales del oxígeno (67). (figura 1.5)

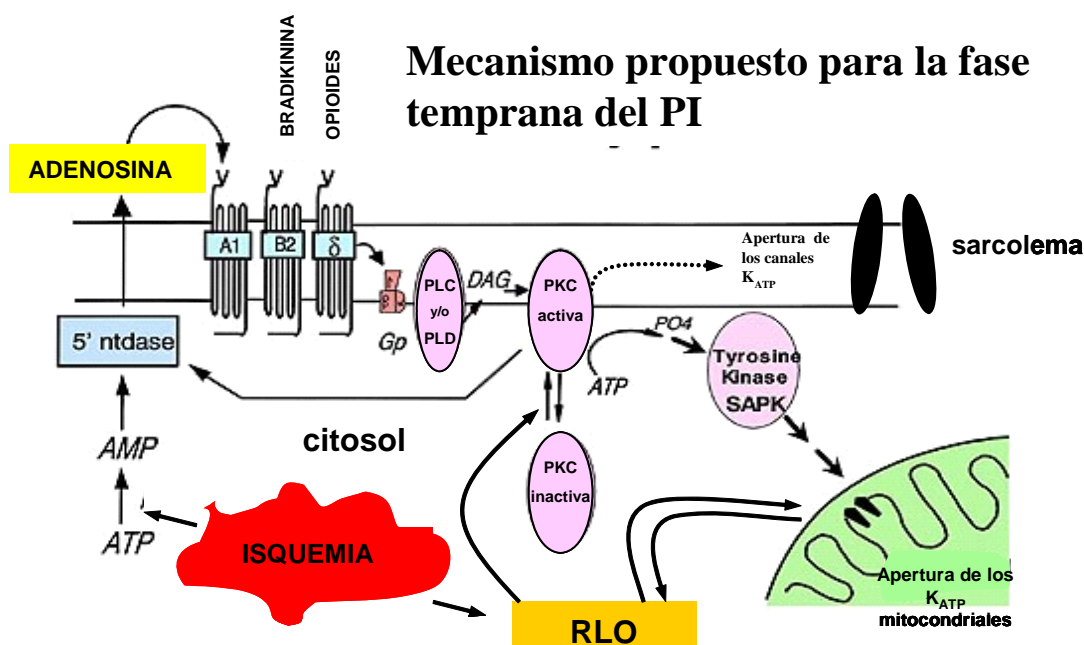


Figura 1.5.- Modificada de James M. Downey, M.D. 2000 Mecanismo de protección propuesto para la fase temprana del PI

Los mecanismos de señalización vía receptor probablemente también están implicados. La proteína kinasa C (PKC) (64-66, 68) y otras kinasas como tirosina kinasa y kinasas activadas por mitógeno (MAPK) (65), así como canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) del sarcolema o de la mitocondria (65) están actualmente siendo estudiados. (Ver figura 1.5)

Fase de Precondicionamiento Tardío, la cual ha sido demostrada en perros ⁽⁶⁹⁾, conejos ⁽⁷⁰⁾ y ratas ⁽⁷¹⁾. La hipótesis para esta segunda ventana de preconditionamiento implica la síntesis y/o modificación post-traducción de proteínas citoprotectoras. Se desarrolla unas 24 horas después de un estímulo isquémico subletal y se ha demostrado una disminución en la aparición de arritmias tras la reperfusión en algunos modelos experimentales de conejo.

La mediación intracelular que sigue a esta estimulación parece ser, según pruebas existentes, la activación de la PKC que implica la puesta en marcha de un complejo sistema de señalización intracelular dando lugar a la traslocación de proteínas al núcleo, donde se puede fosforilar y activar factores de transcripción, que interactúan con el ADN y promueven la producción de ARNm que codifican para una serie de proteínas que van a conferir la protección de esta segunda ventana del preconditionamiento. Se ha encontrado un incremento en la expresión de proteínas calientes del shock (HSP), enzimas antioxidantes endógenas y de la NO sintasa inducible ⁽⁶⁵⁾.

Las HSP son una familia de proteínas que son expresadas preferentemente o modificadas postraslacionalmente durante y después de un estrés metabólico u otro tipo de estrés, incluidas la hipertermia y la isquemia. Son denominadas habitualmente por su peso molecular (HSP70, HSP27...). Poseen funciones muy diversas en el mantenimiento de la integridad celular. Se ha demostrado que de estas proteínas la HSP70i tiene funciones citoprotectoras que proporcionan al tejido tolerancia frente al daño por I-R.

En resumen podemos definir ahora el PI como la inducción de los mecanismos intrínsecos celulares que mejoran la tolerancia de la célula miocárdica a una subsecuente lesión por I-R, ya sea mediante un breve periodo de isquemia previo, o mediante estímulos farmacológicos que nos permitan inducir, de una manera controlada, este mecanismo de protección.

De todos los trabajos experimentales realizados hasta la fecha se pueden sacar dos conclusiones:

- Se ha demostrado claramente en varias especies animales que el PI disminuye el área infartada en modelos de isquemia regional, sin embargo, su efecto beneficioso no parece tan claro cuando analizamos la incidencia de arritmias y la recuperación funcional tras la reperfusión. En cirugía cardíaca el fallo de la bomba tras bypass es debido, fundamentalmente, al aturdimiento del corazón tras la reperfusión más que a un mayor o menor grado de necrosis (72)

- El principal mecanismo protector proporcionado por el PI parece consistir en una menor depleción de las reservas de ATP y una menor acidosis, efectos que también proporcionan las soluciones cardioplégicas.

Según estos aspectos, el preconditionamiento puede ser una técnica indicada para situaciones en las que una protección miocárdica subóptima incrementa el riesgo perioperatorio de necrosis, de modo que con el preconditionamiento se consigue una limitación de la extensión del infarto con una preservación, al mismo tiempo, de la función miocárdica. De forma experimental, las únicas situaciones en las que el preconditionamiento ha mostrado conferir una protección adicional a la de la cardioplegia ha sido en situaciones de isquemia prolongada (73) y en casos de una deficiente distribución de la cardioplegia por el tejido miocárdico (74).

En la práctica clínica, las situaciones de alto riesgo que podrían beneficiarse del preconditionamiento incluyen:

- En el miocardio senil, más propenso a sufrir daño tisular por la sobrecarga de calcio, aunque permanece en controversia la capacidad de estos corazones para responder al preconditionamiento (72).

- Hipertrofia ventricular severa, donde la perfusión subendocárdica es problemática.

- En las enfermedades coronarias extensas con un pobre sistema de colaterales y un alto riesgo de una mala distribución de la solución cardioplégica.

- Situaciones donde el periodo de isquemia se puede anticipar que va

ha ser prolongado, como es el caso de la conservación de órganos para trasplante.

- En la cirugía cardiaca mínimamente invasiva sobre corazón latente, en la que las zonas distales a la reparación quirúrgica están sometidas a isquemia sin protección, de una manera muy similar a los modelos experimentales de isquemia regional donde el efecto limitante de necrosis ha sido ampliamente demostrado en múltiples trabajos.

En todos estos casos, la aplicación del preconditionamiento parece clara, de ahí la importancia de conocer e identificar los mediadores de este mecanismo adaptativo con el objeto de poder aplicar terapéuticamente sus efectos cardioprotectores.

1.4.- Perspectivas futuras en la protección miocárdica

La protección miocárdica es uno de los aspectos más preocupantes en el ámbito de la cirugía cardiaca, pues aún hoy la mayoría de las intervenciones se realizan sometiendo al corazón a un periodo de isquemia global de duración variable y, por tanto, exponiéndolo a los ya descritos daños por isquemia-reperfusión. Esto hace necesario un avance de las técnicas de preservación del miocardio, tanto para cirugía como para el trasplante cardiaco.

Hasta ahora, las técnicas utilizadas para minimizar el riesgo asociado a la cirugía con bypass cardiopulmonar han sido el uso de soluciones denominadas soluciones cardioplégicas con las que se consigue parar el corazón y además el uso de la hipotermia con lo que se ha conseguido modificar las condiciones de la isquemia y la perfusión. De hecho se ha conseguido minimizar este riesgo, sobre todo en pacientes de bajo riesgo, en los que se ha conseguido una tasa extremadamente baja de morbilidad y mortalidad. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un cambio en la tendencia de la población, incrementándose el número de pacientes de alto riesgo que son candidatos a cirugía cardiaca bajo la circulación extracorporea (CEC), con un aumento acompañante de la morbilidad.

Este aumento de la morbilidad se debe, fundamentalmente, a que las técnicas actuales de protección miocárdica se pueden considerar subóptimas para estos pacientes de alto riesgo, y es que en ausencia de complicaciones, el Síndrome de Bajo Gasto, frecuentemente observado, puede ser atribuido a una inadecuada protección miocárdica (75).

Los principales avances que se esperan, por tanto, probablemente estarán relacionados con el uso de aditivos en las soluciones cardioplégicas que permitan mejorar aún más el efecto protector, o las investigaciones para conseguir reproducir el gran mecanismo endógeno de protección miocárdica que supone el Precondicionamiento.

1.4.1.- Adición de Insulina en las soluciones de preservación

La persistente producción de lactato que sigue a la liberación del clampaje aórtico sugiere un retraso en la recuperación del metabolismo aerobio que, además, parece ser un predictor de la disfunción ventricular postoperatoria (76). La insulina puede facilitar la conversión del metabolismo anaerobio en aerobio por estímulo de la piruvato deshidrogenasa, mejorando así el resultado de la intervención, en términos de trabajo asistólico del ventrículo izquierdo (75).

1.4.2.- Óxido Nítrico/ L-Arginina

Se ha comprobado experimentalmente, en modelos animales, que el Óxido nítrico (NO) reduce la lesión tras la isquemia-reperfusión (77). También se ha comprobado, ya en el miocito ventricular humano, que la L-arginina aplicada durante la perfusión produce un aumento de la concentración extracelular de nitritos, que refleja una producción aumentada de NO proporcionando una protección que fue mayor que la proporcionada por ésta cuando fue aplicada previa a la isquemia (78). Estos hallazgos sugieren que la adición de L-arginina a las soluciones cardioplégicas podría suponer una mejora en la protección miocárdica durante la isquemia, aunque realmente son precisos más estudios para determinar

las dosis óptimas y el momento más adecuado para su administración.

1.4.3.- Precondicionamiento farmacológico

La forma más aceptada por la que el PI actúa consiste en que este PI activa una serie de receptores de membrana, entre los que se encuentran los receptores para la adenosina y los receptores α adrenérgicos, aunque se han descrito algunos otros como los de la acetilcolina, bradikinina y opioides (72). Estos receptores inician una señalización intracelular encabezada por la activación de una proteína G asociada al receptor y esta a su vez activa, mediante fosforilación, a otra serie de proteínas señalizadoras hasta la activación de la PKC, la cual es clave en la secuencia de señalización del proceso, ya que su inhibición con Cheliritrina elimina los efectos beneficiosos ejercidos por el PI. Ésta a su vez fosforila a otra serie de proteínas de la cascada de señalización hasta llegar al núcleo donde se inducirá la expresión de genes que darán lugar a la protección del miocardio en la denominada segunda ventana de PI. Entre estos productos génicos se encuentran las proteínas de estrés térmico Hsp, como vimos antes.

Por otro lado la PKC activa a otra serie de proteínas que van a llevar a cabo la protección temprana del miocardio ante la isquemia prolongada. Entre estas proteínas efectoras tempranas del PI están los canales de K_{ATP} , fundamentalmente los localizados en la membrana de la mitocondria. No está bien caracterizada como lleva a cabo su protección y cual es la vía que lo activa. Una de las proteínas que puede ser activada por la PKC y que es fundamental en la liberación de lisofosfolípidos y del ácido araquidónico tan dañinos durante la reperfusión, es la PLA_2 que se activa durante isquemia, aunque aún no se conoce en que momento ocurre su activación y que resultados tendría en la protección del miocardio actuaciones sobre la misma (5).

Este esquema de acción del precondicionamiento a nivel molecular nos puede servir de guía para clasificar los objetivos diana para el Precondicionamiento Farmacológico del miocardio.

1.4.4.- Intervenciones sobre receptores desencadenantes

Existen trabajos de gran relevancia clínica en los que se ha demostrado la utilidad de la infusión de adenosina en la consecución de una mayor protección miocárdica frente a la isquemia, tanto en cirugía cardíaca, donde se demostró la mejoría de la función ventricular tras el bypass en pacientes a los que se había administrado previamente Adenosina ⁽⁷⁹⁾, como en pacientes sometidos a ACTP en los que la infusión de Adenosina 10 minutos antes de la angioplastia vuelve el miocardio marcadamente más resistente a las sucesivas oclusiones por el balón ⁽⁸⁰⁾. Sin embargo, en la práctica quirúrgica el uso de la Adenosina tiene muchos problemas, sobre todo en la regulación a la baja de los receptores, con el consiguiente desacoplamiento de las vías de señalización intracelular y la vasodilatación sistémica con la subsiguiente hipotensión que limitan su uso actualmente, aunque queda por determinar si agonistas más selectivos sobre los receptores A1 serían eficaces en la producción del preconditionamiento sin los efectos indeseables comentados.

La inducción del preconditionamiento por activación de los receptores α_1 -adrenérgicos es otra opción, posibilitada por los agonistas de estos receptores como la fenilefrina, que está disponible para uso humano. La aplicación clínica de este enfoque está, sin embargo, aún por determinar, pues son fármacos que también tienen efectos sistémicos que podrían ser deletéreos en determinadas circunstancias.

De ahí la importancia terapéutica que tiene la caracterización de los subtipos de receptores implicados, tanto en el caso de los receptores purinérgicos como de los adrenérgicos, que posibilitaría el uso de fármacos altamente selectivos y, por lo tanto, con menos efectos derivados de su acción sobre otros receptores.

1.4.5.- Intervención sobre los mediadores

Uno de los mediadores que se activa durante el PI y que se ha demostrado que es fundamental en el mismo, es la PKC, la cual activa la producción de

adenosina durante la isquemia (81).

Hasta ahora había pocas opciones para el uso de agonistas de la PKC, ya que la mayoría de estos tenían efectos indeseables (67). Sin embargo, actualmente existe la opción del cloruro cálcico, que parece ser efectivo para preconditionar el miocardio a través de un mecanismo dependiente de PKC (82). Esta opción es atractiva porque el calcio puede ser usado fácilmente en los pacientes quirúrgicos. De hecho se utiliza habitualmente al final del bypass cardiopulmonar o poco antes, pero su potencial efecto beneficioso usado antes del bypass, aún debe ser establecido.

1.4.6.- Intervenciones sobre los efectores finales

Actualmente es uno de los frentes de trabajo, en concreto el desarrollo de nuevos fármacos que se puedan utilizar como terapia, para abrir los canales K_{ATP} de forma específica y conseguir mimetizar el papel protector que conlleva la apertura de estos canales.

Estos fármacos se han mostrado efectivos en la mayoría de especies animales, incluidas las trabéculas auriculares humanas, que pueden ser igualmente protegidas tratándolas con cromakalim (82), un activador de los canales de K^+ dependientes de ATP de los que hablaremos más adelante. Además existen otros datos que apoyan esta hipótesis, como es la imposibilidad de preconditionar mediante hipoxia las trabéculas auriculares de pacientes diabéticos en tratamiento previo con drogas hipoglucemiantes cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de estos canales. (84)

Desafortunadamente la administración clínica de estas drogas durante la cirugía cardiaca está limitada por el hecho de que tan solo una de ellas, el nicorandil está disponible para uso humano y además sólo está disponible para su administración oral. Por otra parte, debido a su pobre selectividad, el efecto antiisquémico relacionado con la apertura de los canales de K_{ATP} sólo se puede obtener a unas dosis extremadamente altas, que provocan efectos hemodinámicos inaceptables por relajación de la fibra muscular lisa. (85)

Se puede concluir que el preconditionamiento parece ser un potente mecanismo de protección para limitar la necrosis inducida por la isquemia y, por lo tanto, para preservar la función cardíaca. Como ninguno de los métodos de cardioplegia es perfecto, la mejora de la protección podría beneficiarse, al menos en casos seleccionados, del uso del PI. Esto necesita actualmente una mejor comprensión de que mecanismos endógenos y mediadores moleculares están implicados en el mismo para poder desarrollar fármacos que puedan replicar sus efectos cardioprotectores de forma muy específica, superando las dificultades metodológicas inherentes a este tipo de estudios.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio del papel protector proporcionado por la adenosina liberada durante isquemia sobre la función miocárdica y si esta protección está mediada tanto por los receptores purinérgicos como por los canales de K_{ATP} .

1.5.- Papel de la Adenosina en el daño por isquemia-reperfusión

La adenosina es una sustancia reguladora general con numerosas funciones biológicas específicas de órgano, incluyendo un importante papel en el sistema cardiovascular, nervioso y endocrino. Es un autocoide, una hormona local, pero a diferencia de las otras hormonas, no hay un tejido único responsable de su producción y, a diferencia de los neurotransmisores, no hay evidencias de su almacenamiento y liberación de neuronas u otras células.

Los estudios sobre el papel de la adenosina en el sistema cardiovascular comenzaron en 1929 con el descubrimiento por Drury y Szent-Györgyi de que al infundir corazones con extractos de varios tejidos, conteniendo adenosina, se producía bradicardia, hipotensión y vasodilatación coronaria ⁽⁸⁶⁾. Este hecho fue reconsiderado de nuevo en la “hipótesis de la adenosina” de Berne ⁽⁸⁷⁾, proponiendo una relación entre consumo de oxígeno en el músculo cardíaco, los niveles extracelulares de adenosina y el flujo coronario.

1.5.1.- Metabolismo de la Adenosina

El catabolismo de nucleótidos y la formación de purinas durante isquemia es distinta en los diferentes órganos. En el músculo esquelético, el AMP es irreversiblemente deaminado para formar inosina mono fosfato (IMP) e inosina, mientras que en el corazón y cerebro el AMP es desfosforilado para producir adenosina (figura 1.6).

Durante normoxia en el miocardio la adenosina es liberada en pequeñas cantidades a una velocidad basal constante entre hidrólisis de S-adenosil homocisteina (SAH) por la SA-homocisteinasa y defosforilación de AMP por la 5'-nucleotidasa localizada en el citosol (endo 5'NT) o unida a la membrana fuera de la célula (ecto 5'NT). La adenosina intracelular puede ser eliminada por tres rutas: refosforilación a AMP por la adenosina kinasa, deaminación a inosina por la adenosina deaminasa o liberada de la célula (figura 1.6). La función de estas tres vías es mantener adenosina libre en baja concentración. En condiciones de normoxia: la concentración en el fluido intersticial (FI) ha sido estimada por debajo de 0,5 microM, ⁽⁸⁸⁾ la concentración sanguínea fisiológica en el hombre entre 0,1 -1 microM ⁽⁸⁹⁾. La concentración citosólica ha sido calculada entre 0,04- 0,1 microM; sin embargo, el 90% está unida a proteínas intracelulares, presumiblemente a la enzima SAH-hidrolasa. De aquí que cambios considerables en la concentración de adenosina libre debe producir solo pequeñas modificaciones en la concentración tisular total.

Durante isquemia la producción de adenosina aumenta en el corazón, cerebro y riñón. El desequilibrio entre el aporte y la demanda de O₂ resulta en una rotura neta del ATP y la adenosina liberada puede incrementarse en 50 veces ⁽⁸⁹⁾. La producción de adenosina tiene lugar en los cardiomiocitos, las células endoteliales y en las de músculo liso vascular ⁽⁹⁰⁾. La desfosforilación del ATP tiene lugar por la endo 5'NT o ecto 5'NT, y durante isquemia ambas enzimas contribuyen a la producción de adenosina.

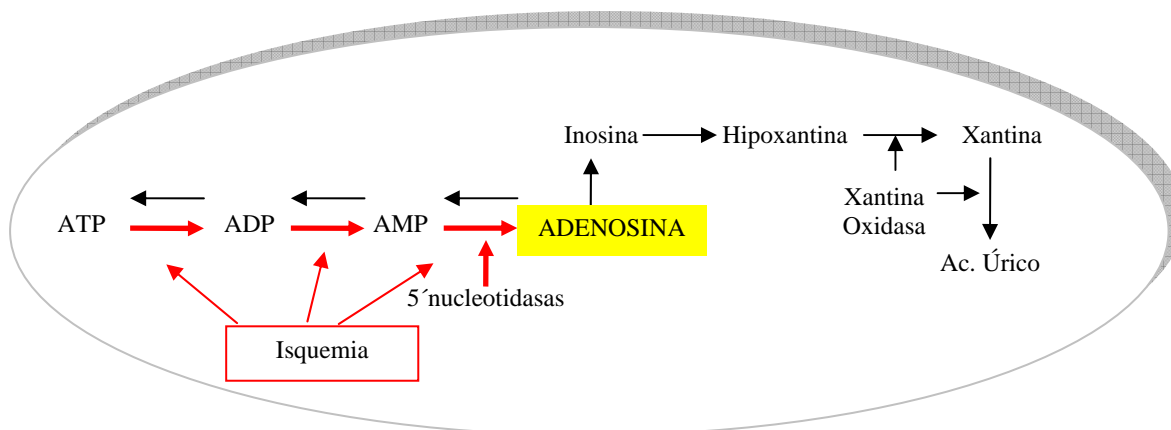


Fig1.6.- Metabolismo de nucleótidos de ATP en el miocardio. Durante isquemia se consume el ATP y se favorece la formación de Adenosina.

La adenosina cruza la membrana de los miocitos por difusión simple y se acumula en el FI. De aquí se escapa al compartimento intravascular por lavado paracelular (es lento, del 10% bajo condiciones fisiológicas) o mantenida dentro de las células endoteliales por un transportador de nucleótidos, y además metabolizada intracelularmente a inosina e hipoxantina y posiblemente también a xantina y ácido úrico ⁽⁹¹⁾. Este transportador y las enzimas intracelulares están presentes también en los eritrocitos y pericitos. La vida media de la adenosina en sangre es corta, 0,6 a 1,5 s, con lo que tiene un tiempo muy limitado para actuar localmente ⁽⁸⁸⁾.

En normoxia el endotelio tiene una contribución significativa en la liberación de adenosina, sin embargo, durante isquemia su contribución es mínima, pero puede ser funcionalmente significativa.

1.5.2.- Efectos beneficiosos de la Adenosina en el fenómeno de isquemia-reperusión

La adenosina tiene un efecto protector sobre el corazón tras episodios de I-R (Ver figura 1.5). Esto fue visto por primera vez en 1985 por Ely y colaboradores que mostraron una mayor recuperación de la función y de los niveles de ATP tras isquemia en corazones tratados con adenosina, y propusieron que la adenosina

servía como un substrato para aumentar la resíntesis de ATP durante la reperfusión ⁽⁹²⁾. Ellos también encontraron una contractilidad retrasada y niveles altos de ATP al final de la isquemia, concluyendo que la adenosina debe retrasar la rotura del ATP durante isquemia. Desde entonces el efecto cardioprotector de la adenosina ha sido muy investigado. Hoy día se sabe que el incremento en la formación de adenosina durante la isquemia tiene varios efectos potencialmente protectores:

1.- La adenosina es denominada un metabolito homeostático, acoplando el metabolismo cardiaco y el flujo durante el desequilibrio entre demanda y aporte que tiene lugar en condiciones de isquemia ⁽⁹³⁾.

2.- Tiene efectos electrofisiológicos en el tejido supraventricular, dejando reducir la velocidad del corazón ⁽⁹⁴⁾.

3.- Es un fuerte vasodilatador y está involucrada en la vasodilatación coronaria durante isquemia y en la hiperhemia postisquémica. Su efecto vasodilatador ha sido ampliamente estudiado ^(91, 95). En general, la adenosina no tiene efecto sobre el trabajo desarrollado por el ventrículo en corazones normóxicos ^(96, 94, 97). La infusión de adenosina en condiciones de normoxia provoca una reducción de la presión arterial, pero no tiene influencia directa sobre la función contráctil sistólica o diastólica ⁽⁹⁷⁾. Sin embargo, la adenosina puede antagonizar incrementando la contractilidad en respuesta a estimulación adrenérgica, y debe influir directamente en la contractilidad auricular ^(94, 96).

La interacción de la adenosina con el sistema adrenérgico es de varias formas:

1.- Inhibe la liberación de noradrenalina (inhibición presináptica).

2.- La activación de los receptores α_1 y β adrenérgicos aumenta la liberación de adenosina ⁽⁹¹⁾.

3.- La activación de los receptores α_2 potencia la vasodilatación por adenosina ⁽⁹¹⁾.

1.5.3.- Receptores purinérgicos y vías de señalización

El efecto protector de la adenosina está mediado por los receptores específicos para la misma. Hasta hoy se conocen tres tipos de receptores para la adenosina: A₁, A_{2a}, A_{2b} y A₃. Estos receptores están distribuidos de forma diferencial en los distintos tejidos (tabla1-1).

Los efectos de la adenosina mediados por receptor incluyen una fuerte vasodilatación, inhibición de la agregación de trombocitos, inhibición de la adherencia de neutrófilos y reduce la producción y los daños ocasionados por RLO. También antagoniza los efectos adrenérgicos, reduciendo la acumulación de Ca²⁺ y lipólisis. El contenido celular de ATP es preservado.

Los efectos mediados por receptores A₁, y probablemente A₃, están asociados con acciones sobre los cardiomiocitos, mientras que los efectos mediados por los receptores A₂ están relacionados con vasodilatación y acciones sobre células del compartimento vascular ⁽⁹⁸⁾.

Los receptores A₁ y A₃ están asociados a proteína G inhibitoria (G_{ai} y G_{ao}), mientras que los receptores A_{2a} y A_{2b} están asociados a proteína G estimuladora (G_{as}) ⁽⁹⁹⁾.

Los efectos mediados por el receptor A₁ son principalmente ejercidos durante isquemia. La activación está probablemente involucrada en la protección contra infarto y “stunning” y en el PI. Media efectos antiβ-adrenérgicos a través de la reducción en Adenin monofosfato cíclico (AMPc), antagoniza el incremento en la velocidad del corazón, inotropía y relajación, acumulación de Ca²⁺ intracelular, lipólisis y glucogenolisis. La activación del receptor A₁ también reduce la fosforilación de proteínas inducida por la protein kinasa A (PKA) así como canales de Ca²⁺ tipo L y otros canales y la fosforilación inducida por isoproterenol de la fosfolipasa B (PLB), fosfolemman, proteína C-reactiva y Troponina I ⁽⁹⁹⁾.

Tabla 1.-1: Presencia de receptores de Adenosina en diferentes tipos celulares dentro del sistema cardiovascular y sus efectos principales ⁽⁹⁸⁾

| Subtipo de receptor | Tipo celular | Efectos beneficiosos | Efectos secundarios |
|---------------------|--|--|---|
| A1 | Miocytes Neutrófilos Células endoteliales Celulas de Músculo Liso Vascular (VSMC) | -Efecto protector directo sobre miocytes -Antiadrenérgico -Metabólico -Electrofisiológico | -Bradiarritmias -Activación de neutrófilos -Vasoconstricción renal |
| A2a | Células endoteliales VSMC Trombocitos, neutrófilos, mastocitos Monocitos, macrófagos, eosinófilos Miocytes | -Vasodilatación -Antiagregación plaquetaria -Anti-inflamatoria -Liberación de NO -PI endotelial y proliferación del mismo -Inhibe la liberación de TNF α | Hipotensión |
| A2b | Algunos lechos vasculares (aorta) Mastocitos | -Vasodilatación -Inhibe crecimiento de VSMC | -Hipotensión -Proinflamatorio (?) |
| A3 | Miocytes Mastocitos Otras células inflamatorias | -Efecto protector directo sobre miocytes (?) -inhibe la liberación de TNF α (Macrófagos) -Apoptosis (?) | -Hipotensión o Vasoconstricción -Proinflamatorio (?) (perjudicial en cerebro ?) |

Otros efectos distintos de los antiadrenérgicos ejercidos por el receptor A_1 son la activación de los canales K_{ATP} (100, 101), alteración en el metabolismo de la glucosa (102), interacción con la PKC (65, 68) y facilita la quimiotaxis de los neutrófilos activados (96). Deben, también estar involucrados en la preservación funcional de los receptores sensibles a rianodina del RS durante la reperfusión (103) y en la elevada proliferación de las células endoteliales (104).

En resumen, la activación de los receptores A_1 proporciona una disminución en los requerimientos de O_2 , incremento del aporte de energía y disminución en la sobrecarga de Ca^{2+} .

La activación de los receptores A_{2a} y A_{2b} está involucrada principalmente en los efectos vasculares de la adenosina que son la vasodilatación y el efecto antitaponamiento, importantes sobre todo durante la reperfusión (105). La activación del receptor A_{2a} causa relajación vascular dependiente de endotelio. También inhibe la adhesión de neutrófilos y la producción de radicales libres (96), la agregación plaquetaria (91) y aumenta el aporte sanguíneo.

Los efectos mediados por la activación de receptores A_3 no son tan conocidos debido a la falta de inhibidores específicos. En su estructura molecular presenta variaciones de aminoácidos (aa) de una especie a otra y su distribución tisular también depende de la especie (51). Su activación está involucrada en la protección miocárdica y debe ocurrir durante la isquemia. Debe estar implicado en la inducción de la apoptosis de los cardiomiocitos. (106)

Actualmente se están realizando estudios de proteómica para tratar de identificar y determinar la estructura de estos receptores y su homología entre las distintas especies animales y el hombre, para de esta forma conseguir inhibidores más específicos para cada uno de ellos y así poder determinar la función específica que tienen. (107)

1.5.4.- Papel de la Adenosina en la regulación de la expresión de genes durante el preconditionamiento tardío

Hay estudios de distintos laboratorios que confirman la implicación de la adenosina en la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la protección del miocardio. Usando técnicas de Microarrays cDNA para detectar niveles de ARNm, se ha demostrado que en ratones sometidos a 60min. de isquemia, la adenosina producida de forma endógena por el miocardio (utilizando el inhibidor inespecífico de receptores para adenosina el 8-p-sulfofenil-teofilina (SPT)) regula la expresión de la mitad de los genes que son modulados por la isquemia ⁽¹⁰⁸⁾. Esta protección se pone de manifiesto durante el preconditionamiento tardío.

Entre las proteínas cuya expresión se ve influenciada por activación del receptor A₁, están la SuperÓxido Dismutasa Manganeseo (MnSOD), la NO sintasa inducible (iNOS) y proteínas de shock térmico (HSP70i).

1.6.- Canales de potasio regulados por ATP (K_{ATP})

En 1983, Noma ⁽¹⁰⁹⁾ describió un nuevo tipo de canales de K⁺ en el sarcolema que eran sensibles al ATP y a los que denominó canales K_{ATP}. Estos canales están presentes en los miocitos ventriculares. Son numerosos en la membrana celular y mitocondrial y normalmente están cerrados, pero se abren rápidamente en respuesta a una disminución del estado energético de la célula, lo cual ocurre durante la isquemia y la hipoxia ⁽⁵⁾.

A partir del estudio de estos canales apareció la otra hipótesis principal para el mecanismo intracelular del preconditionamiento. Se sabe que la isquemia causa un acortamiento del potencial de acción como resultado de una salida de potasio. Este acortamiento del potencial de acción reduciría la entrada de calcio, el consumo de energía y, por último, los daños tisulares ocasionados por la isquemia ⁽¹¹⁰⁾. Antagonistas del receptor para sulfonylurea podían disminuir la protección

proporcionada por el preconditionamiento, sugiriendo que los canales K_{ATP} deben ser efectores de la protección. Esta idea fue reforzada al utilizar abridores del canal como cromakalin o pinacidil, que podían mimetizar el PI ⁽¹¹¹⁾.

Actualmente esta hipótesis ha sido modificada por dos observaciones: 1- Que la protección proporcionada tanto por el preconditionamiento como por los abridores del canal K_{ATP} , no necesariamente requieren un acortamiento en el potencial de acción, y 2- Que esta protección puede ser demostrada en cardiomiocitos no estimulados, con lo que deben ser los canales K_{ATP} de la mitocondria, más que los del sarcolema, los que deben activarse primeramente por una depleción del reservorio de ATP ⁽¹¹²⁾.

Utilizando bloqueantes selectivos para cada uno de ellos se ha tratado de dilucidar el papel de cada uno de ellos en la protección proporcionada por el PI, de manera que la mayoría de las evidencias apuntan al canal de K_{ATP} de la mitocondria (Figuras 1.5) como el disparador y último efector de la cardioprotección, aunque no está claro si su acción es llevada a cabo en el preconditionamiento temprano, tardío o en ambos. ^(113, 114).

Estos canales no sólo se abren por un estímulo isquémico, sino que hay otros estímulos que provocan su apertura (Tabla 1-2).

Autores como Ovize y col. mostraron que el aumento de tensión sobre la pared vascular con una sobrecarga de volumen previo a la oclusión coronaria pareció ser un método eficaz para limitar el área infartada, perdiéndose esta protección cuando se añadía un inhibidor de la apertura de los canales K_{ATP} ⁽¹¹⁵⁾. El grupo de Gysembergh demostró que los canales de K_{ATP} están relacionados en la cascada de cardioprotección por tensión y que esta protección era abolida con el pretratamiento con Glibenclamida, un inhibidor inespecífico de los canales K_{ATP} ⁽¹¹⁶⁾.

| Tabla 1-2: Estímulos capaces de desencadenar la apertura de canales K_{ATP}. | |
|--|--|
| Precondicionamiento isquémico. | |
| Estímulos no isquémicos: | Tensión de estiramiento (stretch) Estres por calor (Heat stress) Isquemia en órganos remotos |
| Estímulos farmacológicos: | Pinacidil Dimakalim Cromakalim |

Otro estímulo capaz de proteger el miocardio contra la isquemia sostenida es el stress por calor (Heat stress), de modo que un aumento de la temperatura corporal a 42°C produce una reducción del área infartada tras una isquemia sostenida de 30 minutos de duración. Recientes estudios han implicado la activación del canal K_{ATP} en la mediación de esta protección ⁽¹¹⁷⁾. En otro trabajo proponen que la mejoría proporcionada por la Adenosina ante el daño por isquemia-reperfusión está mediada por los canales de K_{ATP} presentes tanto en el sarcolema como en las mitocondrias. Según este trabajo, la disminución del tamaño del área infartada se debería a la activación de los canales K_{ATP} de la mitocondria, mientras que la recuperación funcional del miocardio estaría modulada por los canales K_{ATP} presentes en el sarcolema ⁽¹¹⁸⁾. (Ver figura 1.5)

Existen también numerosas evidencias sobre el hecho de que el PI proporciona no solo protección intraórgano, sino también interórgano, a partir de estímulos isquémicos en órganos remotos como el riñón, intestinos y músculo esquelético, cuya isquemia puede proporcionar protección frente a una isquemia miocárdica prolongada, y que esta protección está mediada de una forma similar a la del preconditionamiento miocárdico a través de los canales K_{ATP} , aunque la vía de transducción de señales puede ser como la del PI cardiaco: la Adenosina (isquemia renal) u otras vías (vía Neurogénica) cuando la isquemia tenga otros orígenes. ⁽¹¹⁹⁾. Sin embargo, sigue habiendo muchas preguntas sin responder. No se

sabe si el umbral para la apertura de estos canales, la proporción abierta o las consecuencias de las mismas están alterados durante la isquemia y se desconoce el curso temporal y el estado del canal durante la isquemia continuada y el preconditionamiento.

La falta de correlación entre el acortamiento de la duración del potencial de acción y la cardioprotección ha sembrado la duda sobre la acción de los fármacos denominados abridores de los canales K_{ATP} . No se sabe realmente cual es el lugar de acción exacto de estos fármacos, que pueden estar actuando sobre los canales de la mitocondria, sobre los del sarcolema o sobre ambos ⁽¹¹³⁾. Además, en contraste con la naturaleza aparentemente universal del PI, la evidencia de la importancia de estos canales en distintos modelos de animales es conflictiva ⁽¹²⁰⁾.

1.7.- Precondicionamiento isquémico en la especie humana

La existencia del PI como método de protección endógeno ante la I-R ha sido demostrado en muchas especies animales, e incluso en el hombre, pero la mayoría de los hallazgos encontrados hasta hoy en el conocimiento de las vías intracelulares responsables del mismo no pueden extrapolarse directamente al hombre, ya que los mecanismos pueden ser diferentes. En la mayoría de los modelos experimentales utilizados, se ha tomado como medida de referencia de PI el tamaño del área de infarto, medida que, por razones obvias y, sobre todo de carácter ético, tiene que ser descartada en el caso del hombre. Se pueden llevar a cabo estudios de recuperación funcional, de cambios electrocardiográficos isquémicos o evidencias bioquímicas de daño celular. Además existe otro inconveniente y es que uno de los más importantes determinantes de la severidad de la isquemia miocárdica en el hombre es la presencia o no de flujo sanguíneo colateral, lo cual hace muy difícil valorar el resultado en modelos de isquemia regional.

A pesar de todos estos inconvenientes se han conseguido llevar a cabo estudios, éticamente aceptables, en la especie humana, tanto "in vitro" como "in

vivo" (121).

Estudios "in vitro"

Utilizando preparados de células miocárdicas humanas se ha demostrado la existencia del PI en las mismas. Por otro lado se observó que trabéculas atriales aisladas inmersas en un baño nutriente pueden ser preconditionadas contra una situación de hipoxia y depleción de sustratos prolongada mediante una situación similar de corta duración previa e incluso por la activación de los receptores de adenosina A₁ (122).

También existen evidencias de protección contra la disfunción contráctil causada por la hipoxia con depleción de sustratos, inducida por la activación de la PKC y que desaparece cuando se bloquean los canales K_{ATP} (83).

Otros trabajos similares, sobre miocitos ventriculares, demostraron una mayor viabilidad de aquellos que habían sido preconditionados, observándose además una menor producción de H⁺ y menor liberación de lactato (123). En otros trabajos realizados por el mismo grupo, al utilizar el sobrenadante de los baños de miocitos sometidos a isquemia, en los que se demostró la existencia de cantidades significativas de adenosina, demostraron que la administración de éste disminuyó los daños de las células sometidas a isquemia prolongada y reperfusión y que la adición de un bloqueante del receptor de adenosina (SPT) impidió el efecto protector (124).

Por último, el preconditionamiento farmacológico con fenilefrina o adenosina demostró mejorar la recuperación de la función contráctil y mantener los niveles tisulares de la isoenzima MB de la creatin kinasa concluyéndose que, al menos transitoriamente, tanto el receptor α_1 adrenérgico como los receptores para la adenosina estimularon el preconditionamiento en las trabéculas del miocardio ventricular humano. (125)

Modelos de acondicionamiento cardíaco “in vivo”

Existen varias situaciones clínicas en las que se puede demostrar la existencia del acondicionamiento que incluyen la cirugía cardíaca, la ACTP, la isquemia inducida por el ejercicio y la angina preinfarto.

Yellon y su grupo ⁽¹²⁶⁾ demostraron que el miocardio podía ser acondicionado tras analizar biopsias miocárdicas humanas para examinar los niveles de ATP tras aplicar un protocolo de PI, comprobando un ritmo de disminución de ATP mucho más lento durante la isquemia prolongada comparado con el grupo control durante la revascularización coronaria ⁽¹²⁶⁾. Este mismo grupo demostró, más tarde, una disminución de la liberación de Troponina T en pacientes sometidos a bypass aorto-coronario cuando se les aplicaba previamente el protocolo de PI ⁽¹²⁷⁾.

Los últimos trabajos realizados durante la ACTP demuestran que la adaptación a la isquemia observada en estos pacientes aplicando un protocolo de PI queda completamente abolida por el pretratamiento con Glibenclamida, lo que sugiere que, en este modelo, el PI está mediado por los canales K_{ATP} ⁽¹²⁸⁾. También se ha demostrado la implicación de los receptores de Adenosina en este modelo. De hecho, los antagonistas de la Adenosina han eliminado la adaptación a la isquemia durante los inflados repetidos del balón, mientras que la Adenosina ha sido capaz de desencadenar este efecto protector ⁽⁷⁹⁾. Recientemente se ha demostrado también que la adaptación a la isquemia durante la ACTP es abolida por Fentolamina en ausencia de reclutamiento, sugiriendo de este modo la mediación también de los receptores α -adrenérgicos ⁽¹²⁹⁾.

En el caso de la isquemia inducida por el ejercicio se refiere usualmente a una mejoría en la capacidad y desarrollo de un ejercicio en pacientes con enfermedad coronaria que han sido sometidos a un primer test. Esto sugiere un menor consumo de Oxígeno miocárdico y un incremento en la eficiencia metabólica durante el segundo test de ejercicio, que recuerda al PI de otros modelos. Sin embargo, a pesar de algunos trabajos que han utilizado este modelo para caracterizar el PI, los

resultados han sido controvertidos sobre cual ha sido el mecanismo intermediario de esta supuesta tolerancia ⁽¹³⁰⁾.

Recientes estudios han mostrado que pacientes con IAM precedido por episodios de angina tienen infartos de menor tamaño y un mejor resultado de la terapia trombolítica que los pacientes sin angina preinfarto ⁽⁶⁷⁾. Este es el modelo de PI más difícil de analizar porque siempre ocurre de forma no controlada, por lo que son necesarias más pruebas para estudiar este fenómeno.

En definitiva, parece claramente demostrada la existencia del fenómeno del PI como mecanismo de protección endógena en el corazón humano, lo que abre una puerta a la posible aplicación de forma controlada mediante modelos farmacológicos en aquellas situaciones en las que nos podamos beneficiar de una protección miocárdica frente a la isquemia, muy especialmente en el ámbito de la cirugía cardiaca (fig 1.7).

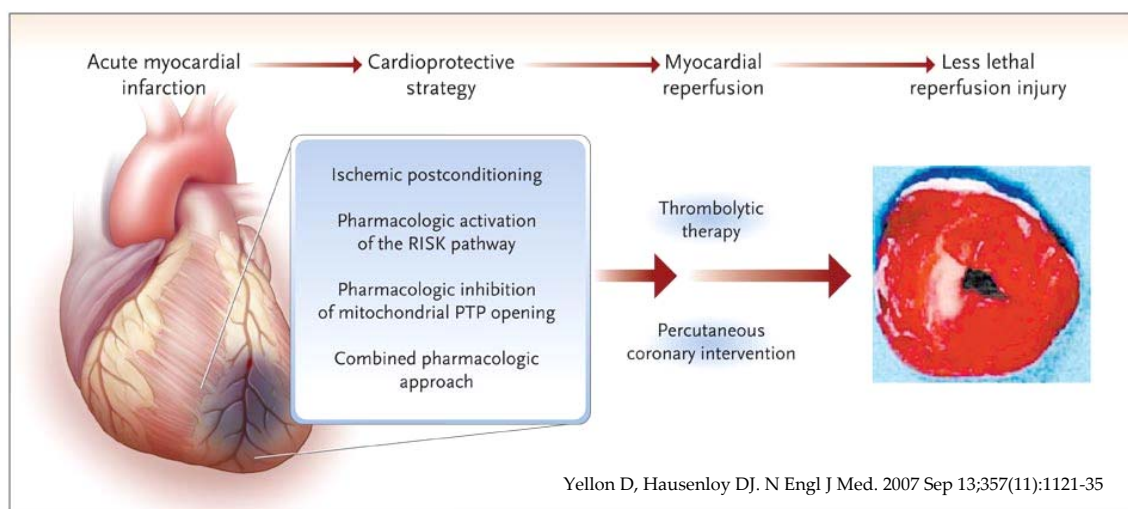


Figure 1.7.- Nuevas estrategias cardioprotectoras para reducir el daño letal por reperusión.

1.8.- Otras alternativas de preconditionamiento endógeno

Actualmente hay un gran interés por el estudio de los fenómenos endógenos que tienen lugar en el organismo ante situaciones de estrés y que llevan a la adaptación o protección ante dichas situaciones. Además de la adenosina y otros compuestos químicos, se conocen péptidos que también son expresados y liberados

por distintos tipos celulares y que son capaces de proteger al corazón ante I-R. Uno de éstos es la Urocortina (Ucn) que es un neuropéptido de unos 40 aminoácidos que pertenece a la familia del factor liberador de corticotropinas ⁽¹³¹⁻¹³³⁾. La Ucn es expresada en distintas especies de mamíferos incluido el humano ⁽¹³⁴⁾. Fue caracterizada por primera vez en cerebro de rata ⁽¹³¹⁾, pero actualmente se sabe que se expresa y se libera por otros órganos como la placenta, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular.

Entre los efectos cardiovasculares de la Ucn se incluyen un incremento dosis-dependiente de la frecuencia cardiaca, gasto cardiaco y flujo coronario y una disminución de las resistencias vasculares periférica ⁽¹³⁵⁾. Por otro lado, en condiciones de I-R se ha comprobado que los cardiomiocitos expresan y liberan Ucn, la cual tiene una función de protección contra apoptosis y necrosis ⁽¹³⁶⁾.

Se está tratando de caracterizar los efectos de protección de la Ucn sobre el miocardio y las vías por las que se consiguen dichos efectos que están mediados a partir del receptor CRFR2, el único tipo de receptor presente en el corazón ⁽¹³⁷⁾. Hasta ahora se sabe que la Ucn activa la vía de la PI3-Kinasa/Akt y las p42/p44 MAPKs ^(138, 139). Al igual que otros mecanismos de protección la Ucn actúa sobre la mitocondria incrementando la expresión de la subunidad Kir 6.1 del canal K_{ATP} ⁽¹⁴⁰⁾. También causa la translocación de la PKC ϵ a la membrana de la mitocondria ⁽¹⁴¹⁾ y reduce los niveles de iPLA₂ y, como consecuencia, de sus metabolitos tóxicos como la lisofosfatidil-colina (LPC) ⁽¹⁴²⁾.

La mayoría de los trabajos tratan de caracterizar el efecto protector de la Ucn en la denominada segunda ventana de preconditionamiento o preconditionamiento tardío en el que tiene lugar la síntesis de novo de proteínas que van a proteger al miocardio ante I-R. Menos se conoce del efecto protector agudo de la Ucn así como del efecto contráctil y tampoco se conocen las vías por las que tiene lugar, lo cual es de gran interés para la caracterización de las funciones fisiológicas de dicho péptido.

2.- HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Conocida la fisiopatología de la isquemia miocárdica ocasionada por la isquemia y consiguiente reperfusión, debemos tener en cuenta que estos fundamentos fisiopatológicos tienen una expresión en la clínica diaria, incluso existen situaciones en las que se han de provocar inevitablemente estos fenómenos, como ocurre en la cirugía cardiaca, ya sea de revascularización coronaria como en cualquier otro tipo de cirugía cardiaca en la que sea preciso que el corazón esté parado, incluyendo el trasplante cardiaco.

Ante estas lesiones se sabe que el preconditionamiento isquémico es el método que proporciona mayor protección al corazón ante eventos de isquemia prolongada. Uno de los mecanismos de protección que se ponen en marcha cuando el corazón es sometido a isquemia, y que se engloba dentro del beneficio proporcionado por el PI, es la producción de adenosina procedente del consumo del ATP por las células del corazón. Esta adenosina pasa al espacio intersticial cardiaco donde puede activar a receptores purinérgicos para la misma, que mediante señalización intracelular acaban activando a otras dianas moleculares, las cuales son fundamentales para la protección del miocardio.

En el PI, la adenosina endógena producida por el propio corazón durante la isquemia, se lava durante la reperfusión de manera que no puede llevar a cabo su papel protector. Si consiguiéramos que esta adenosina endógena no se lave durante la reperfusión, podría potenciar los efectos beneficiosos del PI incluso en mayor proporción que la adenosina administrada de forma exógena, ya que ésta puede ser retenida en el territorio vascular, tanto por las células del músculo liso como por las del endotelio y del torrente sanguíneo, no llegando a las células del miocardio.

La adenosina lleva a cabo su papel protector del miocardio a través de las rutas de señales activadas por su unión a sus receptores. La regulación de los receptores de adenosina aportaría más información sobre el importante papel protector de la adenosina endógena y/o exógena y su implicación en el PI.

Según nuestra hipótesis los principales objetivos de este trabajo de investigación experimental son:

- 1.- Caracterizar un modelo experimental de I-R, en un corazón de conejo aislado y perfundido en sistema Langendorff crónica, y determinar el deterioro de la función miocárdica.
- 2.- Determinar un modelo experimental de cardioprotección mediante PI.
- 3.- Examinar la implicación de la adenosina exógena como posible fármaco protector liberado ante el síndrome de I-R.
- 4.- Estudiar el papel de la adenosina endógena secretada durante el PI sobre la protección del miocardio durante I-R.
- 5.- Caracterizar la implicación de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), efector final de la adenosina, en la cardioprotección.
- 6.- Estudiar otras vías de señalización involucrada en la protección endógena durante I-R.

3.- MATERIALES

Todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Investigación cardiovascular adscrito al Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla (IBIS) en los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla. Dentro de las instalaciones disponemos de quirófanos completamente equipados, donde se realiza la preparación del animal de experimentación, inducción de anestesia y procedimiento quirúrgico, y de laboratorio de cirugía cardiovascular donde se llevaron a cabo dichos experimentos.

Los experimentos fueron programados previamente, de forma ordenada, de manera que se actúe siempre de la misma manera para evitar errores, lo cual invalidaría una experiencia completa.

A continuación se detallan los pasos que se siguieron para la preparación del experimento, y que se van a seguir en todas las experiencias:

3.1.- Modelo animal y extracción del corazón

El modelo experimental se ha realizado en conejos de la raza “White New Zeland”, suministrados desde Barcelona con la supervisión de la Junta de Andalucía, con certificado de haber sido criados y mantenidos según las normas y regulaciones del Laboratory Animal Breeders Association Accreditation Scheme (L.A.B.A.A.S.) para uso de animales de experimentación.

Todos los animales han sido tratados según las normas establecidas en la Convención Europea para la protección de animales empleados con fines experimentales recogidas en el Real Decreto 223/1988 BOE 18 y la Orden del 13 de Octubre de 1989.

Se han utilizado un total de 157 conejos para el estudio con un peso de 2 a 3 Kilogramos en el momento de ser sacrificados ($2256,45 \pm 520,16$). Fueron sometidos a cardiectomía para el posterior estudio de la función cardiaca. De las 157 experiencias se han aceptado como válidas 129 excluyendo de ser analizadas 28. De estas 28 experiencias excluidas, las 12 primeras se realizaron

como control de que el sistema funcionaba correctamente, de que el material estaba en condiciones y para la detección de posibles problemas metodológicos. En el desarrollo experimental de este proyecto, 16 experiencias más tuvieron que ser excluidas debido a fallos inesperados, tanto en el sistema de perfusión como problemas en la extracción o en el montaje de los corazones.

Las 129 experiencias consideradas como válidas quedaron divididas en 15 grupos de entre 6 y 10 casos cada uno, según las intervenciones aplicadas para establecer la validez o no de la hipótesis de trabajo.

Extracción del corazón

Durante el procedimiento quirúrgico de extracción del corazón, se utilizó una técnica aséptica, con el personal vestido con pijama quirúrgico y bata verde reesterilizable, gorro, mascarilla y guantes estériles desechables.

El animal permanece en ayuno de alimentos sólidos desde las doce horas previas a la operación. El animal es pesado en una balanza, se coloca sobre la mesa de quirófano y se le rasura la oreja derecha. Se procede a canular la oreja para obtener una vía periférica, mediante un catéter de poliuretano del calibre nº18. A continuación se le administra Heparina Sódica vía intravenosa, a una dosis de 500 Unidades por cada 100 gramos de peso, para inhibir la coagulación de la sangre. El conejo es sometido a anestesia general intravenosa con tiopental en un único bolo de 40 mg/K de peso ⁽¹⁴³⁾. El animal es mantenido en ventilación espontánea con aporte de Oxígeno al 100%, mediante una mascarilla, hasta la extracción del corazón. A continuación se rasura la cara anterior del tórax y se le aplica Yodo-Povidona al 10% de la marca Betadine sin diluir.

La intervención se inicia con una incisión cutánea sobre la línea media torácica anterior, desde la base del cuello hasta la mitad superior del abdomen. Se realiza una esternotomía media de manera que queda expuesto el corazón. A

continuación se procede a la apertura longitudinal del pericardio y a la identificación de la aorta y la arteria pulmonar. Para proceder a la extracción del corazón se seccionan la vena cava inferior, venas pulmonares y, por último, la arteria pulmonar y la aorta a la altura del cayado aórtico.

Estas últimas maniobras de la cardiectomía deben realizarse de forma rápida y segura, para evitar el daño en las estructuras cardíacas, y empleando el menor tiempo posible, ya que a mayor tiempo de isquemia, mayor depleción de ATP. Dada la importancia de este hecho, en este trabajo se desecharon todas las experiencias en las que el corazón permaneció más de dos minutos en isquemia.

3.2.- Sistema Langendorff y accesorios:

Una vez extraído, el corazón se pesa en una balanza de precisión electrónica digital (ver tabla 4-1 en resultados), marca selecta, modelo Sartorius analytic A 200 S, que posee 4 filtros digitales optimizados y una desviación típica menor de ± 0.0001 gramos. Previo al montaje del corazón en el sistema Langendorff, este debe ser preparado.

El sistema Langendorff consta de lo siguiente (Figura 3-1: Sistema Langendorff):

- **Mesa de acero inoxidable**, que constituye el soporte de todo el aparato.
- **Depósito o Reservorio** para la solución salina de perfusión Krebs. Tiene una capacidad de 3 litros y permite que el líquido sea burbujeado con carbógeno durante todo el experimento (Figura 3-2).

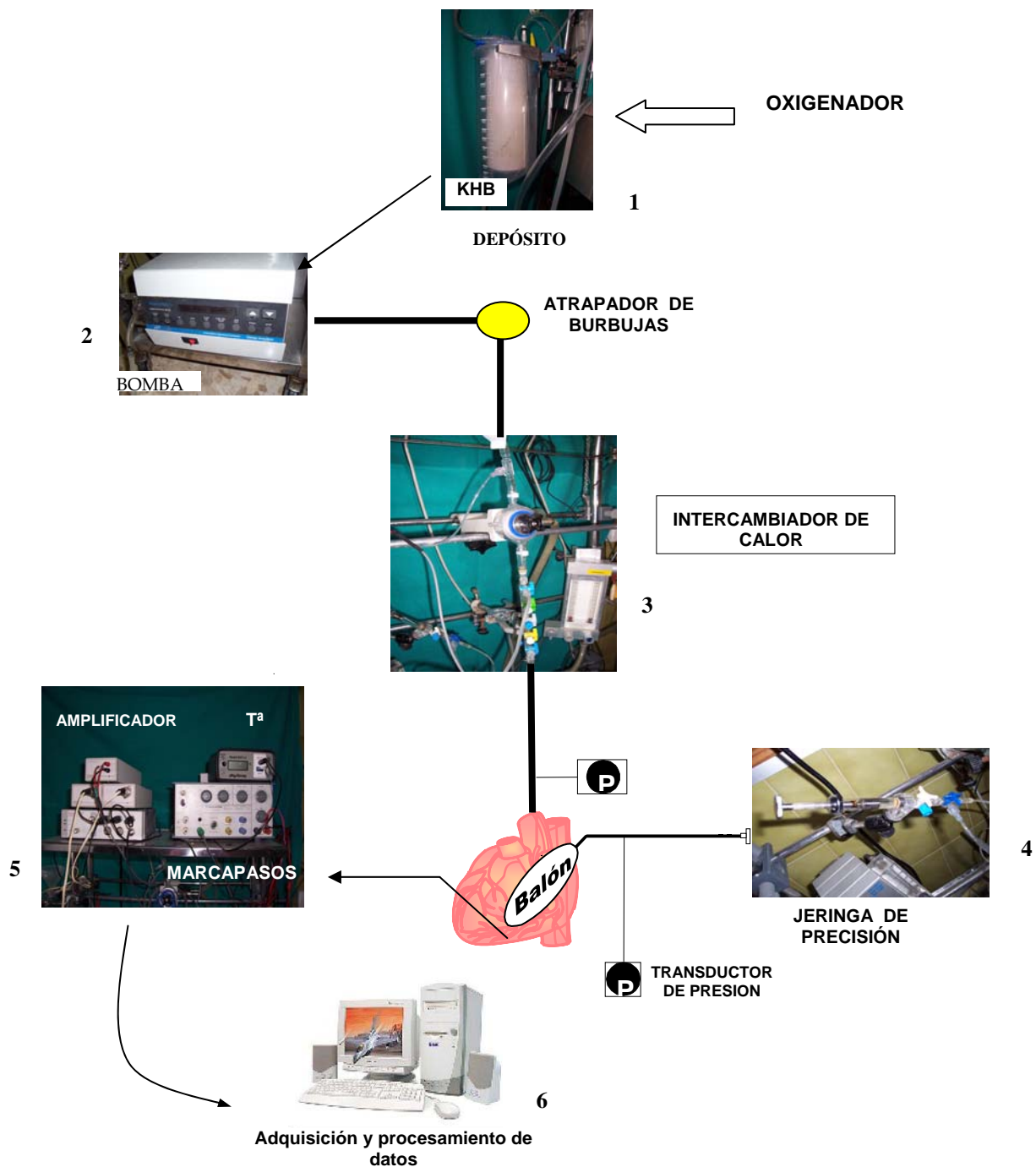


Fig 3-1.- Esquema de los distintos componentes del *sistema Langendorff* empleados durante la experiencia.

Este sistema permite de forma exacta el estudio del corazón aislado de influencias neurohormonales.

Con ello se estudia parámetros hemodinámicos del corazón gracias a la perfusión de solución de Krebs en el árbol coronario. 1- Reservorio para solución salina; 2- Bomba peristáltica de perfusión; 3- Intercambiador de calor; 4- Jeringa de precisión para rellenar el balón; 5- Sistema Power Lab de amplificadores, termómetro y marcapasos; 6- Equipo informático para el registro y tratamiento de datos.



Fig 3-2.-Depósito de solución Krebs

- **Bomba peristáltica** de perfusión con control de flujo marca Masterflex® Computerized Drive modelo 7550-62 con capacidad de flujo desde 6 a 2280 mL/min. Cole-Parmer Instrument Company. Chicago, Illinois 60648. Nos permite seleccionar la velocidad de flujo que necesitemos y mantenerla fija durante toda la experiencia. (Figura 3-3)



Fig 3-3.- Bomba de perfusión.

- **Atrapador de burbujas** Nos permite evitar las pocas burbujas que aparezcan durante la perfusión del corazón, evitando que estas pasen a la circulación coronaria.(Figura 3-4)



Fig 3-4.- Atrapador de burbujas.

- **Jeringa de precisión** con micrómetro, marca Henke® con la que llenamos el balón intraventricular con un volumen conocido hasta obtener la presión diastólica que queremos fijar. La jeringa la llenamos con agua destilada o con etanol. (Figura 3-5)



Fig 3-5.- Jeringa de precisión

- **Calentador de agua** con termostato, bomba de agua y sistema de intercambio de calor (Figura 3-6), para calentar la solución de perfusión. Esta agua circula a través de un intercambiador de calor de manera que calienta la solución salina de perfusión a 36°C



Fig 3-6.- Calentador de agua.

- **Rotámetro** o regulador de presión para el ajuste de flujo de carbógeno para el burbujeo de la solución de perfusión en el reservorio, marca Elema-Schonander. Sweden.(Figura 3-7)

Fig 3-7.- Regulador de la presión de carbógeno



- **Cánula aórtica** de acero inoxidable y extremo de cerámica que permite la conexión del corazón a través de la aorta ascendente al sistema de perfusión (Figura 3-8). El corazón es atado a la cánula mediante un hilo de seda trenzada del nº 5.

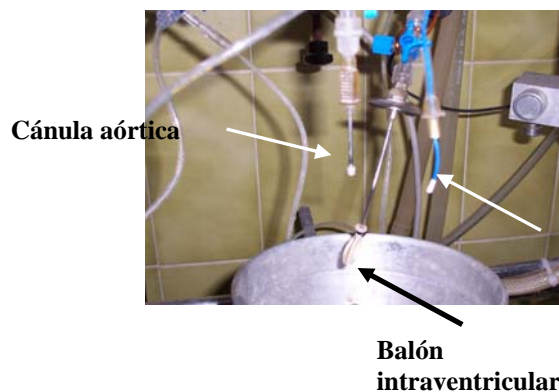


Fig 3-8.- Cánula aórtica.

- **Sistema Power Lab** para la adquisición de datos analógicos a **digital**: de ADInstrument y distribuido por Cibertec, España. Está formado por tres amplificadores unidos a uno general del que se van a mandar los datos al ordenador. (figura 3-9)

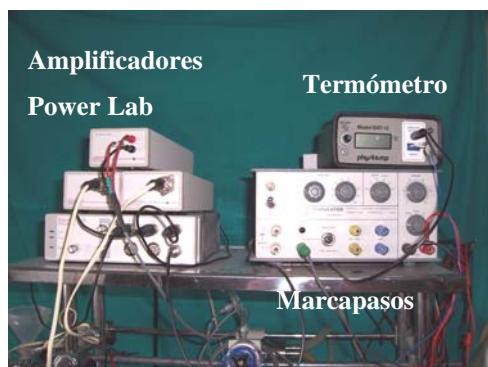


Figura 3-9.- Sistema de adquisición de datos Power Lab, Termómetro y

- **Soporte informático:** ordenador pentium IV a 1Gb de memoria Ram con 120Gb de disco duro. Programa Chart 5.0 para Windows de ADInstruments para la monitorización de las variables recogidas del corazón y para la obtención de otras variables calculadas a partir de las recogidas de forma directa. (véase figura 3-10)

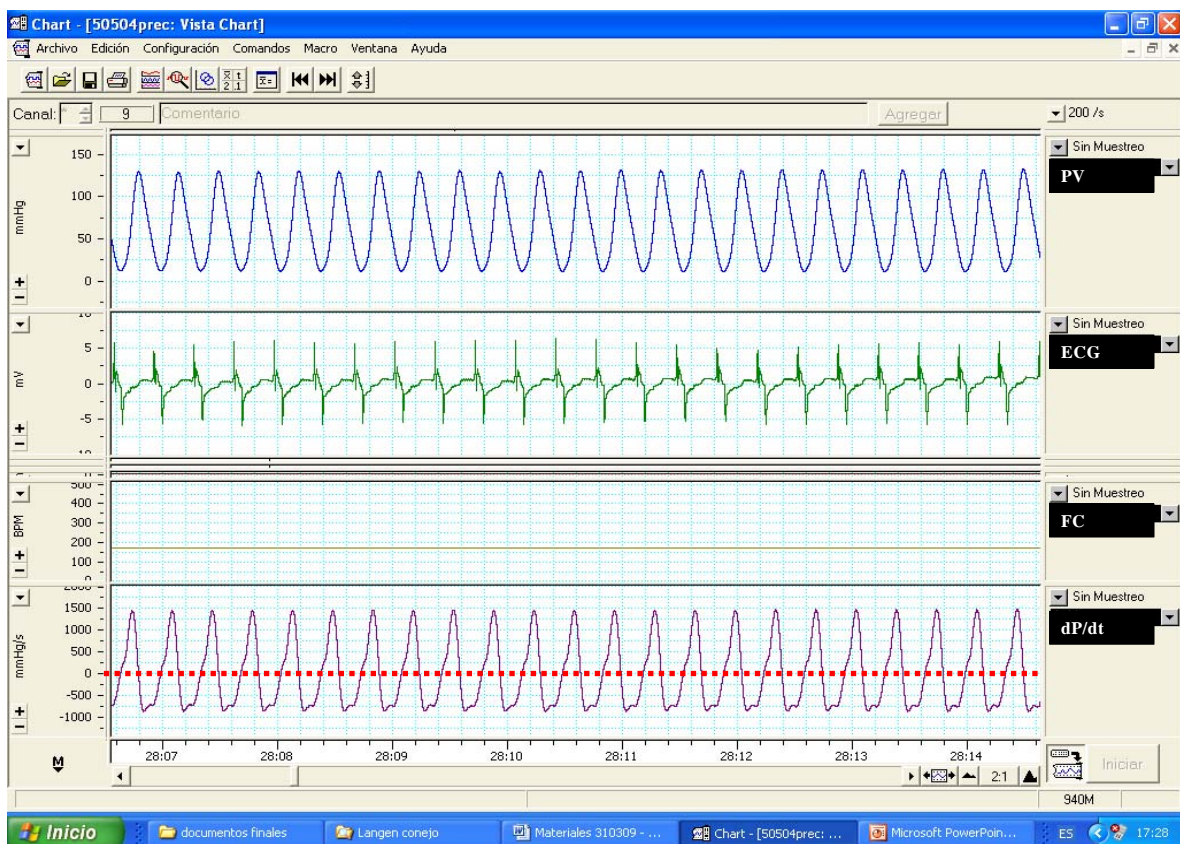


Figura 3.10.- Programa Chart 5.0 para windows. Con este programa podemos monitorizar las variables tomadas de forma directa y otras variables calculadas a partir de estas.

La conexión entre algunos de los elementos que conforman el sistema se realiza mediante tubuladuras y conectores que constituyen el material fungible, y que fueron reemplazados con regularidad:

- Llaves de tres pasos con y sin alargaderas
- Tubos de Tygon de 1/4 * 1/6.
- Jeringas desechables de 5, 10 y 20 mL marca Becton Dickinson

- Agujas marca Abbot Venisystems modelo Butterfly-23.
- Balón intraventricular de látex nº 12 (Figura 8), conectado mediante una cánula de acero y alargadera a la jeringa de precisión con micrómetro y a un transductor de presión Statham P23Db. Este conjunto constituye el sistema para el registro de presión isovolumétrica desarrollado por el corazón aislado.
- Un segundo transductor de presión conectado a la cánula aórtica a través de una llave de tres pasos, para el registro de presión de Perfusión Coronaria (PPC).

3.3.- Pasos previos a los experimentos

El Sistema Langendorff nos permite trabajar con un corazón aislado y perfundido, sin la influencia del sistema neurológico y de hormonas, y analizar una serie de parámetros eléctricos y mecánicos ⁽¹⁴⁴⁾. La actividad del miocardio se mantiene gracias a la perfusión de la solución oxigenada y mantenida a 37°C a través de la raíz aórtica a todo el territorio coronario, de modo que queda asegurada la nutrición y oxigenación de todo el corazón. Por ello es muy importante el purgado del sistema de manera que no quede ninguna burbuja de aire en el circuito, ya que si ocurriera así, esta podría llegar al corazón y obstruir las coronarias provocando un infarto y el mal funcionamiento del corazón, con lo que invalidaría el experimento.

Para comenzar el experimento se procede de la siguiente forma:

1.- Encendemos en primer lugar el calentador de agua con termostato graduado para mantener una temperatura de 37°C (figura 3.6). De este calentador el agua circula continuamente a través de un intercambiador de calor, que va a mantener la solución de perfusión caliente. Esta circulación se realiza gracias a una bomba de agua colocada en el interior del calentador de

agua.

Desde que se enciende hasta que alcanza la temperatura deseada pueden transcurrir unos veinte minutos.

2.- Abrimos la bombona de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) para oxigenar la solución de perfusión en el reservorio. El flujo de carbógeno lo regulamos mediante el rotámetro o regulador de presión (figura 3.7), el cual se encuentra interpuesto entre la bombona y el reservorio.

3.- Ponemos en marcha la bomba peristáltica de perfusión (figura 3.3), definiendo el flujo de perfusión que se mantendrá constante a lo largo de toda la experiencia. La solución comienza a circular por todo el sistema, de manera que una vez que éste está relleno se cierra mediante una llave de tres pasos que permite la recirculación de la solución. Se realiza un purgado exhaustivo del sistema para que no quede nada de aire en el circuito. El primer tramo del circuito queda fácilmente purgado gracias a un atrapador de burbujas insertado tras la bomba (figura 3.4). Además, la cámara de aire que se crea en el atrapador de burbujas amortigua las oscilaciones de presión y el flujo producidas por los rodillos de la bomba, de manera que la presión y flujo de la solución es constante, con lo que las oscilaciones de presión que detectemos serán debidas a cambios en las resistencias coronarias. El purgado del resto del circuito se facilita estableciendo un flujo alto y la inyección de solución a alta presión, mediante una jeringa de 50 ml, a través de una llave de tres pasos insertada justo a la salida del intercambiador de calor. Una vez comprobado que no hay burbujas de aire en el circuito, el sistema está listo para comenzar la perfusión del corazón.

4.- Preparamos el sistema de registro de Presión Isovolumétrica constituido por un balón de látex que se introduce en el Ventrículo Izquierdo, cánula metálica sobre la que va montado, alargadera auxiliar con dos llaves de tres pasos y la jeringa de precisión con micrómetro (figuras 3.5 y 3.8). A través

de una de las llaves de tres pasos, y por medio de la alargadera auxiliar, se conecta este sistema al transductor de presión. A través de la otra llave de tres pasos se llena la jeringa de precisión con agua bidestilada. Una vez purgado, se hace una prueba aplicando presión constante sobre el balón, de unos 70 mmHg durante 10 minutos, no admitiendo un descenso de presión de más de 2 mmHg. Si esto ocurriera hay que volver a revisar todo el sistema.

5.- Por último encendemos el sistema de registro de presiones invasivas Power Lab (figura 3.9). Está compuesto por un amplificador principal al que se conectan otros dos aparatos de registro de presión, uno para la presión del balón y el otro para la de la aorta. A este amplificador principal también se conecta el termómetro y el sistema de marcapasos. Con este sistema podemos registrar la frecuencia cardiaca del corazón, la Presión de Perfusión coronaria (PPC) y las presiones desarrolladas por el Ventrículo Izquierdo (PVS, PVD y PVM), obtenidas a través de los transductores de presión conectados en el sistema a tal efecto. Para que las medidas sean correctas, hay que hacer un ajuste a cero de las presiones mediante la apertura de los transductores de presión al aire.

Una vez preparado el sistema se deja en modo de recirculación y oxigenando la mezcla de perfusión, y pasamos a extraer el corazón.

3.4.- Preparación y Montaje del corazón en el sistema Langendorff

Una vez extraído el corazón, se sumerge rápidamente en solución krebs a 4°C y se transporta hasta el laboratorio donde se encuentra el sistema Langendorff. Tras pesar el corazón en la balanza digital, se le inserta la cánula en la aorta y se fija con seda del nº 5 y se conecta al sistema de perfusión (Figura 3-11).

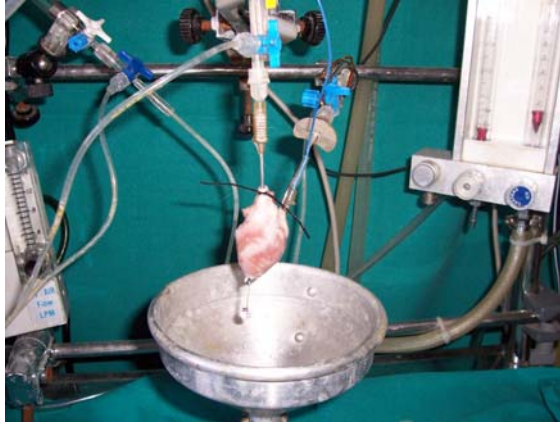


Figura 3-11. Conexión del corazón al sistema Langendorff mediante la cánula de perfusión, colocación del balón y del

Inmediatamente se inicia la perfusión del órgano con la solución Krebs-Henseleit a 37°C y burbujeada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). La perfusión del líquido se realiza de modo constante. El ritmo de perfusión (6ml/g de peso del corazón) fue elegido tras varias experiencias previas, realizadas en nuestro laboratorio, para probar distintos ritmos de perfusión en función del peso del órgano, obteniendo como resultado un nivel óptimo de presión de perfusión coronaria (70 a 90mmHg) ^(143, 144) a 6 ml·min⁻¹/g de peso.

Tras el inicio de la perfusión, se comienza la preparación del corazón para el inicio de la experiencia:

- Se realiza una incisión en la aurícula izquierda, a través de la cual se va a introducir el balón de látex hasta el Ventrículo Izquierdo. Dicho balón está conectado a través de una cánula y una alargadera a una jeringa de precisión, formando un circuito independiente relleno de agua destilada y correctamente purgado antes de cada experiencia, para evitar la formación de burbujas que puedan distorsionar la medida de presión intraventricular transmitida a través de este circuito a un transductor de presión. El balón se fija en ésta posición y tras un periodo de estabilización, se procede al inflado del mismo de forma gradual, mediante la jeringa de precisión, hasta lograr

estabilizar la Presión Telediastólica en el Ventrículo Izquierdo (PVD) en 10 mmHg ⁽¹⁴³⁾, manteniendo este volumen constante durante toda la experiencia, para realizar la evaluación de la función isovolumétrica del ventrículo izquierdo.

- Para la medida de la Presión de Perfusión Coronaria (PPC), poseemos un sistema de presión situado en la raíz aórtica con una conexión lateral desde la cánula aórtica, mediante una llave de tres pasos y una alargadera rellena de agua destilada, convenientemente purgada.
- Por último, se insertan en las paredes ventriculares los electrodos de detección para electrocardiograma continuo de tres derivaciones y estimulación de marcapasos y el termistor para monitorización de la temperatura.

Esta preparación, común a todas las experiencias, se realizó en un tiempo no superior a 5 minutos, incluidos en un periodo de estabilización de 30 minutos, pues según Miura, más allá de 25 minutos de reperfusión transcurridos entre el evento de acondicionamiento y el comienzo de una isquemia sostenida, existe una atenuación de la protección miocárdica, de modo que el posible acondicionamiento isquémico que pudiera producirse en todos los corazones debido al transporte del órgano desde su extracción hasta el inicio de perfusión, queda de este modo neutralizado ⁽¹⁴⁵⁾. Además, está demostrado que en conejos, un periodo de isquemia de 2 minutos de duración no es suficiente para inducir acondicionamiento ^(146, 147).

Tras la finalización de la experiencia, el corazón fue, de nuevo, pesado para determinar el edema producido y finalmente se introdujo en una estufa para desecación marca Selecta, con termostato hidráulico, lector de temperatura con resolución de 2 grados y un rango de temperatura de 0 a 200 °C.

3.5.- Estabilización y medidas de parámetros basales

Una vez finalizada la preparación de la experiencia, todos los corazones son sometidos a 30 minutos de estabilización durante los cuales se instalan los electrodos, el balón ventricular y el sensor de temperatura en la pared del ventrículo derecho. Se conecta el estimulador de marcapasos para mantener una frecuencia cardiaca entorno a 160 latidos por minuto.

Una vez transcurrido este periodo se procede a la recogida de datos correspondientes a la situación basal (M0). Consisten en:

- Frecuencia cardiaca espontánea
- Presión Ventricular Sistólica (PVS)
- Presión Ventricular Diastólica (PVD)
- Presión Ventricular Media (PVM)
- Presión de Perfusión coronaria (PPC)
- $\pm dP/dt$

A partir de estos datos, se llevará a cabo una evaluación completa de la función miocárdica antes de las intervenciones que aplicaremos a cada grupo de corazones, que serán descritas con más detalle en capítulos posteriores de este trabajo.

3.6.- Solución salina utilizada:

La solución salina empleada para la extracción y posterior perfusión del corazón, una vez colocado en el circuito del sistema de Langendorff fue la solución de Krebs-Henseleit que consta de los siguientes compuestos químicos:
(Ver tabla 3-1)

| Tabla 3-1: Solución Krebs-Henseleit modificada | | | |
|---|--------|--------|-------|
| Compuesto | PM | mmol/L | g/L |
| NaCl | 58.44 | 118.5 | 7 |
| KCl | 74.56 | 4.7 | .223 |
| MgSO ₄ | 246.48 | 1.2 | .114 |
| K ₂ PO ₄ | 136.09 | 1.2 | .163 |
| CaCl ₂ | 110.99 | 2.5 | .280 |
| NaHCO ₃ | 84.01 | 24.8 | 2.350 |
| Glucosa | 181.6 | 5 | .900 |

Composición de la solución de Krebs-Henseleit modificada utilizada en nuestro laboratorio, expresada en mmol/L y en g/L. Se refleja también los pesos moleculares de todos los componentes

Todos los productos químicos son de las casas Panreac y Sigma.

El pesado de los distintos componentes se realizó de forma cuidadosa para evitar errores en la composición de la solución.

Todos los componentes se añadieron en un matraz de tres litros que previamente fue llenado con dos litros de agua bidestilada. El matraz se colocó sobre un agitador a una velocidad de 700 r.p.m. a temperatura ambiente.

Una vez añadidos en el matraz, se completó con agua bidestilada hasta un volumen final de tres litros. Se dejó agitando hasta estar seguros de que se ha completado la disolución de todos los componentes, con cuidado de que no quede nada en el borde del matraz. Si quedasen partículas sin diluir podrían causar una embolia coronaria e invalidaría la experiencia.

La solución final es vertida en el reservorio para la misma del sistema Langendorff (Figura 3-2).

3.7.- Parámetros y mediciones

El objetivo de este trabajo es evaluar la función miocárdica en los distintos momentos de la experiencia en términos de mecánica cardíaca.

3.7.1.- Datos generales

Para comprobar que no había diferencias significativas en cuanto a los datos generales de las experiencias se realizó un test ANOVA con estas variables que se representa en la tabla 3.2 ($p < 0.05$). Se observó que solo hay diferencias en cuanto al peso corporal de los conejos del grupo 14. Esto fue debido a que fue el último grupo en realizarse y no disponíamos de conejos de menor tamaño. Pero aún así esto no afectó a los resultados finales (ver tabla 3-2).

3.7.2.- Evaluación de la mecánica cardíaca

Esta evaluación se realizó a través de datos hemodinámicos directos obtenidos durante la experiencia y otros parámetros calculados a partir de aquellos.

3.7.2.1.- Presión Pico (valor máximo de la Presión Ventricular Sistólica, PVS)

Es el valor máximo de la curva de presión ejercida por el ventrículo izquierdo para un momento dado en el que se toma la medida. Estos valores se registran en cada fase del ensayo (figura 3.12).

3.7.2.2.- Presión Ventricular Media (PVM)

Es el valor medio calculado entre el valor máximo y el mínimo de la curva de presión ejercida por el Ventrículo Izquierdo sobre el balón intraventricular colocado en el mismo (figura 3.12).

| Tabla 3- 2: Datos generales | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|
| Grupo | Peso conejo | Flujo de perfusión | Peso corazón inicial | Peso corazón final | Peso corazón seco | Vol. Balón |
| control isq45min n=10 | 2355,00±4,37 | 33,20±0,059 | 6,34±0,01 | 10,58±0,018 | 1,29±0,0038 | 409,00±1,52 |
| PI n=10 | 1905,00±2,73 | 33,40±0,33 | 5,79±0,007 | 10,39±0,014 | 0,99±0,0017 | 551,11±2,48 |
| PADP n=9 | 2011,11±2,17 | 31,67±0,033 | 5,95±0,007 | 10,08±0,017 | 1,08±0,001 | 575,56±4,11 |
| PI+ADP n=6 | 2266,67±9,19 | 33,83±0,106 | 7,15±0,04 | 11,97±0,048 | 1,24±0,0075 | 798,33±1,64 |
| PADP+SPT n=7 | 2242,86±5,21 | 34,86±0,05 | 6,79±0,012 | 11,37±0,02 | 1,23±0,003 | 808,57±1,12 |
| PI+p-sulf n=9 | 1983,33±5,09 | 31,00±0,047 | 6,50±0,015 | 11,28±0,023 | 1,23±0,003 | 792,22±1,41 |
| PI+glib n=14 | 2289,29±2,88 | 30,50±0,016 | 6,54±0,008 | 10,45±0,011 | 1,17±0,002 | 673,57±1,36 |
| Pdipy n=7 | 2085,71±5,32 | 32,14±0,064 | 6,72±0,027 | 11,03±0,042 | 1,14±0,003 | 871,43±0,7 |
| PI+Dipy n=9 | 2677,78±5,29 | 35,44±0,07 | 7,60±0,018 | 13,15±0,032 | 1,48±0,003 | 947,78±1,36 |
| PI+Dipy+glib n=7 | 1914,29±7,96 | 32,00±0,059 | 6,56±0,024 | 10,57±0,033 | 1,12±0,004 | 884,29±0,53 |
| PADP+Glib n=10 | 1960,00±5,13 | 28,70±0,0236 | 6,97±0,0119 | 11,25±0,027 | 1,16±0,0031 | 714,00±1,63 |
| PI+ADP+Glib n=7 | 2285,71±4,51 | 33,57±0,023 | 6,74±0,016 | 11,83±0,026 | 1,21±0,0036 | 904,29±1,55 |
| Pdipy+SPT n=7 | 2171,43±9,47 | 28,00±0,052 | 6,26±0,021 | 9,91±0,032 | 1,21±0,0044 | 808,57±5,04 |
| Pdipy+glib n=12 | 3083,33±3,68 * | 32,33±0,064 | 8,70±0,009 | 96,13±1,97 | 1,74±0,003 | 934,17±0,29 |
| Pbel n= 5 | 2340,00±7,71 | 39,80±0,071 | 6,51±0,013 | 11,31±0,034 | 1,38±0,0018 | 784±4,63 |
| Total N=129 | 2256,45±0,0031 | 32,08±0,00028 | 6,79±0,00008 | 11,29±0,00013 | 1,24±0,00002 | 751,22±0,014 |

Los datos que aparecen en la tabla corresponden a la media+/- el error estandar. No hay diferencias estadísticas, $p < 0,05$

3.7.2.3.- Presión Ventricular Diastólica (PVD)

Es el valor mínimo de la curva de presión ejercida por el ventrículo izquierdo para un momento dado en el que se toma la medida. Esta variable la fijamos a un valor de 10 mmHg llenando el balón intraventricular mediante una jeringa de precisión, con un volumen conocido, de manera que los cambios que se produzcan en esta van a ser debidos al funcionamiento del Ventrículo Izquierdo (figura 3.12).

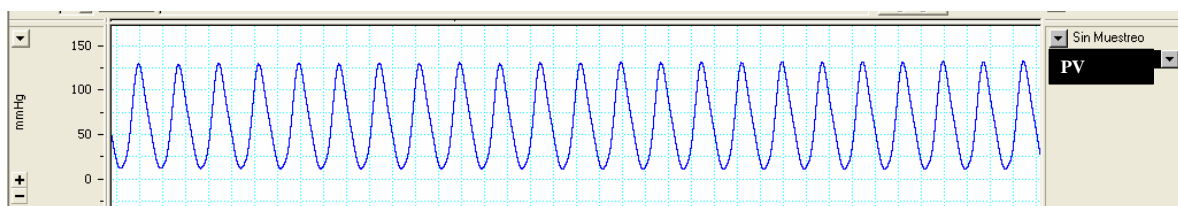


Fig.3.12.- Registro de la curva de presión del ventrículo izquierdo mediante el programa Chart 5.0

3.7.2.4.- Presión de Perfusión Coronaria (PPC)

Como ya vimos en el capítulo anterior, la PPC, cuando trabajamos a un flujo de perfusión constante, es una función directa de las referencias coronarias, que a su vez dependen del radio de los vasos coronarios. Los resultados se muestran en las tablas desde la 4-3 a la 4-10. Se han obtenido también la Presión arterial sistólica (PAS), la diastólica (PAD) y la media (PPC). También se aplica un estadístico t test para observar si hay un aumento significativo de la PPC dentro de cada grupo.

3.7.2.5.- Resistencias vasculares (RV)

Este parámetro nos da una idea de la resistencia que ejercen las coronarias a la perfusión de la solución salina. Es un parámetro calculado a partir de la PPC y el flujo de perfusión en cada momento.

Las RV pueden ser calculadas en el sistema Langendorff con la siguiente fórmula:

$$RV = \Delta P / \Phi$$

Donde las RV coronarias se obtienen del cociente entre la Presión de Perfusión ($\Delta P=PPC$) y el Flujo Coronario (Φ). Como en nuestro modelo el flujo es constante, las resistencias coronarias dependen estrechamente de la Presión de Perfusión Coronaria.

Durante el periodo de isquemia todas las variables nos dan un valor de cero, ya que el corazón llega a pararse por completo.

3.7.2.6.- Frecuencia Cardíaca espontánea

Se obtiene mediante la inserción de tres electrodos de detección de Electrocardiograma continuo de tres derivaciones conectados al sistema Power Lab y al ordenador. Para la función de marcapasos se utiliza un estimulador externo (scientific & research instruments (SRI), England), manteniendo la frecuencia cardíaca en un valor fijo de unos 160 spm.

3.7.2.7.- Presión liberada por el ventrículo izquierdo (VI)

Mediante la conexión del balón intraventricular a un transductor de presión y al sistema Power Lab, se obtiene la curva de presión desarrollada por el V.I. con las cifras de presiones sistólicas, diastólicas y la media. Estas cifras nos permiten el cálculo de la Presión Liberada por el V.I. (PLVI) como la diferencia entre la presión Pico (PPVI) y la PVD.

$$PLVI = PPVI - PTDVI$$

3.4.2.8.- $\pm dp/dt$

La valoración de la contractilidad miocárdica de una forma más completa requiere además el análisis de la velocidad de acortamiento de la fibra cardíaca. Para este propósito, se realiza el estudio del incremento de presión con respecto al tiempo de dicha curva, es lo que llamamos el $+dp/dt$ max. Obtenemos de este modo un parámetro representativo de la función sistólica o

contractilidad ($+dp/dt$). Este análisis se realizó mediante la conexión del monitor a un PC y un programa de adquisición de datos para el análisis de la señal analógica procedente del monitor de presión invasiva (HP VEE 3.2).

Mediante un programa de adquisición de datos instalado en un PC y conectado al sistema Power Lab de registro de señales, Chart versión 5 en castellano, obtenemos la curva de presión ventricular (figura 3-13). A partir de esta obtenemos una nueva variable, el $+ dp/dt$ máximo, que se calcula como el valor máximo de la derivada de la curva de Presión desarrollada por el Ventrículo Izquierdo, un buen indicador de la contractilidad miocárdica.

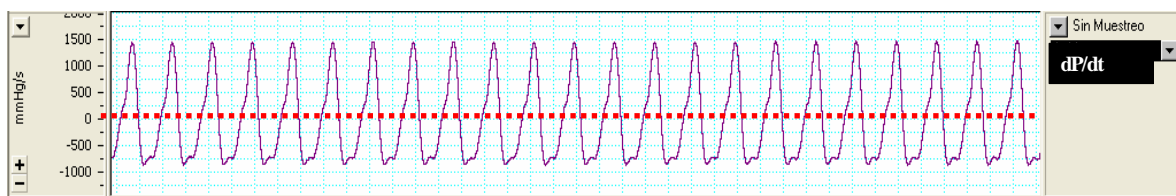


Fig 3.13. Registro del dP/dt calculado mediante el programa Chart 5.0

Del mismo modo se puede valorar la función diastólica mediante el análisis estadístico de los valores del $- dp/dt$ máximo, es decir, el máximo valor (en valor absoluto) de la derivada de la curva de Presión, en su vertiente negativa o descendente, correspondiente a la diástole ventricular.

3.8.- Fármacos

Para la inducción de anestesia del animal se utilizaron:

- Tiopental sódico (Tiobarbital 0.5g), marca Braun Medical SA. Este fármaco tiene la ventaja de que, a pesar de producir un efecto inotrópico negativo y afectar a la circulación coronaria, estos efectos son completamente abolidos a los 10 minutos de interrumpir su administración ^(144, 146)
- Heparina sódica 5%, marca Orbi.

Todos los fármacos utilizados para la realización de este trabajo fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

La administración de los fármacos se llevó a cabo por su infusión mediante un circuito con alargaderas hasta las llaves de tres pasos conectadas al corazón y una bomba de infusión Vial Medical Program 2 Becton Dickinson (figura 3-12).

Figura 3-12.- Bomba de infusión mediante la cual podemos aplicar los distintos fármacos a la concentración deseada mediante la regulación del flujo.



4.- MÉTODOS

4.1.- Fases de la experiencia y recogida de los datos

Independientemente del grupo de trabajo, los momentos de recogida de los datos son comunes a todos los corazones.

| Cronología de la recogida de datos | | | | | |
|------------------------------------|----------|------|----------|------------|-------|
| Estabilización | Precond. | | Isquemia | Reperusión | |
| 30' | 5' | 5' | 45' | 15' | 30' |
| | | | | 45' | 60' |
| | M30' | M45' | | M105' | M120' |
| | | | | M135' | M150' |

1. La primera recogida se realizó, como ya hemos visto antes, al final de la **fase de estabilización**. Son los datos basales y, con respecto a estos analizaremos la recuperación miocárdica tras los distintos protocolos (M30').
2. A continuación está la denominada **fase de acondicionamiento**, con una duración de 15 minutos y en la que los corazones van a ser sometidos a distintos tratamientos, según el grupo de trabajo. Al final de esta fase se vuelven a tomar los datos (M45'), que nos servirán para evaluar las consecuencias inmediatas de la aplicación de cada tratamiento sobre la función cardiaca.
3. Inmediatamente comienza la **fase de isquemia crónica** que tiene una duración de 45 minutos y en la que no se tomaron datos porque el corazón se para y todos los parámetros se viene a cero.
4. Posteriormente se inicia la **fase de reperusión** que tiene una duración de 60 minutos y en la que se tomaron los datos cada 15 minutos (M105', M120', M135' y M150'). El valor final de esta fase es el que va a ser comparado con el valor basal de cada corazón, lo que nos va a dar idea de la recuperación funcional del miocardio en cada grupo.

4.1.1.- Protocolos de acondicionamiento

Tras la fase de estabilización, de 30 minutos de duración, viene la fase de acondicionamiento, en la que se van a aplicar los distintos tratamientos, según el grupo de trabajo (ver tabla 3-3). Esta fase tiene una duración de 15 minutos:

Al final de la fase de estabilización, en cada grupo se toman medidas que nos van a servir de control para el resto de tratamientos que se van a aplicar en los distintos grupos.

| Tabla 3-3 : Claves para definir los grupo | |
|---|---|
| Clave adjudicada | Descripción del grupo |
| Grupo 1: Control Isquemia (I) | Grupo sometido a Isquemia prolongada |
| Grupo 2: Precond. Isquémico (PI) | Grupo sometido a Acondicionamiento Isquémico |
| Grupo 3: Adenosina (PADP) | Grupo sometido a Prec. farmacológico con ADP |
| Grupo 4: Dipyridamol (PDipy) | Grupo sometido a Prec. farmacológico con Dipy. |
| Grupo 5: Precond. Isq.+ ADP (PI+ADP) | Gupo sometido a Precond. Isq + infusión de ADP. |
| Grupo 6: Precond Isq + Dipy (PI+Dipy) | Grupo sometido a Precond. Isq + infusión de Dipy. |
| Grupo7: PI + 8-p-sulfofenilteofilina (PI+ SPT) | Bloqueo con 8-p-sulfofenilteofilina + Precond. Isq. |
| Grupo 8: ADP + 8-p-sulfofenilteofilina (PADP+SPT) | Bloqueo con 8-p-sulfofenilteofilina + Prec. con ADP |
| Grupo 9: Dipy + 8-p-sulfofenilteofilina (PDipy+SPT) | Bloqueo con 8-p-sulfofenilteofilina + Prec. con Dipy. |
| Grupo 10: PI+ Glibenclamida (PI+Glib) | Bloqueo con Glibenclamida + Precond. Isq. |
| Grupo 11:ADP + Glibenclamida (PADP+Glib) | Bloqueo con Glibenclamida + Prec. con ADP |
| Grupo 12: Dipy + Glibenclamida (PDipy+Glib) | Bloqueo con Glib. + Prec. con Dipy. |
| Grupo 13: PI +ADP +Glibenclamida (PI+ADP+Glib) | Bloqueo con Glib + Precond isq junto con ADP. |
| Grupo 14: PI+Dipy+ Glibenclamida (PI+Dipy+Glib) | Bloqueo con glib + Precond isq junto con Dipy. |
| Grupo 15: Bromoenol lactona (PBel) | Grupo Prec. farmacológico con Bel |

Grupo 1: Isquemia. Para comprobar si nuestro modelo experimental nos servía como modelo de isquemia prolongada, se hicieron ensayos con distintos tiempos de isquemia resultando el tiempo óptimo de 45 minutos. Tras este tiempo de isquemia obteníamos mayor lesión cardiaca, pero el corazón continuaba ejerciendo presiones al reperfundir, para poder ver en los sucesivos grupos de ensayo la recuperación de éstas durante la reperfusión cardiaca.

La fase de isquemia consiste en el desvío de la circulación de la solución nutritiva, de manera que ésta vuelve al reservorio y no llega al corazón, con lo que el flujo coronario es cero. No se aplicó cardioplegia. El corazón fue sumergido en la solución a 37 °C y se mantuvo a esta temperatura.

Grupo 2: Precondicionamiento isquémico. En este grupo tratamos de comprobar que el precondicionamiento isquémico mejora el funcionamiento del corazón tras ser sometido a 45 minutos de isquemia y una hora de reperfusión. Para ello utilizamos un único ciclo de precondicionamiento consistente en 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión previos a los 45 minutos de isquemia global.

Grupo 3: Precondicionamiento con ADP. En este grupo tratamos los corazones con ADP. Para ello infundimos una solución de Krebs-Henseleit con una concentración de ADP de 1mM, de manera que, al diluirse con el flujo coronario, llega al corazón con una concentración final de 10 µM. Se infundió durante 15 minutos previos a la isquemia global de 45 minutos y durante los 5 primeros minutos de la reperfusión.

Grupo 4: Precondicionamiento con dipyridamole. En este grupo tratamos a los corazones con dipyridamole a una concentración final en el perfundido de 4 µM durante los 15 minutos previos a la isquemia global de 45 minutos y

durante los 5 primeros minutos de la reperfusión.

Grupo 5: Precondicionamiento isquémico junto con la infusión de ADP. En este grupo tratamos de ver si la protección proporcionada por la Adenosina es sumatoria a la del PI. Como comentamos en el grupo 3, sometemos a los corazones a 5 minutos de infusión de ADP 10 μM seguidos por 5 minutos de isquemia y otros 5 de reperfusión en los que también se infundió ADP. A continuación se llevó a cabo la isquemia global de 45 minutos y los 60 minutos de reperfusión. En los cinco primeros minutos de la reperfusión también infundimos ADP.

Grupo 6: Precondicionamiento isquémico junto con la infusión de dipyridamol. En este grupo tratamos de ver si la protección proporcionada por el dipyridamol es sumatoria a la del PI. Como comentamos en la sección anterior, sometemos a los corazones a 5 minutos de infusión de dipyridamol 4 μM seguidos por 5 minutos de isquemia y otros 5 de reperfusión en los que también se infunde dipyridamol. A continuación se llevó a cabo la isquemia global de 45 minutos y los 60 minutos de reperfusión. En los cinco primeros minutos de la reperfusión también infundimos dipyridamol.

Grupo 7: Precondicionamiento farmacológico con ADP más SPT. En este grupo tratamos de comprobar que la adenosina está actuando en la protección del corazón a través de sus receptores. Para ello inhibimos a los receptores purinérgicos de forma inespecífica con el 8-p-sulphophenyl-theophylline (SPT) a una concentración de 10 μM . Este fue aplicado tanto en los 15 minutos de la fase de tratamiento junto con la adenosina y al inicio de la reperfusión, para bloquear el efecto de la adenosina tanto durante la isquemia como durante el inicio de la reperfusión.

Grupo 8: Precondicionamiento farmacológico con dipyridamol y SPT. En este grupo lo que se hizo fue, al igual que en el grupo anterior, se inhibieron los receptores purinérgicos con SPT 10 μM previo a la infusión de dipyridamol como tratamiento preconditionante con el objeto de ver si la adenosina endógena lleva a cabo su acción beneficiosa a través de los receptores para la misma, de manera que si los inhibimos, el efecto protector de la adenosina quedaría anulado.

Grupo 9: Precondicionamiento Isquémico junto con la infusión del inhibidor SPT simultáneamente. En este grupo infundimos SPT 10 μM 5 minutos antes de la isquemia breve y durante la reperfusión previas a la isquemia crónica de 45 minutos. También durante los 5 primeros minutos de la reperfusión. El objetivo es comprobar la eliminación del efecto beneficioso del ADP en el preconditionamiento isquémico y como repercute en el beneficio global del mismo.

Grupo 10: Precondicionamiento Isquémico junto con la infusión del inhibidor de los canales de K_{ATP} (glibenclamida) simultáneamente. Previo al PI aplicamos a los corazones durante cinco minutos glibenclamida a una concentración final de 3 μM , durante los cinco minutos de reperfusión del PI y los cinco primeros minutos de reperfusión tras la isquemia de 45 minutos

El objetivo de este grupo es comprobar si se produce la eliminación del efecto beneficioso del PI al inhibir los canales de K^+ dependientes de ATP.

Grupo 11: Precondicionamiento farmacológico con ADP y glibenclamida simultáneamente. Previo a la infusión de Adenosina, aplicamos a los corazones durante cinco minutos glibenclamida a una concentración final de 4 μM , durante los diez minutos de infusión de ADP y los cinco primeros minutos de

reperfusión tras la isquemia de 45 minutos.

Grupo 12: Precondicionamiento farmacológico con dipyridamol y glibenclamida simultáneamente. Previo a la infusión de dipyridamol (4 μM), aplicamos a los corazones glibenclamida (3 μM) en las mismas condiciones que los dos grupos anteriores, durante los diez minutos de infusión de dipyridamol y los cinco primeros minutos de reperfusión tras la isquemia de 45 minutos.

Grupo 13: Precondicionamiento farmacológico con ADP junto con el PI y glibenclamida simultáneamente. En este grupo actuamos de forma similar que en el grupo 5, pero junto con el ADP (10 μM) infundimos de forma simultánea glibenclamida (3 μM). Queremos comprobar que los canales de K_{ATP} son los efectores finales en ambos tratamientos de protección miocárdica cuando estos son aplicados de forma simultánea.

Grupo 14: Precondicionamiento farmacológico con dipyridamol junto con el PI y glibenclamida simultáneamente. En este grupo actuamos de forma similar que en el grupo 5, pero junto con el dipyridamol (4 μM) infundimos de forma simultánea glibenclamida (3 μM). Queremos ver si, al aplicar dipyridamole de forma exógena, además del PI, esta acumulación de ADP en el interior celular, actúa a través de los canales de K^+ dependientes de ATP.

Grupo 15: Precondicionamiento farmacológico mediante la inhibición de la fosfolipasa A 2 independiente de calcio. En este grupo tratamos a los corazones con Bel a una concentración final en el perfundido de 5 μM durante los 10 minutos previos a la isquemia global de 45 minutos y durante los 5 primeros minutos de la reperfusión. Con este grupo pretendemos observar el efecto de la inhibición funcional de la iPLA_2 en el miocardio impidiendo la

liberación de AA durante la isquemia, el cual es responsable de muchos de los efectos deletéreos de la isquemia

4.1.2.- Fase de isquemia crónica

Una vez finalizada la aplicación de cada protocolo, según el grupo de trabajo, todos los corazones son sometidos a un periodo de isquemia crónica de 45 minutos de duración ⁽¹⁴⁸⁾. Dicha isquemia consiste en el desvío de la solución nutritiva hacia el reservorio, haciendo recircular el sistema, de manera que al corazón llega un flujo cero. En ningún caso se administró solución cardioplégica. Durante la isquemia, el corazón es sumergido en un vaso de precipitado lleno de solución Krebs a 37°C y se mantiene a esta temperatura durante todo este periodo. La duración de la isquemia se ha escogido porque, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, con 20 minutos sólo se conseguía un “aturdimiento” del corazón que alcanzaba una recuperación total al final de la hora de reperfusión, de manera que no nos servía como control para el deterioro debido a una isquemia severa.

4.1.3.- Reperfusión

Una vez finalizada la fase de isquemia crónica, se procede a la apertura del circuito hacia el corazón, de manera que se vuelve a restaurar el flujo coronario. Esta fase tiene una duración de 60 minutos. A lo largo de esta fase se van tomando medidas de los datos cada 15 minutos, de manera que se obtiene un total de cuatro medidas al final de la misma. (M2 a los 15 minutos, M3 a los 30 minutos, M4 a los 45 minutos y M5 a los 60 minutos).

4.1.4.- Finalización de la experiencia

Una vez finalizados los 60 minutos de reperfusión se considera que la experiencia ha finalizado, de manera que se desconecta el corazón del sistema y

se vuelve a pesar en la balanza, para tener una idea del edema producido durante la experiencia. Por último el corazón es introducido en una estufa de secado a 70°C donde va a permanecer durante 24 horas para poder determinar el peso seco.

4.2.- Monitorización

El registro de las presiones desarrolladas por el corazón se lleva a cabo mediante un sistema de monitorización que consta de:

- Sistema Power Lab de ADInstruments y dos amplificadores de canales de medición de presión invasiva, también de ADInstruments (figura 3.9). Estos amplificadores toman la señal analógica de las válvulas de presión tanto del balón como de la presión de perfusión, y las convierten en señal digital que es capturada por el ordenador y visualizada mediante el programa de adquisición de datos Chart 5.0 para Windows de ADInstruments.
- Generador externo de estímulos para uso como marcapasos, marca Intermedics modelo 240-02. Adyacente a los elementos de monitorización.
- Monitor de temperatura marca Physitemp modelo Bat-12, con visor digital de 4 dígitos.
- Ordenador PC compatible. Procesador Pentium 4 a 3GHz, 512Mb de memoria Ram y disco duro de 80 Gb, con software para la adquisición de datos Chart5 para Windows (figura 3.10), para el cálculo de las presiones y del $\pm dp/dt$, como indicador de la contractilidad miocárdica.

4.3.- Análisis de Parámetros morfológicos

Para determinar el contenido hídrico y su variación según el grupo de trabajo se pesan los corazones antes y después de cada experiencia y tras haber secado los corazones en una estufa a 70°C durante 48h:

$$CH_2O_i = \text{Peso}_i - \text{Peso seco}$$

$$CH_2O_f = \text{Peso}_f - \text{Peso seco}$$

Donde CH_2O_i es el contenido hídrico del corazón previo a la experiencia y CH_2O_f es el contenido hídrico del corazón tras la experiencia.

El cálculo de la variación hídrica expresado en porcentaje será:

$$\Delta CH_2O = [CH_2O_f - CH_2O_i / CH_2O_i] \times 100$$

4.4.- Tinción de Hematoxilina-Eosina

Tras la experiencia, los corazones de los grupos controles de isquemia y PI, así como en el de inhibición de la PLA_{2i} con Bel, se introdujeron en formol para su fijación. Se cortaron en principio en secciones con un bisturí y se incluyeron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo y las secciones finas del tejido fueron colocadas en portas donde se deshidrataron y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su posterior análisis visual de la estructura celular al microscopio óptico.

Las secciones de muestras fijadas con formol y parafina, se hidratarán primero con agua destilada y seguidamente con agua corriente.

Desparafinado: en Xilol 15 min.

Hidratación: Alcohol de 100° 3 min. y después en Alcohol de 96° 3 min., Alcohol de 70° 3 min. y finalmente en agua destilada 3 min.

Tinción: Hematoxilina de Mayer 10-15 min., lavar bajo flujo de agua corriente hasta azulear. Eosina (1%) 2-4 min., eliminar los restos de eosina en etanol 70°

Deshidratación: Alcohol de 96° 3 min., Alcohol de 100° 3 min.

Aclarado con Xilol 3 min. y **montaje**.

Dejar secar los portas en la estufa de 37°.

Soluciones:

Hematoxilina de Mayer (1903): Disolver en el orden dado los siguientes componentes en 750 ml de agua:

Sulfato de aluminio potásico 50 gr, Hematoxilina 1 gr, Iodato sódico 0.1 gr., Acido cítrico (Monohidratado) 1 gr, Hidrato de Cloral 50 gr. Completar hasta 1litro. Generalmente dura un año. Puede ser reutilizada varias veces.

Eosina (Solución acuosa 1%): Eosina 1 gr., Agua corriente 99 ml. Añadir unas gotas de ácido acético glacial

4.5.- Análisis Estadístico

Los datos biomecánicos recogidos durante la experiencia se someten a un análisis estadístico en el que se comparan entre los distintos grupos los parámetros recogidos en los distintos momentos de la experiencia.

- Estadística descriptiva de los datos recogidos y calculados.
- Inferencia estadística:
 - . Comparación de medias mediante el Análisis de comparación de medias para muestras independientes entre grupos dos a dos, con la aplicación del test de t de Student aplicado a posteriori para valorar los grupos implicados en las posibles diferencias encontradas.

Para todas las pruebas estadísticas se considera significativa una $p < 0.05$.

5.- RESULTADOS

En este trabajo, los datos biomecánicos fueron registrados a una frecuencia cardiaca constante que, como comentamos en el apartado de Métodos, se fijó en 160 sístoles por minuto mediante un marcapasos externo. En cada grupo se midió la Presión Sistólica (PVS), Diastólica (PVD) y Media (PVM) del ventrículo izquierdo así como la Presión de Perfusión Coronaria (PPC). Se obtuvieron así mismo los \pm dP/dt como variable calculada. Para depurar los resultados, obviando las posibles diferencias encontradas en la fase de estabilización, que podrían indicar una diferencia no controlada en la calidad de los corazones entre los distintos grupos, se realiza el cálculo del porcentaje la +dP/dt dentro de cada grupo. Además los valores finales de cada variable (a los 150') van a ser comparados, en cada corazón, con los que presentaban cada uno previo al tratamiento (a los 30').

Los experimentos se hicieron en varios grupos divididos según el tipo de estudio (ver tabla 3-3 en el apartado de materiales y método). A continuación detallamos los resultados de cada grupo.

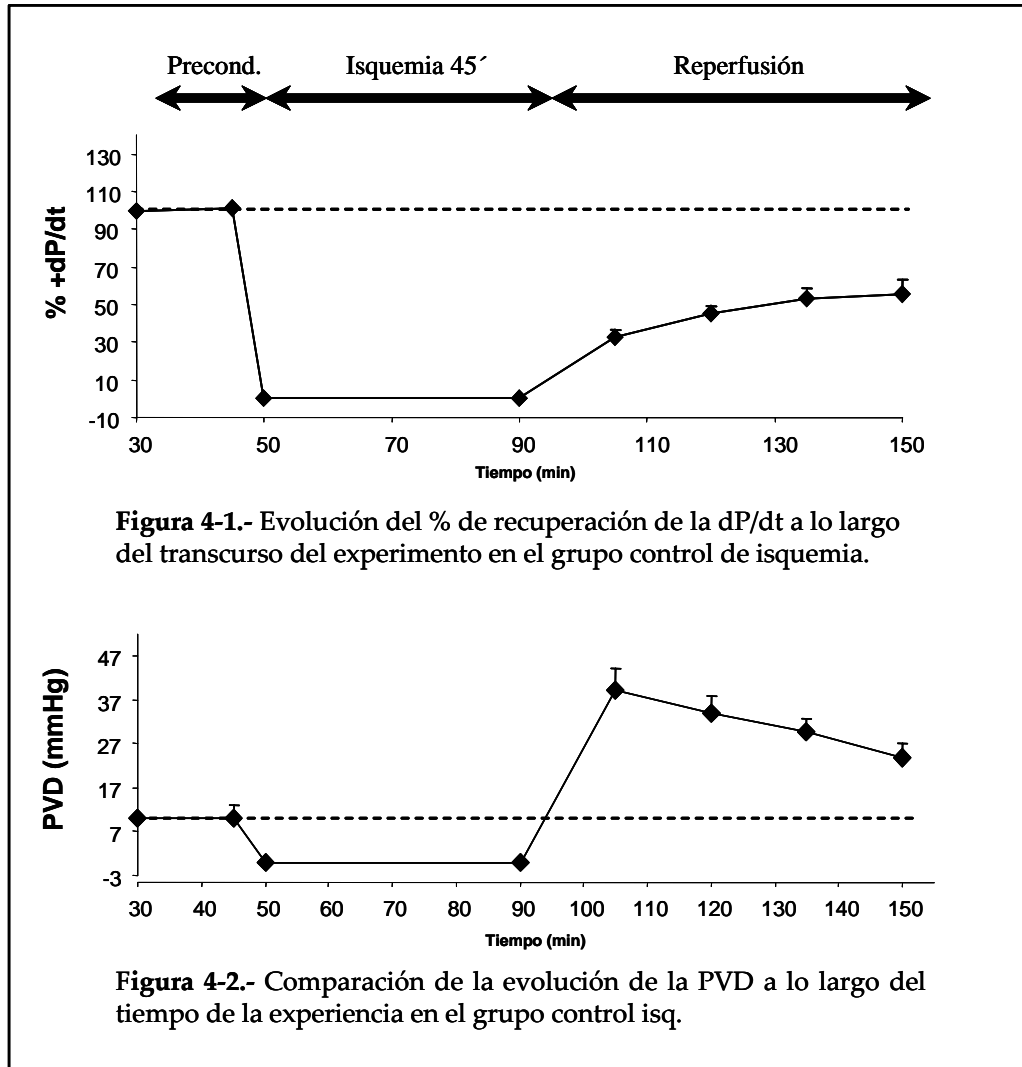
5.1 El Precondicionamiento Isquémico (PI) mejora las funciones hemodinámicas del miocardio tras isquemia-reperfusión.

Grupo 1.- *Isquemia- Reperfusión (Isq, n= 10)*

Los corazones fueron sometidos a una isquemia crónica de 45 minutos y una perfusión de 60 minutos siguiendo el protocolo detallado en el esquema.

| Grupo | Estabilización | | | | Isquemia | Reperfusión |
|-------|----------------|----|----|----|----------|-------------|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 60' |
| Isq | | | | | Isquemia | |

Tras el periodo de isquemia hubo una recuperación progresiva durante la reperfusión en la dP/dt que alcanzó el $56,62 \pm 6,91\%$ (dP/dt 150') con respecto a la dP/dt inicial durante la estabilización (dP/dt 30') (Fig 4-1).



Hemos observado un deterioro significativo en las funciones hemodinámicas del corazón al final de la reperfusión, como se muestra en la tabla 4-1.

| | PVS150' mmHg | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg·min/ml | dP/dt 150' | %Recup |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control isq 45min n=10 | 81±6,64 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |

Por otra parte, estudiando la PVD, pudimos comprobar que se produce hipercontractura del ventrículo izquierdo (PVD150' respecto PVD30') de forma significativa (Fig 4-2) así como un aumento en la PPC (150' respecto a los 30') como se puede observar en la tabla 4-1.

Grupo 2.- Precondicionamiento isquémico (PI, n= 10):

Una vez que tenemos nuestro grupo de lesión por I-R, hicimos nuestro grupo control en el que obtuvimos una mejoría de las constantes hemodinámicas con el protocolo de Precondicionamiento Isquémico (PI).

Está ampliamente demostrado que un solo periodo de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión es suficiente para desencadenar los mecanismos responsables de la protección proporcionada por el preconditionamiento en el corazón de conejo (97,144). Con esta breve reperfusión se describió que varios catabolitos dañinos son lavados (ácido láctico, H⁺, NH₃...) y también el corazón puede recargar su reserva de ATP.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperfusión |
|-------|----------------|----------|-----|----|----------|-------------|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 60' |
| P.I. | | | Isq | | Isquemia | |

Nuestro objetivo era conseguir que al someter al corazón a un breve periodo de isquemia de 5 minutos y otro periodo breve de reperfusión de también 5 minutos, previo al periodo de isquemia crónica de 45 minutos, la función ventricular se recupera significativamente de la lesión por I-R. En los últimos 5 minutos de reperfusión del PI se tomaron medidas de los distintos parámetros.

Como se muestra en la figura 4-3 y la tabla 4-2, observamos una recuperación progresiva de la función contráctil del ventrículo izquierdo

comparado con el grupo de isquemia, alcanzando una dP/dt de $89,82 \pm 8,96$ % con respecto al $56,62 \pm 6,91$ % en el grupo de isquemia después de 60 minutos de reperfusión (a los 150' del experimento). Los valores de la evolución de los distintos parámetros están resumidos en la tabla 4-2.

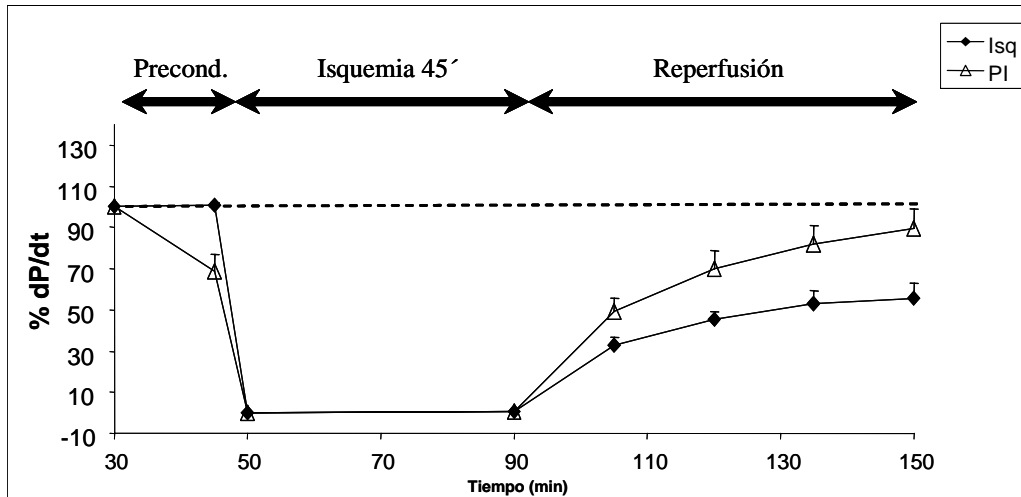


Figura 4-3.- Comparación de la evolución de la dP/dt entre los dos grupos controles a lo largo del transcurso del experimento.

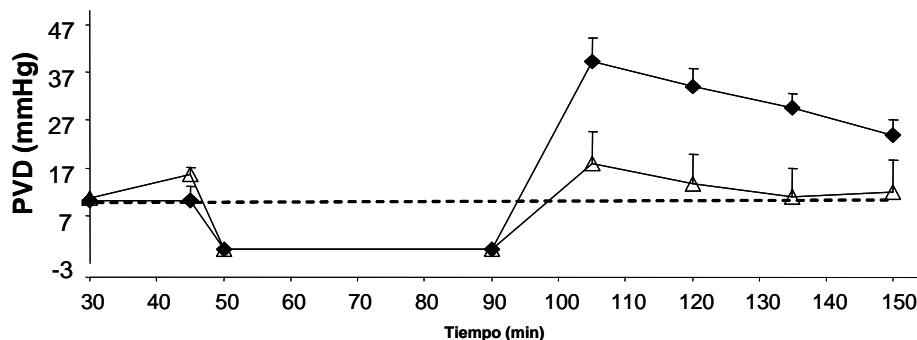


Figura 4-4.- Comparación de la evolución de la PVD a lo largo del tiempo de la experiencia en los grupos controles de I-R y PI.

Por otro lado analizando la PVD como se muestra en la figura 4-4 vimos que el PI previene la contractura isquémica observada durante reperfusión. Tampoco se observó un aumento significativo de la PPC comparado con los corazones isquémicos.

Concluyendo y al comparar ambos grupos hemos obtenido una diferencia significativa en la recuperación tanto de las presiones ejercidas por el miocardio, como se demuestra al comparar estadísticamente la dP/dt y el porcentaje de recuperación de la dP/dt así como en la PPC y en las resistencias vasculares (RV), al utilizar el PI como estrategia de protección ante la lesión por isquemia-reperusión. Los datos comparativos de las constantes hemodinámicas se detallan en la tabla 4-2.

| | PVS150' mmHg | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg·min/ml | $dP/dt150'$ | %Recup |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control isq 45min n=10 | 81±6,64 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |
| PI,n=10 | 89,4±7,6 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |

Análisis histológicos:

Para determinar el daño histológico provocado por isquemia, hemos realizado cortes histológicos de los corazones que fueron sometidos a I-R y a la posible preservación del tejido cardiaco a nivel estructural en los corazones tratados con el PI. Las figuras 4-5 y 4-6 muestran a diferentes aumentos ópticos la prevención de las lesiones del tejido miocárdico de los corazones tratados por el PI en comparación con los corazones isquémicos. Entre estas lesiones se observó la clara aparición de edema intersticial que da lugar en los cortes del tejido a la separación de las fibras cardíacas, lo cual no se aprecia en el tejido precondicionado, y núcleos picnóticos por la condensación de la cromatina previo a la muerte celular.

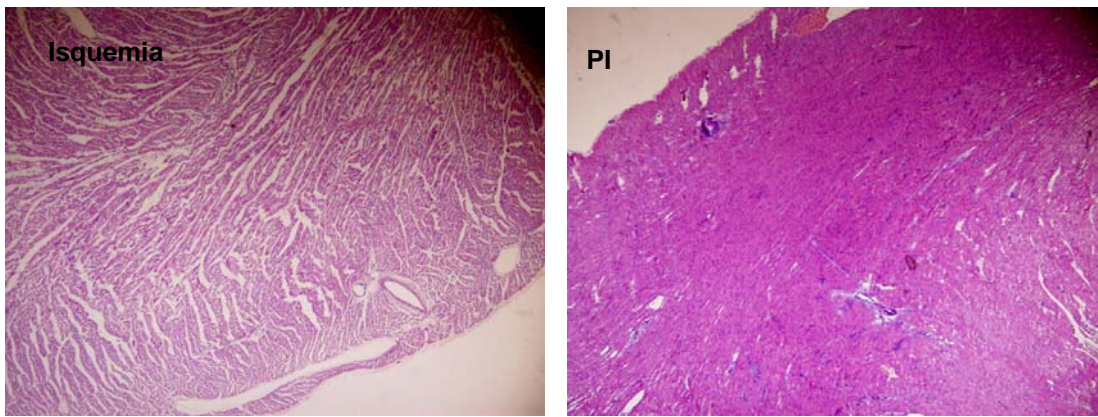


Figura 4.5.- Corte histológico de un corazón de conejo teñido con Hematosilina-Eosina en los grupos control de isquemia y preconditionamiento isquémico. A la izquierda vemos una vista del ventrículo izquierdo isquémico y a la derecha una vista del ventrículo izquierdo sometido a PI. (objetivo 4X)

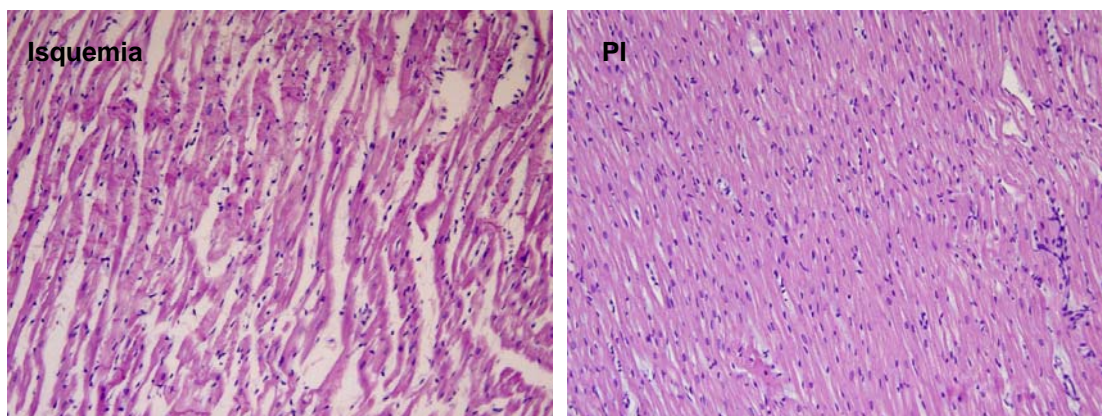


Figura 4.6.- Vista a mayor aumento del ventrículo izquierdo de corazón de conejo teñido con Hematosilina-Eosina sometido a 45 minutos de isquemia global a la izquierda y sometido a PI a la derecha. (objetivo 20X)

Como conclusión final de este primer apartado, con el Precondicionamiento Isquémico hemos visto una mejora significativa de los parámetros hemodinámicos y morfológicos del corazón ante el daño producido por el síndrome de la isquemia, lo cuál servirá como un modelo experimental de referencia para comparar los siguientes tratamientos que vienen a continuación en este estudio.

Uno de nuestros objetivos era tratar de potenciar la acción de los agentes protectores que el propio corazón produce como mecanismo de defensa y que forman parte de las vías que proporcionan el efecto beneficioso del PI. Tal como la adenosina, tanto aplicada de forma exógena como la producida de forma endógena por el corazón ante la isquemia.

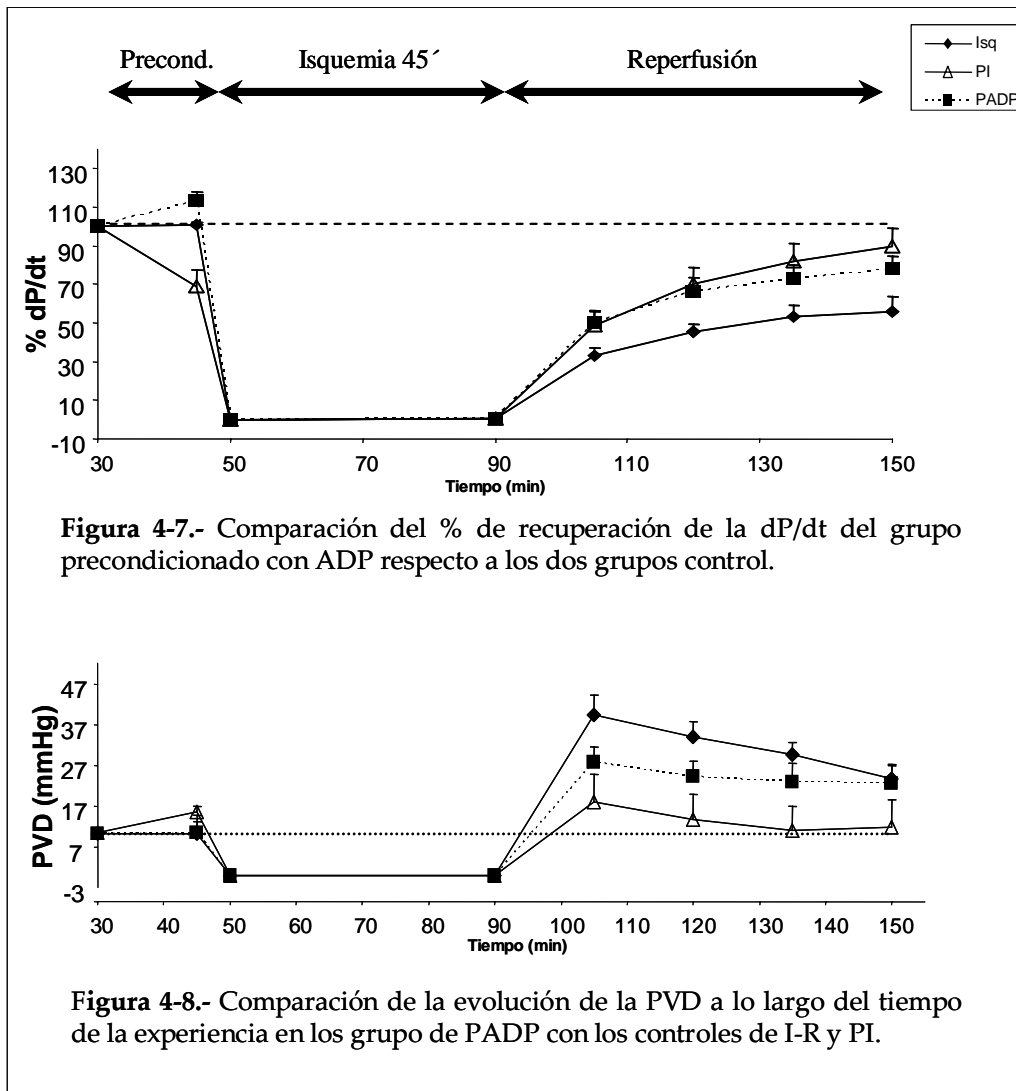
5.2.- La adenosina exógena y la endógena proporcionan la recuperación de la función contráctil ante la lesión por isquemia-reperfusión

Grupo 3.- Precondicionamiento farmacológico con ADP (PADP, n=9):

La adenosina es un metabolito secretado por el corazón de forma natural bajo situación de estrés metabólico como el caso de la isquemia. Por ello hemos estudiado la posible simulación del efecto beneficioso del PI utilizando ADP. EL ADP es un fármaco precursor de adenosina en el miocardio. Lo hemos aplicado de forma exógena a una concentración final de 10 μ M después del periodo de estabilización durante 10 minutos justo antes de aplicar isquemia y los primeros 5 minutos de perfusión como viene detallado en el siguiente protocolo.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperfusión | |
|-------|----------------|----------|-----|----|----------|-------------|-----|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 5' | 60' |
| PADP | | | ADP | | Isquemia | ADP | |

La figura 4-7 muestra que la adenosina ha provocado una mejora significativa en la dP/dt del orden del $76,76 \pm 4,87$ % respecto a la dP/dt del grupo isquémico sin embargo ha sido inferior a la dP/dt del grupo de PI como viene detallado en la tabla 4-3.



Por otro lado y como se muestra en la figura 4-8 no se ha visto diferencias en cuanto a la PVD con el grupo de isquemia, con lo que no fue efectiva la adenosina a la hora de prevenir la hipercontractura del ventrículo izquierdo, así como falló en mejorar las resistencias vasculares que se asemejan a las del grupo isquémico.

El análisis general de los datos hemodinámicos resumidos en la tabla 4-3 de los grupos precondicionados con ADP, han mostrado que la adenosina mejora en la contractilidad ($dP/dt = 76,76 \pm 4,87 \%$), sin embargo no habido efecto sobre la hipercontractura del ventrículo izquierdo (PVD) comparado con el grupo de isquemia. También hemos observado un empeoramiento de la

resistencia del flujo coronario a la perfusión, como se observa en los valores de las RV.

Tabla 4-3.- Datos hemodinámicos de los grupos PADP comparados con los controles

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dP/dt | %Recup. |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control isq45min,n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |
| PI, n=10 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±/8,96 |
| PADP,n=9 | 22,56±6,68* | 115,89±11,44 | 3,40±0,30* | 1114,68±58,84 | 76,76±4,87 |

Grupo 4.- Precondicionamiento farmacológico con Dipyridamol (PDipy, n=7):

Para tratar de precondicionar los corazones con adenosina producida de forma endógena por el corazón hemos utilizado el dipyridamol, un inhibidor de los transportadores de la misma hacia el endotelio, impidiendo de esta manera que se pierda hacia la luz vascular.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperusión | |
|-------|----------------|----------|------|----|----------|------------|-----|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 5' | 60' |
| PDipy | | | Dipy | | Isquemia | Dipy | |

Durante los 10 minutos de tratamiento infundimos dipyridamol a una concentración final de 4 μ M, con el objetivo de simular los efectos beneficiosos del precondicionamiento, proporcionados esta vez, por la adenosina endógena producida por el propio corazón. Al principio de la reperusión se infundió, durante 5 minutos dipyridamol, para que la adenosina formada durante la isquemia crónica no se lave y pueda actuar en esos primeros minutos de la reperusión. Este grupo de precondicionamiento con dipyridamol ha mostrado una recuperación significativa frente a isquemia. La recuperación reflejada por la dP/dt ha alcanzando el 77,82 \pm 6,45 %, un valor muy similar al valor obtenido por la aplicación de forma exógena de adenosina como se representa en la

figura 4-9.

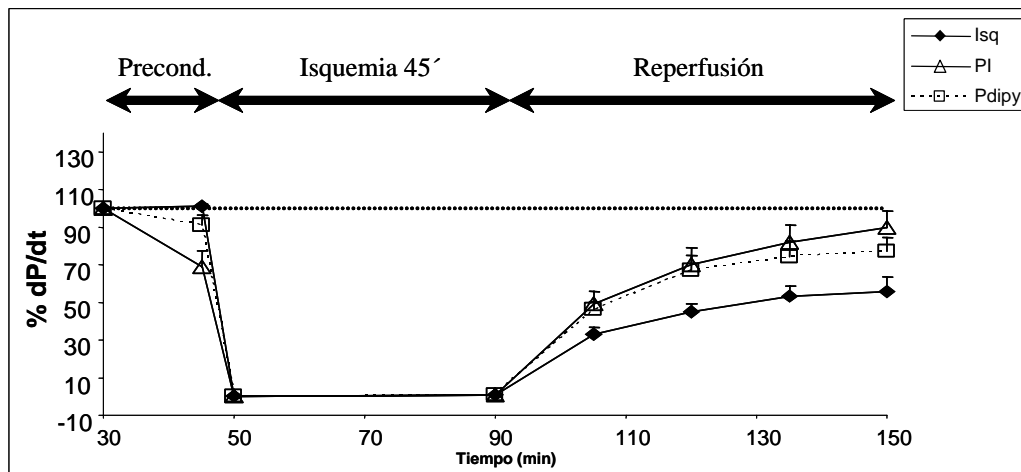


Figura 4-9.- Comparación del % de recuperación de la dP/dt del grupo de preconditionamiento farmacológico con dipyridamol con los grupos controles de isquemia y PI.

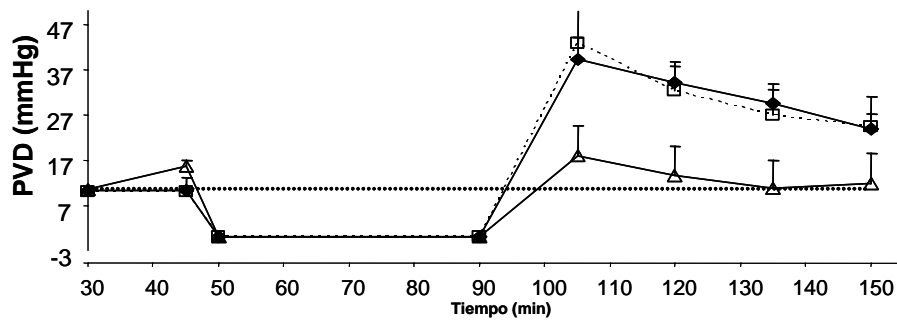


Figura 4-10.- Comparación de la hipercontractura del ventrículo izquierdo al tratar los corazones con dipyridamol como agente farmacológico preconditionante con los grupos controles de isquemia y PI.

Por otro lado el tratamiento con dipyridamol ha producido un aumento en los valores de la PVD y por tanto una mayor hipercontractura del ventrículo izquierdo, al igual que en el grupo de preconditionamiento farmacológico con adenosina exógena, pero no ha habido aumento en el valor de las RV al contrario de lo que ocurre en el grupo de adenosina exógena (fig 4-10 y tabla 4-4).

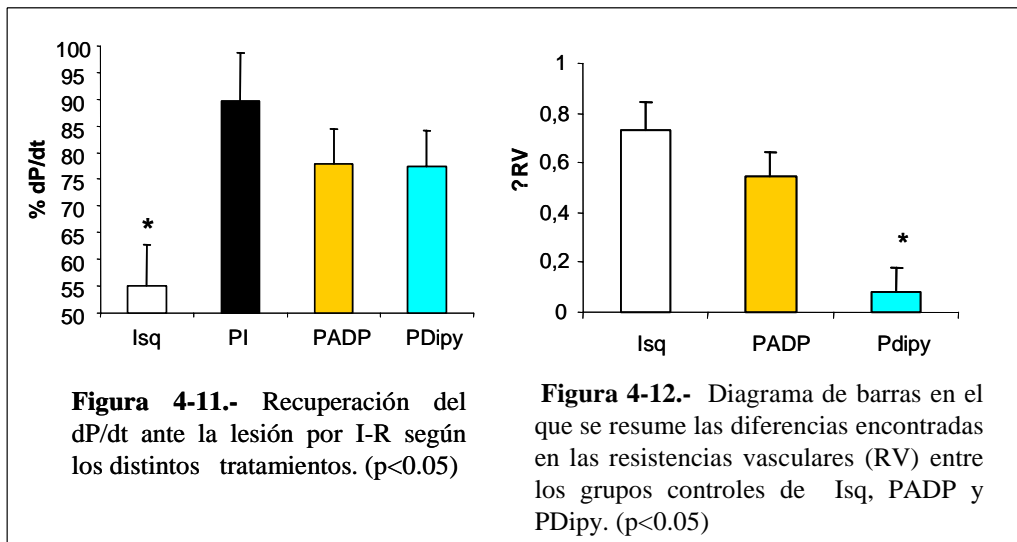
Comparación y análisis de los datos

El análisis de los resultados obtenidos de los dos grupos de preconditionamiento farmacológico muestran unas diferencias significativas en cuanto a la presión diastólica final frente al grupo de PI y en la recuperación final de la dP/dt respecto al grupo de isquemia, también las hay en cuanto a las presiones de perfusión finales entre los grupos de preconditionamiento y el grupo de isquemia ($p < 0,05$).

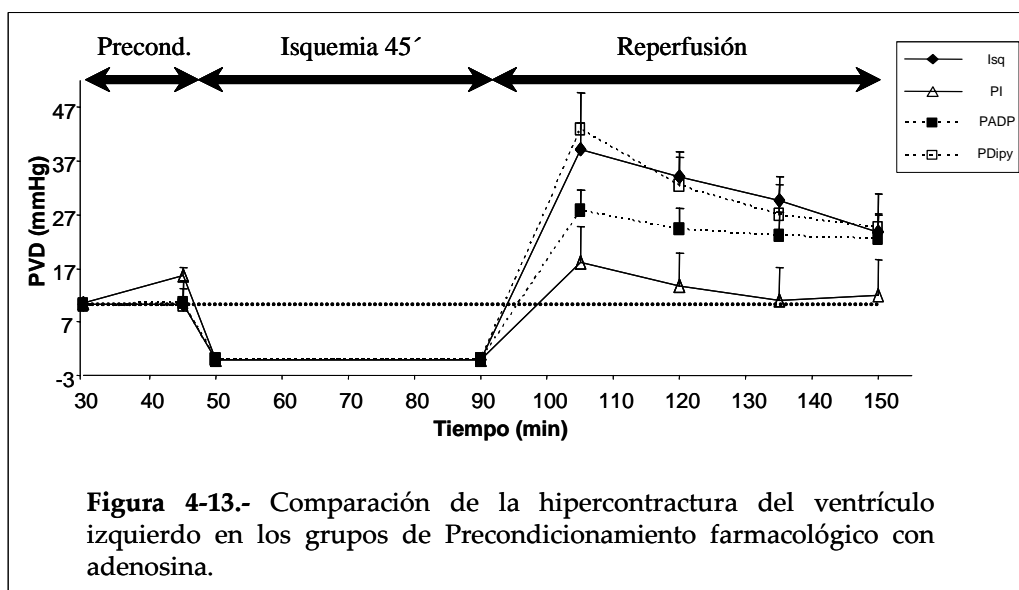
| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dP/dt | %Recup. |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control isq45min,n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |
| PI,n=10 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PADP,n=9 | 22,56±6,68* | 115,89±11,44 | 3,40±0,30* | 1114,68±58,84 | 76,76±4,87 |
| PDipy,n=7 | 24,43±3,31* | 81,86±3,17 | 2,54±0,05 | 1218,64±96,53 | 77,82±6,45 |

Ambos grupos de tratamiento farmacológico han resultado efectivos a la hora de proteger la función contráctil del corazón ante el daño por I-R como se observa en la recuperación de la dP/dt (fig 4-11).

Por otro lado, la adenosina aplicada de forma exógena ha fallado en mejorar las resistencias vasculares con respecto al grupo de isquemia (fig 4-12).



En cuanto a la hipercontractura ventricular, ambos grupos de preconditionamiento farmacológico con adenosina tanto exógena como endógena fallaron a la hora de prevenirla tras la lesión por I-R, al igual que ocurre en el grupo control de ischemia (fig 4-13).



En resumen, ambos grupos de tratamiento farmacológico mejoran la función del corazón tras la lesión por I-R como se demuestra en la recuperación de la dP/dt, siendo mejor el tratamiento con dipyridamol ya que este mejora la PPC y las RV debido seguramente a su efecto vasodilatador, sin embargo no llegan a ser tan buenos como el PI debido a que ninguno de los dos

tratamientos farmacológicos mejora la hipercontractura ventricular.

5.3.- Ausencia de efectos sumatorios de la protección por el PI y el preconditionamiento farmacológico con adenosina, exógena o endógena

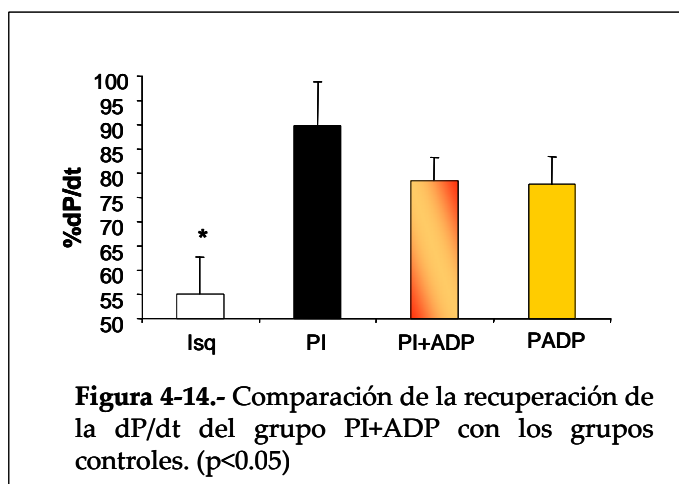
En el siguiente apartado hemos comprobado los efectos cardioprotectores de la adenosina aplicada de manera exógena o endógena simultáneamente con el PI.

Grupo 5.- Aplicación de Adenosina junto con el Precondicionamiento isquémico (PI+ADP, n=6):

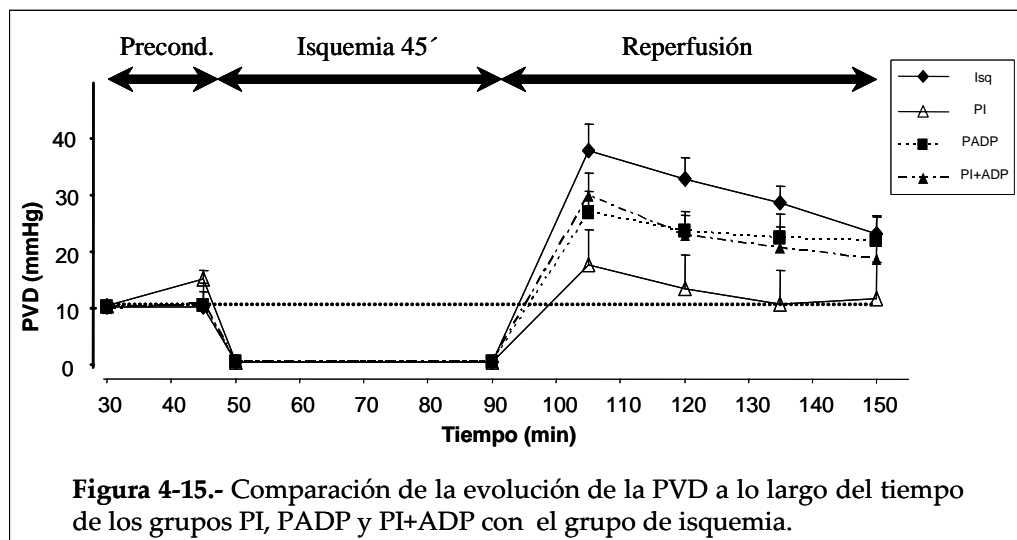
Este protocolo consiste en aplicar adenosina 5 minutos previos a la realización de los 5 minutos de isquemia y durante los últimos 5 minutos de reperusión del PI.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperusión | |
|--------|----------------|----------|-----|-----|----------|------------|-----|
| | | 5' | 5' | 5' | | 5' | 60' |
| PI+ADP | | ADP | Isq | ADP | Isquemia | ADP | |

Al aplicar de forma conjunta los dos tratamientos hemos observado que no había mejoría en la dP/dt ($78,47 \pm 4.78 \%$) (fig 4-14) respecto a los grupos de PI y de PADP.



Tampoco hay aumento de las RV ni de la PPC, aunque si que aparece hipercontractura quizás provocada por el ADP (fig 4-15).



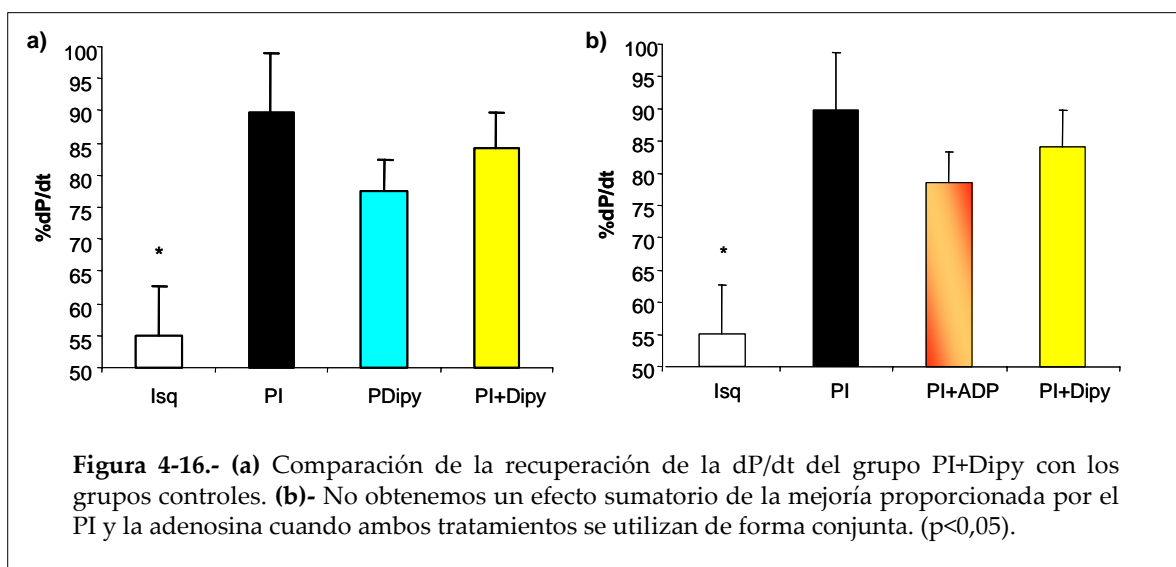
Podemos comprobar, según estos resultados, que no hay un efecto sumatorio de la protección proporcionada por la combinación del PI con el tratamiento farmacológico con adenosina exógena.

Grupo 6.- Efecto de Dipiridamol junto con el acondicionamiento isquémico (PI+Dipy, n=9):

Con el dipiridamol llevamos a cabo el mismo procedimiento que en el caso de la aplicación de adenosina exógena: Se ha aplicado el dipiridamol a una concentración similar a la que utilizamos como acondicionante ($4 \mu\text{M}$) a la vez que hemos realizado el PI con 5 minutos de isquemia y 5 de reperusión. La infusión del dipiridamol se inició a los 5 minutos antes de la isquemia del PI.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperfusión | |
|---------|----------------|----------|-----|------|----------|-------------|-----|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 5' | 60' |
| PI+Dipy | | Dipy | isq | Dipy | Isquemia | Dipy | |

El análisis de los datos muestra, como se resume en la figura 4-16 (b), que al igual que en el caso del ADP y comparando con el grupo control de PI, no hay efecto sumatorio de protección cardiaca.



La comparación de los dos grupos de los tratamientos simultaneos con el de PI resumidos en la siguiente tabla 4-5, muestran que ni el ADP ni el Dipyridamol aplicados con el PI han causado una mejoría superior a la del grupo de PI, incluso la recuperación fue algo menor, aunque no de forma significativa.

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dP/dt | %Recup. |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-------------|
| Control Isq, n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |
| PI, n=10 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96 |
| PI+ADP, n=6 | 19,17±3,76 | 95,67±4,80 | 2,85±0,19 | 1.433,50±100,40 | 78,47±4,78 |
| PI+Dipy, n=7 | 19,44±5,03 | 78,42±2,19 | 2,29±0,12 | 1.490,43±76,33 | 81,73±4,52 |

5.4.- La adenosina lleva a cabo su papel protector mediante su interacción con los receptores purinérgicos para la misma A₁, A₂ {A_{2a} y A_{2b}} y A₃.

Para comprobar que tanto la adenosina proporcionada de forma exógena en el perfundido como la producida por el propio corazón, que impedimos que se lave en la perfusión con dipiridamol, actúan a través de los receptores purinérgicos para la misma, utilizamos un inhibidor inespecífico de éstos, el 8-p-sulfofenilteofilina (SPT) que penetra de forma limitada en la célula. El SPT actúa como antagonista del receptor de la adenosina. Para comprobarlo realizamos las siguientes experiencias:

Grupo 7.- Precondicionamiento Isquémico en presencia del 8-p-sulfofenilteofilina (PI+SPT, n=7):

Durante los 5 primeros minutos de la fase de PI infundimos SPT a una concentración final en el tejido coronario de 10 µM al igual que durante los 5 minutos de reperfusión del PI, previo al periodo de isquemia de 45'. Al inicio de la reperfusión se administró de nuevo SPT durante 5 minutos.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperusión | |
|--------|----------------|----------|-----|-----|----------|------------|-----|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 5' | 60' |
| PI+SPT | | SPT | Isq | SPT | Isquemia | SPT | |

En este grupo se ha observado que el PI en presencia del inhibidor SPT sigue mostrando una mejoría significativa en los parámetros hemodinámicos frente a isquemia. La recuperación de la función contráctil del corazón ha sido menor pero no significativa comparada con el grupo PI (Fig. 4-17).

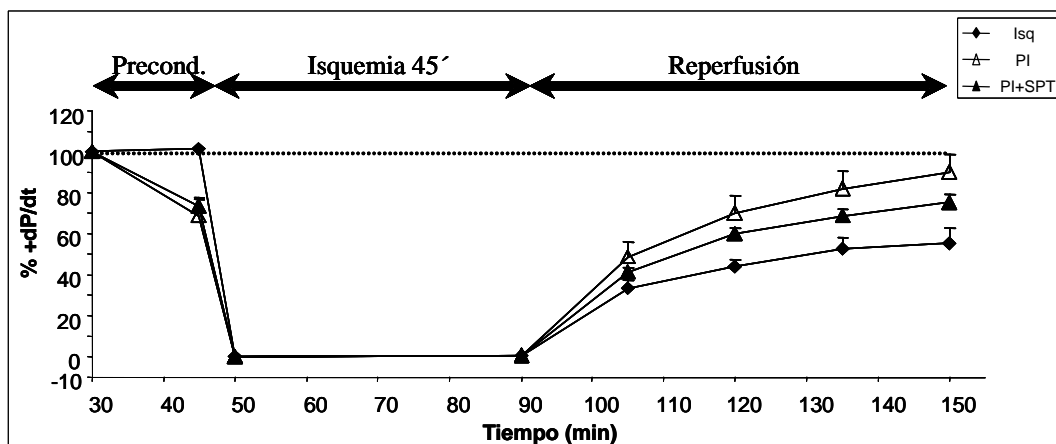


Figura 4-17. Comparación de la recuperación de la dP/dt al inhibir durante el PI los receptores para la adenosina con los grupos controles de isquemia y PI.

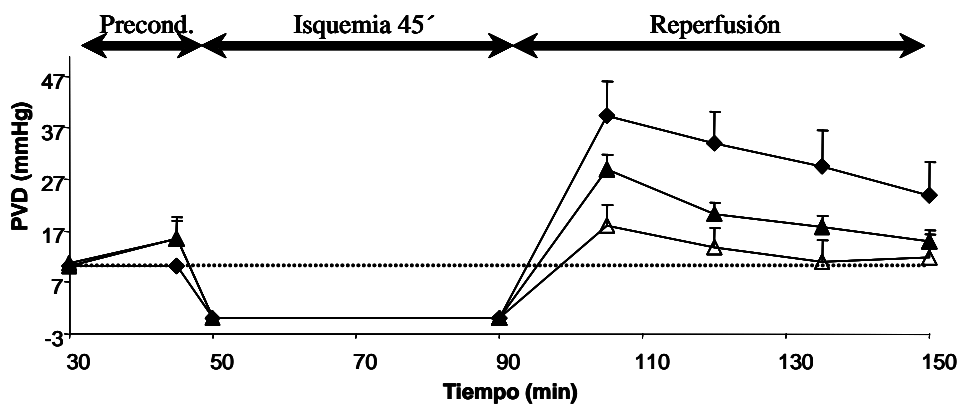


Figura 4-18. Comparación de la evolución de la hipercontractura durante el experimento del grupo de PI+SPT con los dos grupos controles.

Por otro lado se ha visto un pequeño aumento de la PVD (fig. 4-18) también no significativo al compararlo con el grupo control de PI pero si con el

grupo de isquemia. Los datos se resumen en la tabla 4-6.

Con estos datos determinamos que la vía de protección proporcionada por la adenosina no es la única vía por la que el PI lleva a cabo su efecto beneficioso ante la lesión por I-R, aunque si participa como se puede observar en el pequeño empeoramiento no significativo de los beneficios del PI al inhibir los receptores para la adenosina (tabla 4-6).

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dP/dt | %Recup. |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control Isq ,n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |
| PI, n=10 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PI+SPT,n=9 | 14,89±2,18 | 106,78±10,87 | 3,58±0,54 | 1293,78±61,82 | 75,66±3,90 |

Grupo 8.- Precondicionamiento con ADP en presencia de SPT (PADP+SPT, n=7):

Tras la fase de estabilización se infundió SPT a una concentración final de 10 μ M durante 5 minutos y a continuación se administraron conjuntamente ADP y SPT en las mismas concentraciones anteriores durante 10 minutos, con objeto de comprobar que, al inhibir los receptores de ADP, ésta no puede llevar a cabo su papel beneficioso en el precondicionamiento. Tras la fase de isquemia crónica se infundieron, de nuevo conjuntamente, la adenosina con el inhibidor de los receptores para la misma durante los primeros 5 minutos.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | Isquemia | Reperusión | |
|----------|----------------|----------|---------|----------|-------------|-----|
| | 30' | 5' | 10' | 45' | 5' | 60' |
| PADP+SPT | | SPT | SPT+ADP | Isquemia | SPT +ADP | |

En este caso hemos observado que al inhibir los receptores para la adenosina, la protección proporcionada por el ADP ante la lesión por I-R, ha

quedado eliminada completamente como se puede observar en la figura 4-19. Los parámetros hemodinámicas han mostrado un empeoramiento en general comparado con el preconditionamiento con ADP como viene resumido en la tabla 4-7.

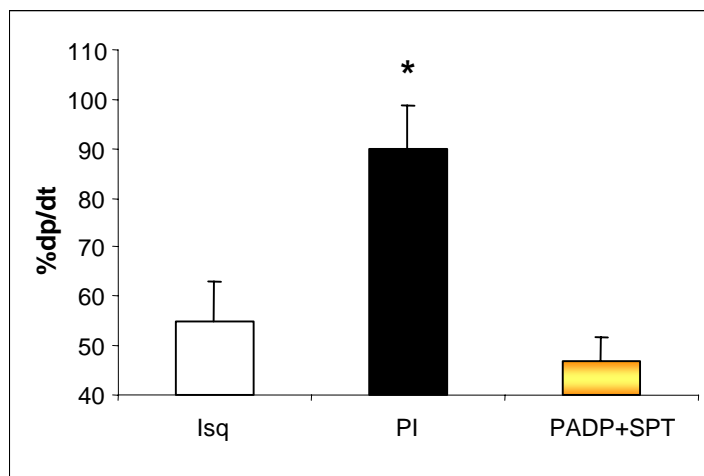


Figura 4-19.- Comparación de la recuperación de la función contráctil del grupo de preconditionamiento farmacológico con ADP más el inhibidor de receptores purinérgicos SPT con los dos grupos controles de isquemia y PI. ($p < 0,05$).

Grupo 9.- Precondicionamiento con Dipyridamol y SPT (PDipy+SPT, n=7):

En este grupo, tras la fase de estabilización se infundió, en primer lugar, SPT durante 5 minutos y, a continuación simultáneamente con el dipyridamol durante diez minutos, ambos a las concentraciones previamente descritas.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | Isquemia | Reperusión | |
|------------|----------------|----------|-----------|----------|------------|-----|
| | 30' | 5' | 10' | 45' | 5' | 60' |
| PDipy.+SPT | | SPT | SPT +Dipy | Isquemia | SPT+ Dipy | |

En este grupo, por el contrario, hemos observado que aunque la protección disminuye, no fue abolida del todo como ocurrió cuando utilizamos el ADP aportado de forma exógena (% recuperación $dp/dt = 75,42 \pm 5,59$ en el grupo PDipy+SPT versus al $46,96 \pm 4,72$ en el grupo PADP+SPT; ver tabla 4-7).

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dP/dt | %Recup. |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control Isq ,n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17* | 56,62±6,91* |
| PI, n=10 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PI+SPT,n=9 | 14,89±2,18 | 106,78±10,87 | 3,58±0,54 | 1293,78±61,82 | 75,66±3,90 |
| PADP+SPT,n=7 | 32,86±4,18* | 85,71±4,66 | 2,51±0,16 | 822,81±85,78* | 46,96±4,72* |
| PDipy+SPT,n=7 | 12,87±5,91 | 114,24±4,35 | 4,08±0,10 | 1080,28±85,65 | 75,42±5,59 |

La figura 4-20 muestra un resumen del % de recuperación de la función contráctil de los grupos PI, PI+SPT, PADP+SPT y PDipy+SPT y determina que la inhibición de los receptores purinérgicos no previene la protección miocárdica por Dipyridamol. Esto puede ser por la diferencia de metabolismo de la adenosina exó- o endógena o bien por el efecto no específico del Dipyridamol sobre la fosfodiesterasa (149)

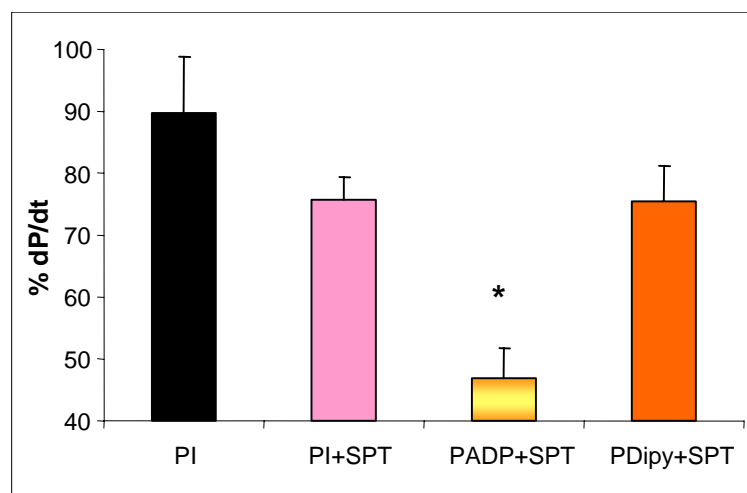


Fig 4-20. El SPT inhibe por completo la protección proporcionada por la Adenosina, pero no la del PI o el Dipyridamol ($p < 0,05$).

Estos datos indican que la ruta de señalización que proporciona la protección, activada por la adenosina, parece que no es la vía principal por la que el PI lleva a cabo su papel protector, pero sí que interviene en un cierto

modo en la protección. Lo más importante es que la adenosina endógena es más efectiva que la administrada de forma exógena.

5.5.- Los canales de K_{ATP} son fundamentales en la protección proporcionada por el PI y por la adenosina.

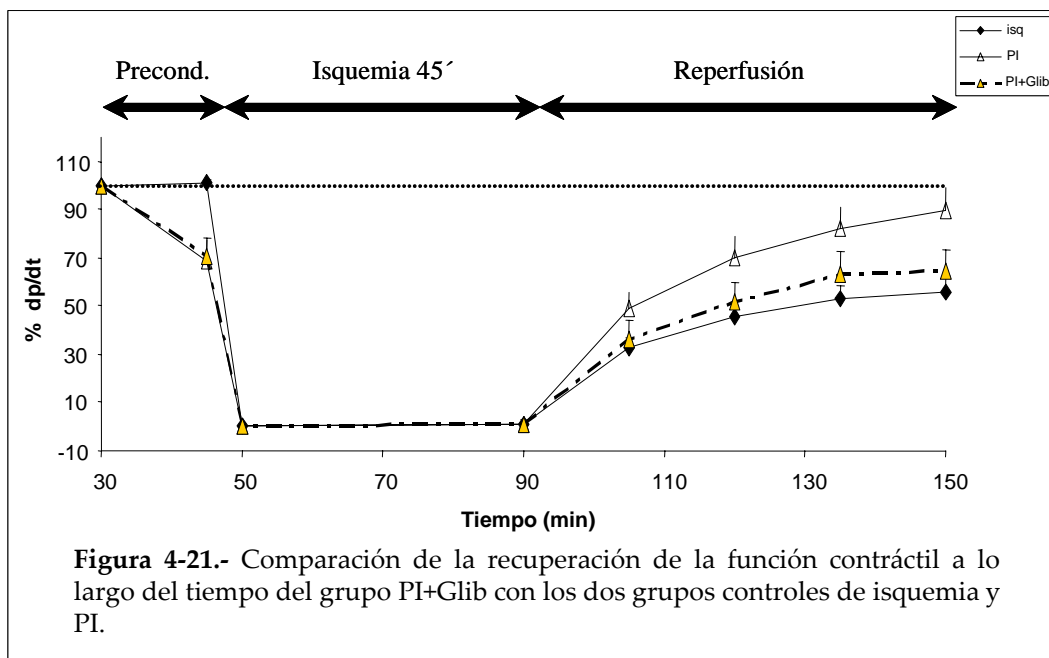
Como comentamos en el apartado de introducción, en uno de los primeros trabajos proponen que la mejoría proporcionada por la adenosina ante el daño por I-R está mediada por los canales K_{ATP} presentes tanto en el sarcolema como en las mitocondrias (117). Según este trabajo, la disminución del tamaño del área infartada se debería a la activación de los canales K_{ATP} de la mitocondria, mientras que la recuperación funcional del miocardio estaría modulada por los canales K_{ATP} presentes en el sarcolema. A continuación quisimos comprobar si los canales de K_{ATP} , que se han propuesto como últimos efectores de la protección proporcionada por el PI (82, 83, 110), tenían dicho papel en nuestro modelo experimental. Para ello realizamos los siguientes experimentos:

Grupo 10.- *Precondicionamiento Isquémico junto con la Glibenclamida, inhibidor de los canales de K_{ATP} (PI+Glib, n=14):*

Ante un estímulo preconditionante, los canales K_{ATP} se abren provocando una salida de iones K^+ de la célula lo que hace que se produzca un acortamiento del potencial de acción y que, por otro lado, se evite la sobrecarga de calcio del miocardio. Al utilizar inhibidores de estos canales, como la glibenclamida, evitamos el efecto protector de los mismos. Para comprobarlo realizamos un grupo experimental en el que durante los 5 primeros minutos de la fase de PI infundimos glibenclamida a una concentración final en el corazón de 3 μ M y durante los 5 minutos de reperusión del PI, previo al periodo de isquemia de 45 minutos.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | | Isquemia | Reperusión | |
|---------|----------------|----------|-----|------|----------|------------|-----|
| | 30' | 5' | 5' | 5' | 45' | 5' | 60' |
| PI+Glib | | Glib | Isq | Glib | Isquemia | Glib | |

Siguiendo este protocolo hemos visto que de forma general han empeorado los parámetros hemodinámicos del corazón como se resume en la tabla 4-8 así como se ha inhibido la recuperación de la dp/dt del PI al utilizar la glibenclamida (Fig. 4-21), con lo que confirmamos que en nuestro modelo experimental los canales K_{ATP} juegan un papel importante en la protección proporcionada por el PI.



La glibenclamida impide también el efecto protector del PI sobre la hipercontractura del ventrículo izquierdo e incrementa las resistencias vasculares de manera similar a la isquemia (tabla 4-8).

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dPdt | %Recup. |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|---------------|-------------|
| Control Isq ,n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26* | 3,63±0,35* | 931,97±122,17 | 56,62±6,91 |
| PI, n=10 | 11,9±4,49 | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PI+Glib,n=14 | 28,64±3,72* | 117,87±5,22* | 4,10±0,17* | 937,84±82,04 | 64,70±7,07 |

Para comprobar que estos canales son también esenciales para la protección proporcionada por la adenosina llevamos a cabo los siguientes experimentos:

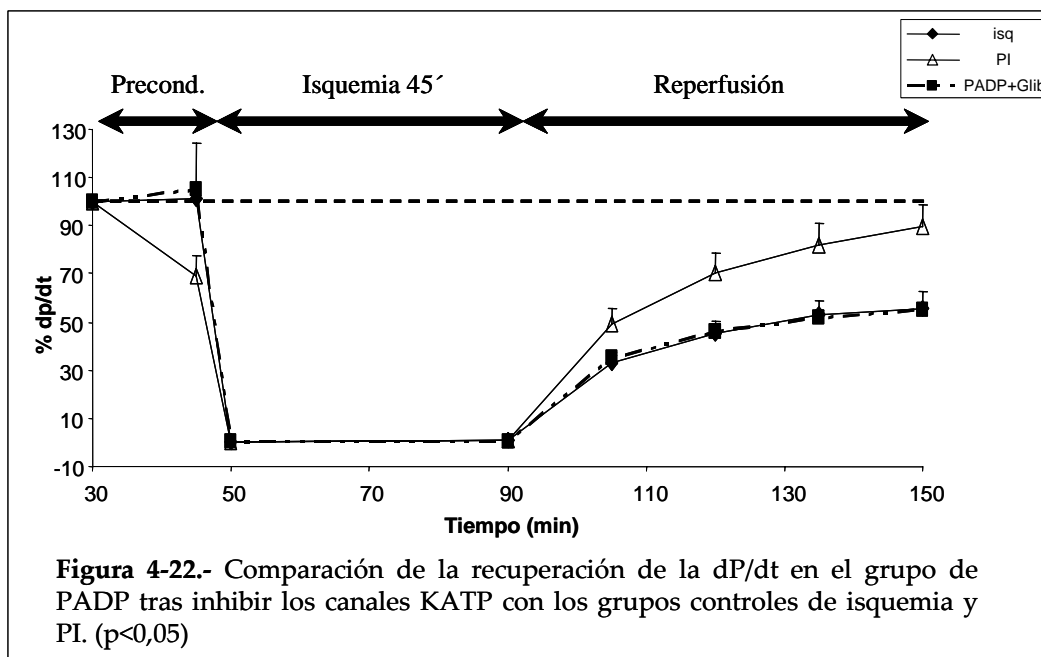
Grupo 11.- *Precondicionamiento con Adenosina y Glibenclamida (PADP+Glib, n=10):*

Para comprobar si el papel protector que ejerce la adenosina exógena se ve afectado al inhibir los canales K_{ATP} , llevamos a cabo el siguiente protocolo: tras la fase de estabilización, se procedió a la infusión de glibenclamida unos 5 minutos, a una concentración final de 3 μ M, y a continuación se infundió conjuntamente ADP, en la misma concentración anterior, durante 10 minutos más. Tras el periodo de isquemia se volvió a infundir conjuntamente durante los 5 primeros minutos de la reperfusión.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | Isquemia | Reperfusión | |
|------------|----------------|----------|--------------|----------|--------------|-----|
| | 30' | 5' | 10' | 45' | 5' | 60' |
| PADP.+Glib | | Glib | Glib +ADP | Isquemia | Glib+ ADP | |

Efectivamente observamos que al inhibir los canales de K_{ATP} se pierde la protección proporcionada por el ADP aportado de forma exógena (% recuperación dP/dt = 55,09 \pm 2,87 frente al 76,76 \pm 4,87 en el grupo de PADP: Ver figura 4-22) Por lo tanto parece que estos canales son fundamentales para que la

adenosina lleve a cabo su papel protector del miocardio ante la lesión por I-R.



En cuanto a la hipercontractura, la glibenclamida no ha afectado a este parámetro en este grupo ya que, como vimos antes, la adenosina falló a la hora de evitarla. Por otra parte, la PPC en este caso ha empeorado de forma significativa respecto a PI. En el caso de las resistencias vasculares siguen siendo altas al igual que en el grupo de isquemia (ver tabla 4-9).

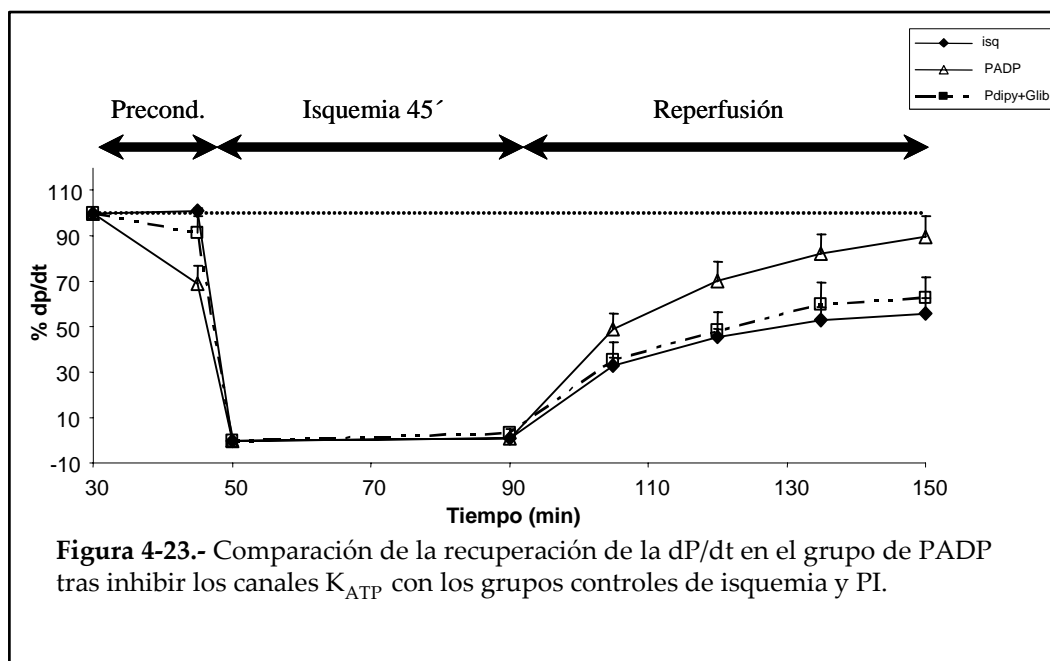
| | PVD150' | PPC150' | RV150' | dPdt | %Recup. |
|-------------------|------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| | mmHg | mmHg | mmHg*min/ml | | |
| Control Isq, n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26 | 3,63±0,35 | 931,97±122,17 | 56,62±6,91 |
| PI, n=10 | 11,9±4,49* | 93,6±5,94* | 2,83±0,208* | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PI+Glib, n=14 | 28,64±3,72 | 117,87±5,22 | 4,10±0,17 | 937,84±82,04 | 64,70±7,07 |
| PADP+Glib, n=10 | 23,80±3,21 | 133,30±5,31 | 4,67±0,22 | 837,61±113,19 | 54,85±2,88 |
| PDipy+Glib, n=12 | 33,46±5,92 | 148,09±10,62 | 4,77±0,32 | 871,96±98,04 | 62,91±8,91 |

Grupo 12: Precondicionamiento con Dipyridamol y Glibenclamida (PDipy+Glib, n=12):

En este caso, hemos examinado el papel de la adenosina endógena en presencia del inhibidor de los canales K_{ATP} . Para ello, hemos llevado a cabo el siguiente protocolo: tras la fase de estabilización, se procedió a la infusión de glibenclamida unos 5 minutos, a una concentración final de $3 \mu\text{M}$, y a continuación se infundió conjuntamente dipyridamol ($4 \mu\text{M}$) durante 10 minutos. Tras el periodo de isquemia se volvió a infundir conjuntamente durante los 5 primeros minutos de la reperfusión.

| Grupo | Estabilización | Precond. | | Isquemia | Reperusión |
|-------------|----------------|----------|------------|----------|------------|
| | 30' | 5' | 10' | 45' | 60' |
| PDipy.+Glib | | Glib | Dipy +Glib | Isquemia | Dipy +Glib |

Al igual que con la adenosina exógena, hemos observado que hay una disminución en la recuperación de la función contráctil como se muestra en la figura 4-23 y un empeoramiento de los distintos parámetros hemodinámicas como se detalla en la tabla 4-9.



Resumiendo este apartado, hemos visto que al bloquear los canales de K_{ATP} , observamos una inhibición de la protección (Fig 4-24) proporcionada por los distintos grupos de experimentación, con lo que demuestra que los canales de K_{ATP} juegan un papel fundamental en el o los procesos que se activan para la protección del corazón ante la lesión por I-R.

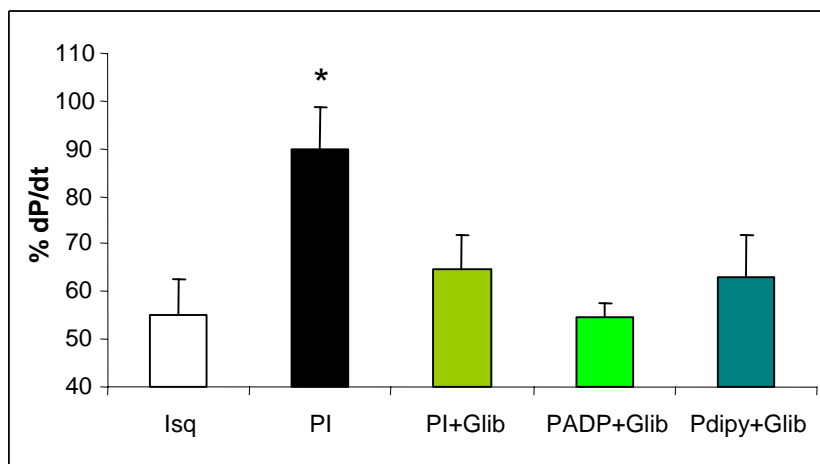


Fig 4-24. La Glibenclamida abole de forma significativa, con respecto al PI, la protección proporcionada por todos los tratamientos. $P < 0,05$

5.6.- En presencia del PI, la adenosina revierte el efecto inhibitor de la glibenclamida.

El objetivo de este apartado es examinar el efecto de la adenosina sobre el PI y en presencia de la inhibición de los canales K_{ATP} . Cabía esperar que no hubiera mejoría en la función contráctil de los corazones ya que hemos visto que los canales de K_{ATP} son fundamentales para la protección miocárdica.

Grupo 13: Precondicionamiento Isquémico junto con ADP y con la Glibenclamida (PI+ADP+Glib, n=7):

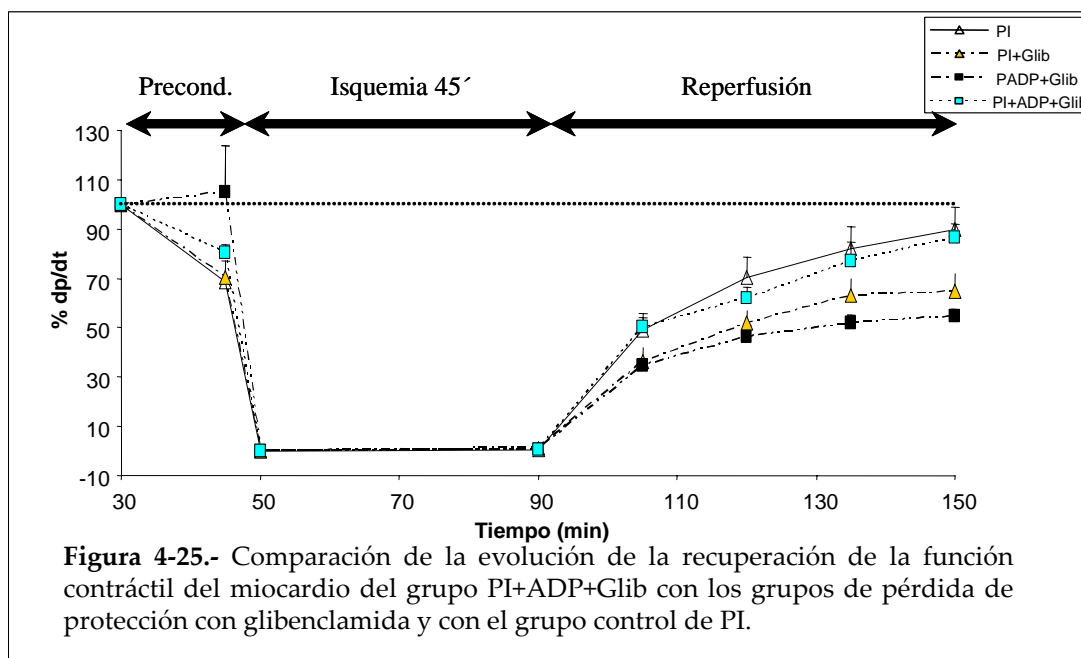
Se infundió a los corazones de este grupo, ADP en las mismas condiciones que en el grupo 5, pero con la diferencia de que a la vez se infundió glibenclamida $3 \mu\text{M}$ a los corazones.

| Grupo | Estabilización | PI | | | Isquemia | Reperusión | |
|-------------|----------------|--------------|-----|--------------|----------|--------------|-----|
| | | 5' | 5' | 5' | | 5' | 60' |
| PI+ADP+Glib | | Glib +ADP | Isq | Glib +ADP | Isquemia | Glib +ADP | |

Hemos observado que la inhibición de los canales de K_{ATP} no elimina la protección proporcionada por el PI junto con la de la adenosina, como se demuestra por la recuperación de los distintos parámetros hemodinámicos (Tabla 4-10).

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dPdt | %Recup. |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|
| Control Isq n=10 | 23,8±5,69* | 116±7,26 | 3,63±0,35* | 931,97±122,17 | 56,62±6,91 |
| PI, n=10 | 11,9±4,49* | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PI+Glib,n=14 | 28,64±3,72 | 117,87±5,22 | 4,10±0,17* | 937,84±82,04 | 64,70±7,07 |
| PADP+Glib,n=10 | 23,80±3,21 | 133,30±5,31 | 4,67±0,22 | 970,89±67,81 | 55,10±2,87 |
| PI+ADP+Glib,n=7 | 7,71±3,48* | 96,00±3,74 | 2,86±0,12 | 1323,59±127,07 | 85,46±5,20* |

Curiosamente hay una buena recuperación de la protección proporcionada por el PI junto con la administración exógena de adenosina como se demuestra en la recuperación de la función contráctil en presencia de la glibenclamida (Fig 4-25 y tabla 4-10) así como la ausencia de hipercontractura y el mantenimiento de las resistencias vasculares (tabla 4-10).



Esto demuestra que pueda existir otro (s) efectores paralelos a los canales K_{ATP} que estarían activados por la adenosina durante el PI.

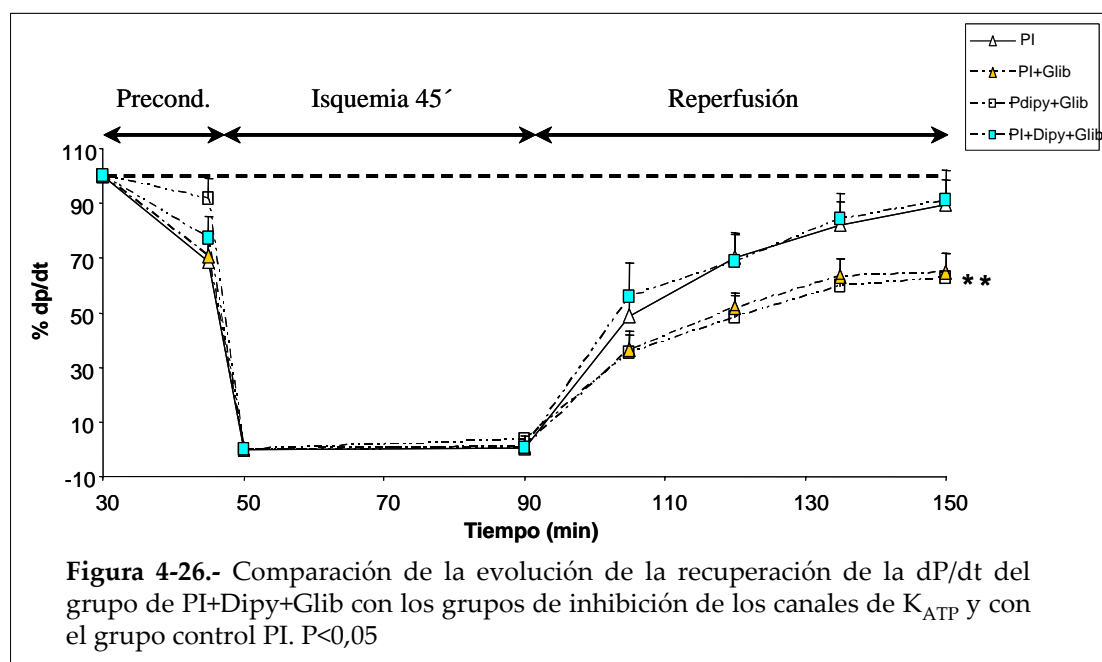
Grupo 14: Precondicionamiento Isquémico más Dipyridamol más Glibenclamida (PI+Dipy+Glib, n=7):

Para corroborar las anteriores observaciones, hemos examinado si la adenosina endógena tiene el mismo efecto que el ADP realizando el siguiente experimento: Se infundió a los corazones de este grupo, Dipyridamole (4 μ M) en las mismas condiciones que en el grupo 6, pero con la diferencia de que a la vez se infundió glibenclamida 3 μ M a los corazones.

| Grupo | Estabilización | PI | | | Isquemia | Reperfusion | |
|--------------|----------------|---------------|-----|---------------|----------|---------------|-----|
| | | 5' | 5' | 5' | | 5' | 60' |
| PI+Dipy+Glib | | Dipy +Glib | Isq | Dipy +Glib | Isquemia | Dipy+ Glib | |

| Tabla 4-11. Comparación Datos Hemodinámicos Grupo PI+Dipy+Glib | | | | | |
|--|-------------|--------------|-------------|----------------|-------------|
| | PVD150' | PPC150' | RV150' | dPdt | %Recup. |
| | mmHg | mmHg | mmHg*min/ml | | |
| Control Isq n=10 | 23,8±5,69 | 116±7,26 | 3,63±0,35* | 931,97±122,17 | 56,62±6,91 |
| PI, n=10 | 11,9±4,49* | 93,6±5,94 | 2,83±0,208 | 1366,43±98,8 | 89,82±8,96* |
| PI+Glib n=14 | 28,64±3,72 | 117,87±5,22 | 4,10±0,17* | 937,84±82,04 | 65,06±7,09 |
| PDipy+Glib n=12 | 33,46±5,92 | 148,09±10,62 | 4,77±0,32* | 916,04±99,77 | 65,62±8,79 |
| PI+Dipy+Glib n=7 | 12,00±4,38* | 84,14±6,94 | 2,60±0,13 | 1274,97±129,78 | 82,55±5,35* |

Al igual que en el grupo anterior, hemos observado que la inhibición de los canales de K_{ATP} no elimina la protección proporcionada por el PI junto con la del Dipyridamol, como se demuestra por la recuperación de los distintos parámetros hemodinámicos (Tabla 4-11) y la función contráctil como se representa en la figura 4-26.



En definitiva, hemos determinado que la inhibición de los canales K_{ATP} puede tener una participación diferencial según el protocolo de protección seguido y según este o no presente la adenosina como viene mostrado en la figura 4-27. Esto puede suponer que varias vías de protección se ponen en

marcha para proporcionar el efecto beneficioso del PI. Parece que no son vías sumatorias, sino complementarias que, y aunque los canales de K_{ATP} son los principales mediadores y efectores, hay otras vías implicadas las cuales, en ausencia de la actividad de éstos pueden ser potenciadas por agonistas disparadores del efecto protector del PI.

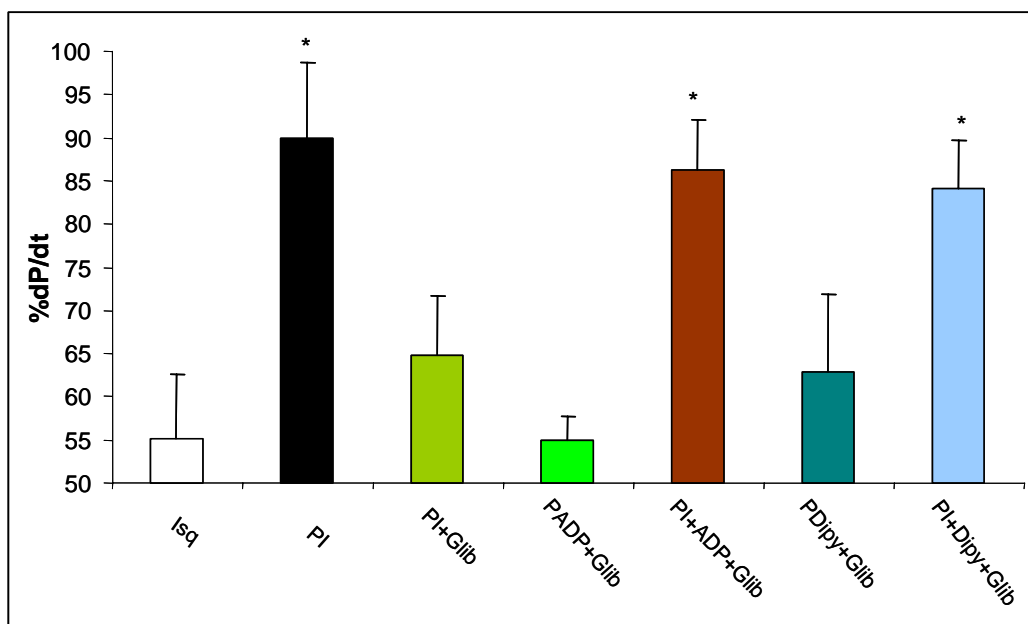


Figura 4-27.- Efecto sumatorio de los tratamientos de PI de forma conjunta con la adenosina y el dipyridamol respectivamente, puesta de manifiesto al inhibir los canales K_{ATP} . ($P < 0,05$)

5.7.-Otras vías de protección miocárdica: Papel de la iPLA₂ en la protección endógena del miocardio.

Una vez que hemos determinado que hay otras vías además de la adenosina que se pueden potenciar como mecanismo endógeno de protección, nosotros nos hemos interesado en la fosfolipasa A₂ y en concreto en la isoforma independiente de Ca^{2+} (iPLA₂) que está descrito que aumenta su actividad durante la isquemia miocárdica ⁽¹⁵⁰⁾. La iPLA₂ es una de las lipasas responsables de la liberación de ácidos grasos de las membranas (ácido araquidónico, lisophospholipidos) durante la isquemia crónica que causan graves daños durante la reperfusión del órgano ⁽¹⁵¹⁾.

El objetivo de este apartado es demostrar que al inhibir la iPLA₂ se impide la liberación de los ácidos grasos, sobre todo del ácido araquidónico, responsable en parte de los daños del miocardio después de un periodo de isquemia. Para ello se realizó el siguiente experimento:

Grupo 15: Precondicionamiento con Bromoenol lactona (PBel, n=5):

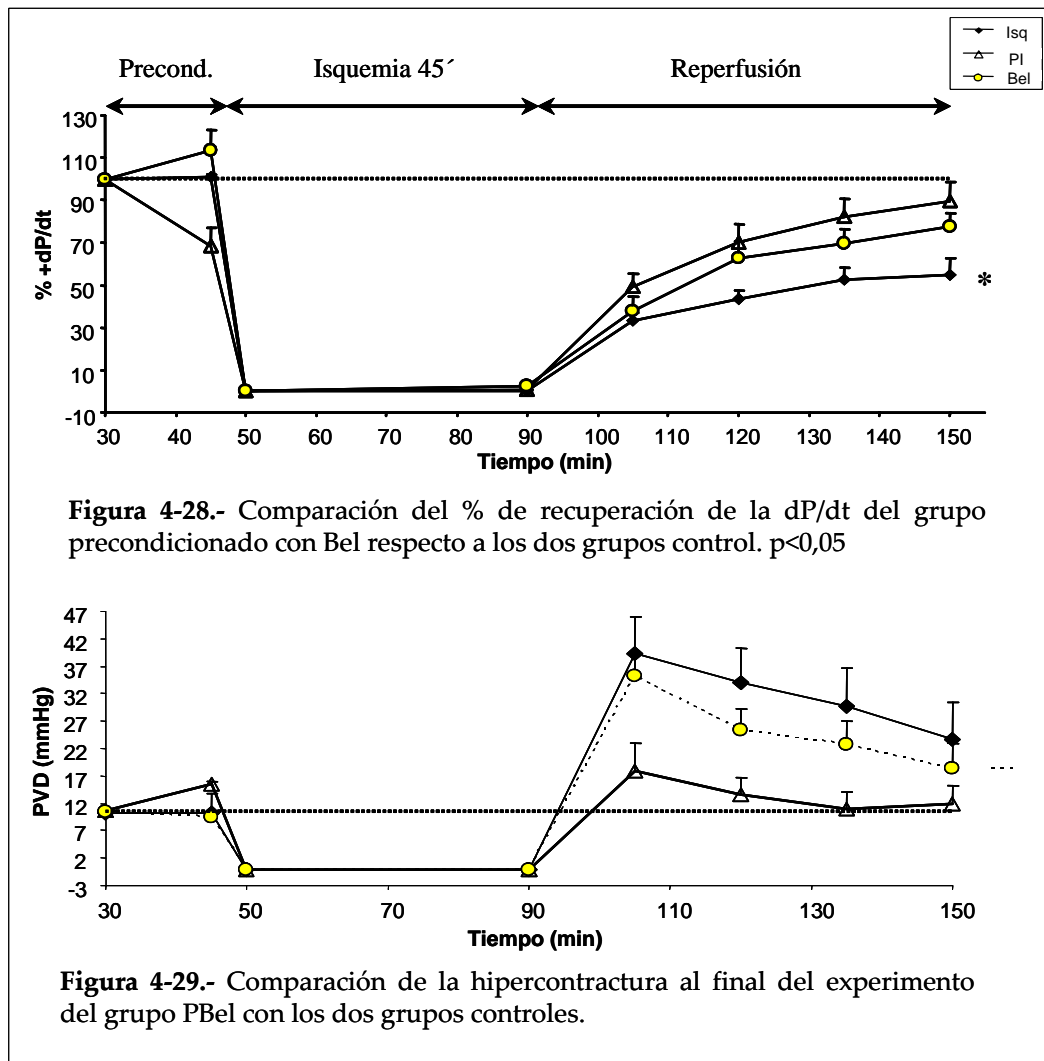
Para inhibir la iPLA₂, hemos usado el bromoenol lactona (Bel) un sustrato suicida altamente selectivo para la iPLA₂ frente a las demás fosfolipasas ⁽¹⁵²⁾. Se infundió a los corazones 5 μ M Bel durante 10 minutos previos a la isquemia prolongada y durante 3 minutos iniciales de la reperfusión.

| Grupo | Estabilización | PI | | Isquemia | Reperfusión |
|-------|----------------|----|-----|----------|-------------|
| | 30' | 5' | 10' | 45' | 60' |
| PBel | | | Bel | Isquemia | Bel |

Los datos hemodinámicos de este grupo experimental que se resumen en la tabla 4-12 muestran que habido una recuperación significativa de la contractilidad del corazón comparado con el grupo de isquemia; además se observó un mantenimiento de la PPC quizás por la relajación de la vasculatura coronaria debido a la inhibición de la iPLA₂.

| | PVD150' mmHg | PPC150' mmHg | RV150' mmHg*min/ml | dP/dt | %Recup. |
|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Control Isq, n=10 | 23,8 \pm 5,69* | 116 \pm 7,26* | 3,63 \pm 0,35* | 931,97 \pm 122,17 | 56,62 \pm 6,91* |
| PI, n=10 | 11,9 \pm 4,49 | 93,6 \pm 5,94 | 2,83 \pm 0,208 | 1366,43 \pm 98,8 | 89,82 \pm 8,96 |
| PBel, n=14 | 18,47 \pm 3,31* | 78,45624 \pm 3,04 | 1,98 \pm 0,104 | 1365,31 \pm 307,62 | 77,63 \pm 5,99 |

El análisis de la dP/dt ha mostrado que la inhibición de la $iPLA_2$ mediante Bel induce una mejoría significativa ($77,63 \pm 5,99$ vs $55,04 \pm 7,71$ del grupo control de isquemia con una $p < 0,05$) de la contractilidad tras la isquemia (Fig 4-28). Sin embargo Bel no ha conseguido mejorar la hipercontractura del ventrículo izquierdo, como se muestra en el análisis de la PVD en la figura 4-29.

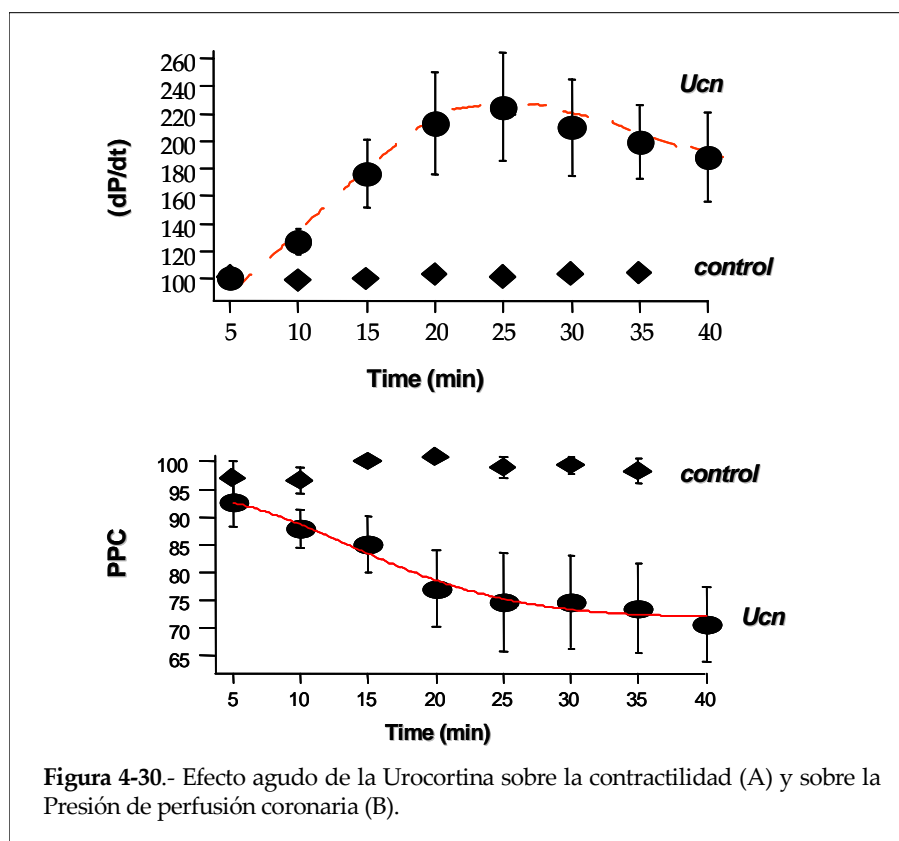


5.8.- Perspectivas en el estudio de nuevas rutas endógenas de protección cardiaca ante la lesión por isquemia-reperfusion.

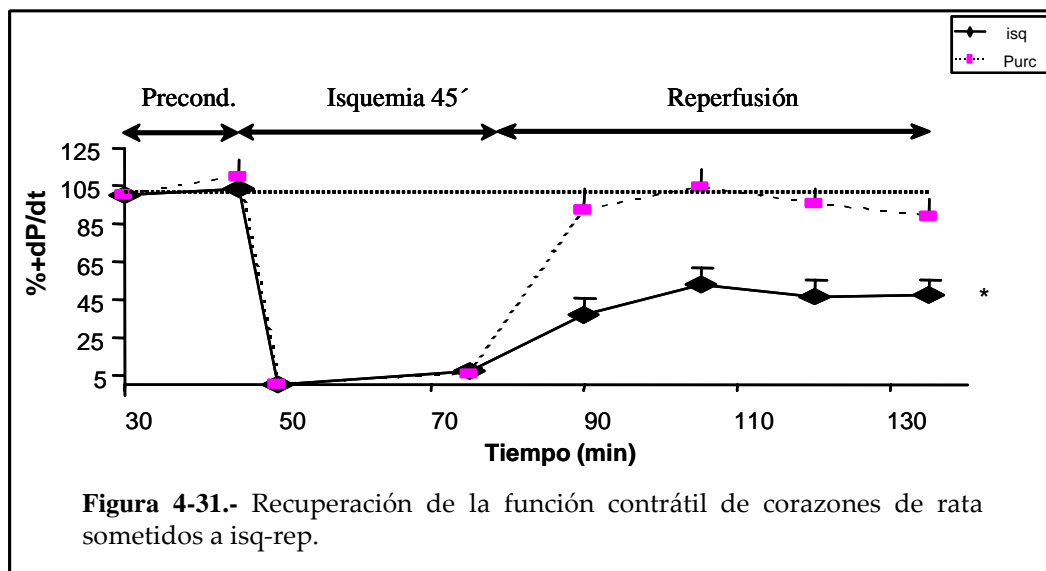
Actualmente estamos investigando nuevas rutas que se activan bajo situación de stress tal como el producido por isquemia y concretamente estamos examinando una nueva proteína cardioprotectora de la familia del

factor liberador de corticotropinas (CRF), denominada Urocortina (Ucn). Es un péptido de unos 40 aa que es producido y liberado tanto por el sistema nervioso central así como por otros órganos como el corazón. En particular en el territorio cardiaco se conoce que la Ucn tiene un potente papel vasodilatador y que, como hemos mostrado recientemente ⁽¹⁵³⁾, es debido a su regulación de la entrada de calcio a través de canales regulados por los reservorios en las células de músculo liso. Por otro lado se ha descrito que en el miocardio aumenta su expresión tras isquemia-reperfusión ⁽¹⁵⁴⁾, y que está implicada en la cardioprotección.

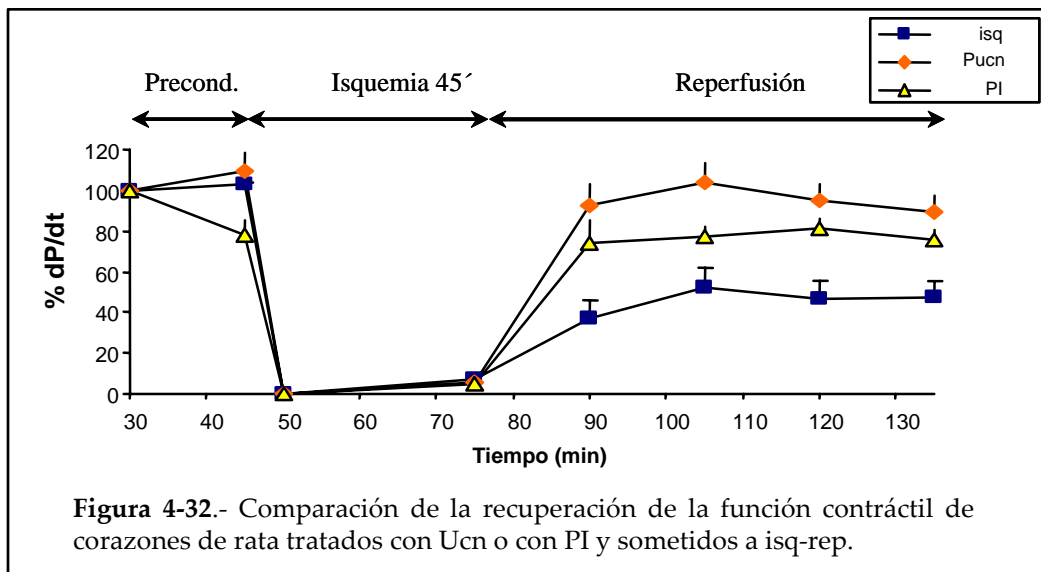
Como nuevo modelo animal estamos usando actualmente la rata por su fácil disponibilidad y los pocos cambios que hemos tenido que realizar en nuestro sistema para adaptarlo. En este nuevo modelo y hasta ahora, como datos preliminares, hemos comprobado que el tratamiento con Ucn afecta de forma aguda las funciones hemodinámicas del corazón ya que provoca una disminución de la PPC mientras que aumenta la contractilidad del miocardio como se observa por un aumento de la $+dP/dt$, figura 4-30.



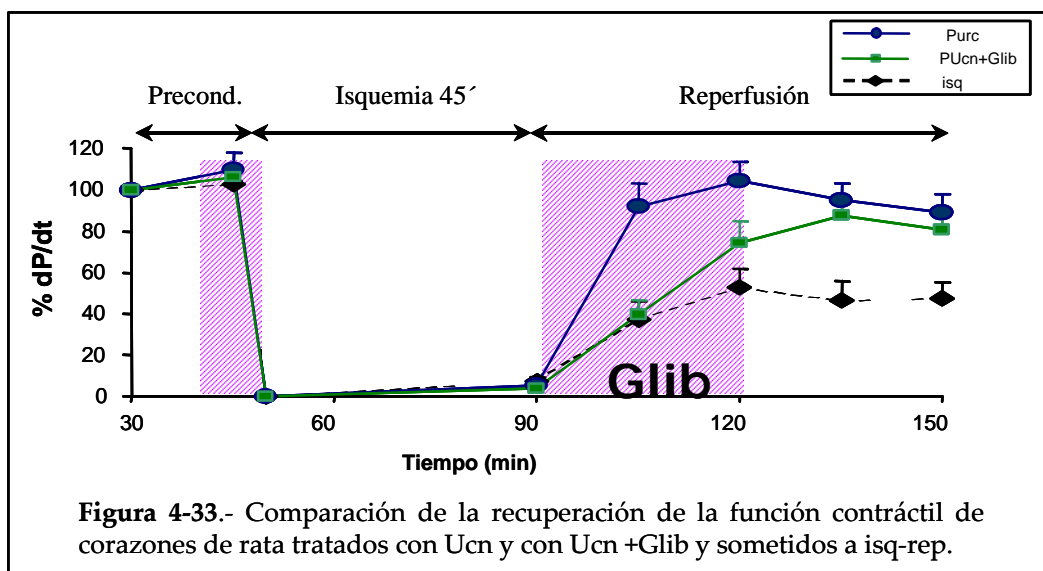
Este efecto inotrópico positivo puede estar implicado en la descrita capacidad de la Ucn aplicada antes de isquemia y durante la reperfusión para mejorar la función contráctil del corazón (155, 156, 157). Tenemos datos en los que hemos comprobado que la administración de Ucn antes de la isquemia y durante los 30 primeros minutos de reperfusión mejora la contractilidad de los corazones en un $89,32 \pm 8,43\%$ frente a $47,42 \pm 7,82\%$ en el grupo control de isquemia como podemos observar en la figura 4-31.



Este efecto protector de la Ucn ha resultado ser incluso más potente que el aportado por el clásico PI, como se observa en la figura 4-32 donde comparamos el efecto protector tanto de la Ucn como del PI.



También hemos observado en nuestro modelo experimental que esta mejora de la contractilidad está mediada por los canales K_{ATP} , ya que como se observa en la figura 4-33, la glibenclamida impide el incremento de la $+dP/dt$ inducida por la Ucn.



Todo esto hace a la Ucn muy atractiva para su uso en el campo de la potenciación de los mecanismos endógenos de protección cardiaca, con lo que en estos momentos estamos interesados en profundizar en los mecanismos moleculares y las rutas de señalización activadas por la Ucn y que conducen a la protección de los cardiomiocitos y en último término del corazón ante el síndrome de isquemia-reperfusión.

6.- DISCUSIÓN

Actualmente son muchos los trabajos dedicados a tratar de dilucidar los mecanismos implicados en el PI con el objeto de desarrollar fármacos que lo simulen para utilizarlos como tratamientos para la cardioprotección. La adenosina se ha propuesto como una molécula liberada durante la isquemia capaz de proteger a las células del daño provocado durante la consecuente reperusión del órgano. Nuestro trabajo demuestra que al impedir la pérdida de la adenosina producida de forma endógena, conseguimos una mejoría en la función cardíaca similar a la obtenida por la aplicación exógena de la misma. A su vez determinamos que la adenosina participa en el PI aunque no es la principal vía por la que este lleva a cabo su efecto protector. Por otro lado comprobamos que los canales K_{ATP} están implicados en la protección tanto por el PI como por la adenosina.

6.1. Modelo de experimentación

Numerosos modelos experimentales se han utilizado para estudiar el efecto de la isquemia sobre el miocardio y para desarrollar intervenciones terapéuticas. Según algunos autores esto puede llevar a confusión y sobre todo puede hacer difícil la correlación de datos y su extrapolación a los seres humanos ⁽³⁾. De hecho, el primer trabajo publicado sobre el preconditionamiento por Murry ⁽⁴⁸⁾, se realizó en un modelo in vivo en perros a los que se anestesiaba y, tras exponer el corazón, se les aplicaba un protocolo de preconditionamiento consistente en la oclusión de una arteria coronaria durante cuatro periodos cortos de 5 minutos de duración alternos con otros cuatro de reperusión antes de un periodo de isquemia prolongada, es decir, empleó un modelo de isquemia regional in vivo con todas sus implicaciones, y su objetivo final fue la evaluación del tamaño del área infartada con y sin preconditionamiento.

Muchos trabajos han empleado este modelo de isquemia regional

mediante la oclusión de una arteria coronaria (generalmente la arteria descendente anterior izquierda) con la medida del tamaño del área infartada como criterio de evaluación ^(56, 78, 134, 135, 158), aunque con la preparación y los medios técnicos adecuados puede analizarse también la función miocárdica postisquémica ⁽¹⁵⁹⁾, el metabolismo miocárdico ⁽¹⁶⁰⁾, e incluso la regulación microvascular ^(159, 161). Sin embargo, este modelo tiene la dificultad de las variaciones anatómicas de la circulación coronaria colateral dependiendo de cada especie, lo que nos obliga a interpretar resultados con cierta precaución ^(162, 134). Estos trabajos están más orientados al estudio y progresión de la lesión isquémica ocasionada en un evento de isquemia regional o infarto, situación en la que llegan la mayoría de los pacientes a la clínica, los cuales ya presentan la lesión isquémica y se trata de que la reperfusión de esa zona infartada ocasione los menores daños posibles.

En nuestro caso nos interesaba abordar el problema desde el punto de vista de la cirugía cardíaca en la que es necesaria la parada del corazón, con lo que se somete a condiciones de isquemia tanto durante la cirugía con circulación extracorpórea (CEC) como en el caso de trasplante cardíaco y la consiguiente reperfusión del órgano ^(163, 164).

Hemos utilizado el corazón de conejo explantado y perfundido en el sistema langendorff que mediante pequeños ajustes nos ha permitido trabajar con corazones de distintas especies animales ⁽¹³¹⁾, y nos ha permitido mantener el corazón en funcionamiento más del tiempo suficiente como para medir y determinar cambios en la función miocárdica tanto a nivel de parámetros hemodinámicos como metabólicos y estructurales mediante cortes histológicos tras la experiencia. Estas características, junto con su extendido uso en la bibliografía, lo ha hecho idóneo para el estudio PI del Miocardio, ya que nos ha permitido medir los distintos parámetros funcionales, sin influencias

neurohormonales, y comprobar la existencia del mismo. Así mismo, nos ha permitido llevar a cabo las distintas intervenciones farmacológicas para tratar de simular los beneficios de dicho PI y a su vez conocer las distintas vías de señalización inter e intracelulares implicadas en el mismo. El uso del sistema Langendorff nos ha servido, en condiciones controladas, para provocar una isquemia global de 45 minutos y la consiguiente reperusión ⁽¹³¹⁾, tiempo similar al de máxima parada de corazón utilizado en quirófano en algunas intervenciones quirúrgicas que requieren una parada controlada del corazón. Asimismo, es el tiempo necesario para ver mayor efecto de I-R sobre las funciones miocárdicas. Este modelo tiene la ventaja de simular de una manera parecida las condiciones de isquemia durante la cirugía con CEC y la isquemia del injerto para trasplante cardiaco. Sin embargo, este sistema no sirve para hacer una evaluación de los parámetros a largo plazo, lo que hace difícil su extrapolación a situaciones más prolongadas ⁽³⁾ (más de cinco horas, según nuestra experiencia).

Por otro lado, se ha descrito la posibilidad de perfundir el corazón con sangre procedente de otro animal a través de un circuito de CEC ⁽¹³¹⁾. Se ha demostrado, mediante esta técnica de perfusión de corazón aislado, que la sangre no es necesaria para poner de manifiesto el fenómeno del PI. La perfusión con sangre supone el uso de un mayor número de animales y supone una mayor dificultad técnica, pero hay que tenerla en cuenta a la hora de extrapolar resultados ya que está bien demostrado que la isquemia lleva a la activación de las plaquetas y de las células del sistema inmune, lo cual acentúa el daño del miocardio por I-R ⁽¹⁶⁵⁻¹⁶⁷⁾. Nosotros preferimos la perfusión de una solución salina oxigenada de más fácil accesibilidad y disponibilidad, cuya composición está controlada, para no introducir nuevas variables a nuestro trabajo más que las debidas al propio corazón.

6.2. El Precondicionamiento Isquémico (PI) mejora las funciones hemodinámicas del miocardio sometido a una situación de isquemia-reperusión

El protocolo experimental que hemos utilizado es resultado del estudio de la bibliografía, en la que se utilizan protocolos muy variados. Hemos considerado el técnicamente más sencillo y eficaz y que se aproximaba más a nuestras necesidades, de manera que para conseguir el efecto beneficioso del PI hemos utilizado un único ciclo consistente en 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperusión previos a la isquemia prolongada (81, 134, 168-171).

Los resultados del PI usando nuestro modelo animal han confirmado la mejora de las funciones hemodinámicas del corazón y de las lesiones producidas por I-R. La aplicación de isquemia durante intervalos cortos de tiempo permitió la recuperación de la contractilidad que alcanzó el 89,82% frente al 56,62% inducido por isquemia. Además se han mantenido las PPC y PVD en el mismo nivel que en control, a diferencia de los corazones isquémicos que mostraron un incremento de estas dos variables (ver tabla 4.2).

Por otro lado, el análisis de los cortes histológicos mostraron que en el grupo de isquemia (figura 4-5 y 4-6) el tejido está más desorganizado presentando gran cantidad de células eosinófilas y núcleos con picnosis que comienzan a romperse como signo de daño irreversible, mientras que en el grupo de PI el tejido presentó una coloración de hematoxilina/eosina normal, además de una menor cantidad de células muertas, lo cual justifica la recuperación funcional del corazón.

6.3. La adenosina exógena y la endógena proporcionan la recuperación de la función contráctil ante la lesión por isquemia-reperusión

Las vías de señalización inducidas por el PI siguen siendo confusas. La adenosina ha sido propuesta como candidata de estar involucrada en el PI.

Durante un proceso de isquemia el ATP se degrada en adenosina, la cual parece estar involucrada en el PI. En este trabajo hemos administrado la adenosina durante diez minutos, justo antes de la isquemia prolongada de 45 minutos, con lo que esta está llevando a cabo su acción a través de la activación de sus receptores durante toda la isquemia. Nuestros datos muestran una mejoría significativa funcional del corazón ($dP/dt = 76,76\%$) en comparación con el grupo de isquemia, pero no alcanzó la recuperación obtenida por el PI. Clásicamente se ha determinado el efecto beneficioso de la adenosina midiendo la reducción del tamaño del infarto, ya que la mejoría en cuanto a los parámetros hemodinámicos no está clara ^(172, 96). En algunos trabajos en corazones de ratas y en conejo, la adenosina falló a la hora de llevar a cabo su efecto beneficioso debido a que se infundió adenosina mediante un bolo a una determinada concentración en distintos tiempos, previo o posterior a la isquemia prolongada, con lo que la adenosina se lava y no tiene tiempo de actuar ⁽¹⁷³⁾.

Además, el tratamiento con adenosina mejora la función del ventrículo izquierdo, pero no consigue evitar la hipercontractura ni disminuye el aumento en la presión de perfusión y, por tanto, el aumento de las resistencias vasculares (Figs 4-9, 4-11 en el apartado de resultados). Lo cual confirma su efecto pre-descrito sobre la hipercontractura que fue relacionado con su corta vida media, ya que es rápidamente capturada y metabolizada por las células endoteliales y eritrocitos ⁽¹⁷⁴⁾.

6.3.1. Implicación del transportador de la adenosina en su efecto

Para evitar el lavado de la adenosina durante la reperfusión, hemos utilizado el dipyridamol, un inhibidor del transporte de nucleósidos, de manera que la adenosina endógena queda retenida en el fluido intersticial y no pasa a las células endoteliales ni a la luz vascular. El dipyridamol siendo un potente

vasodilatador coronario ha sido utilizado en algunos estudios clínicos de angioplastia en pacientes ^(175, 176), demostrándose que mejora la tolerancia ante futuros episodios de isquemia. En nuestro grupo de trabajo, la inhibición del transportador ha tenido un efecto muy parecido a la adenosina sobre la recuperación funcional del miocardio, aunque mejoró la perfusión coronaria (Figura 4-11 y valores en tabla 4-3 en el apartado de resultados, Figura 4-6 del apartado de resultados). Hay pocos trabajos realizados con dipyridamol como agente protector. Sobre todo, son observaciones clínicas de los pacientes a los que se les ha realizado una electrocardiografía, en las que se utiliza dipyridamol, los cuales presentan menor grado de lesión tras sufrir futuros episodios de isquemia. Sólo un trabajo trata de analizar la mejoría funcional en un modelo semejante al nuestro de corazón de conejo aislado y perfundido ⁽¹⁷⁷⁾, pero en este trabajo el tiempo de isquemia al que son sometidos los corazones es muy breve, de manera que la mejoría que experimentan estos corazones puede ser debida más a que el corazón sólo sufre un aturdimiento (stunning), del cual puede recuperarse funcionalmente hasta un 100%. En nuestro modelo el tiempo de isquemia que nos interesa probar es de mayor duración, para tratar de simular el tiempo requerido en la cirugía cardiaca y, sobre todo, en el caso de los trasplantes, aunque este es aún mayor (hasta 4 horas).

El dipyridamol tiene otros efectos inespecíficos como la inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa de manera que el AMPc en los cardiomiocitos ⁽¹⁷⁸⁾ puede actuar inhibiendo a los canales de calcio voltaje-dependientes y por otro lado que el GMPc en las células endoteliales pueda estimular durante más tiempo la producción de NO ⁽¹⁷⁹⁾. Todo esto puede contribuir en la protección del miocardio ante la situación de I-R. Tampoco hemos visto efectos sumatorios de la protección por el PI y el preconditionamiento farmacológico con adenosina, exógena o endógena. La idea era si al aplicar de forma conjunta el PI

junto con los tratamientos con ADP o dipyridamol, respectivamente, obtendríamos un efecto aditivo de la protección de ambos tratamientos. Comprobamos que no hay un efecto aditivo de la protección proporcionada por el ADP a la proporcionada por el PI, de acuerdo con la idea de que el PI es un fenómeno de todo o nada, y que hay un umbral de manera que cuando aparece la protección, ésta es proporcionada por la activación de toda la maquinaria que interviene en el PI (134, 180).

6.3.2. La adenosina lleva a cabo su papel protector mediante su interacción con los receptores purinérgicos para la misma A_1 , A_2 { A_{2a} y A_{2b} } y A_3

Se sabe que la adenosina aplicada de forma exógena, llega con dificultad a las células del miocardio ya que tiene que atravesar la adventicia y células endoteliales que la metabolizan rápidamente. La dosis de adenosina que aplicamos de forma exógena consigue llegar al miocardio y activar los receptores para la misma ya que observamos recuperación funcional ante la lesión por I-R. Al inhibir los receptores de adenosina con el antagonista SPT, inhibidor inespecífico para los distintos subtipos de receptores para adenosina, se elimina el efecto protector de ésta, cuando se aplica de forma exógena, pero solo reduce parcialmente el efecto protector del dipyridamol.

Esta diferencia puede ser debida a que la adenosina administrada de forma exógena puede que no llegue a los cardiomiocitos en la misma concentración que la aplicamos, parte por el rápido metabolismo de la misma por el endotelio que tiene que atravesar para llegar a su sitio de acción en los cardiomiocitos. En el caso de la adenosina producida por el propio corazón y que impedimos que se lave con dipyridamol, ésta puede encontrarse en mayor concentración y competir con el SPT, de manera que aumenta la probabilidad de que pueda activar durante un tiempo algunos receptores que desencadenen

la vía por la que la adenosina protege el miocardio ante la lesión por I-R.

6.4. Los canales de K_{ATP} son fundamentales en la protección proporcionada por el PI y por la adenosina

Los canales K_{ATP} han sido involucrados en el efecto cardioprotector mediante PI. La aplicación de la glibenclamida, inhibidor de los K_{ATP} , impidió significativamente la recuperación de la función contráctil inducida por el PI. También se confirmó la participación de estos canales en los efectos vistos por la adenosina y el dipyridamol. Estos resultados vienen a confirmar que estos canales son los mediadores o efectores de todas las vías que se ponen en marcha con el preconditionamiento (106, 181, 182). En los experimentos donde no se ha visto el efecto sumatorio de la adenosina con el PI, la inhibición de los canales de K_{ATP} no ha conseguido eliminar este efecto protector. Esto podría ser debido a que hay un efecto sumatorio de la protección proporcionada por ambos tratamientos, que no se observa cuando los canales de K_{ATP} llevan a cabo su función, pero que se manifiesta cuando estos están inhibidos. Se podría decir que la o las vías que tienen como mediadores a los canales de K_{ATP} son mayoritarias, como se demuestra al inhibir el efecto protector del PI con glibenclamida, y que la vía por la que actúa la adenosina a través de sus receptores, es minoritaria y que puede implicar en parte a los canales K_{ATP} , pero al no estar estos funcionando se puede amplificar su efecto protector. La glibenclamida inhibe tanto los canales K_{ATP} de la membrana plasmática como los de la mitocondria (183), así creemos esencial determinar cual de los dos está implicado en el PI.

6.5. Otras vías de protección miocárdica: Papel de la $iPLA_2$ en la protección endógena del miocardio

Durante la isquemia se activan distintas fosfolipasas (C, D, A) que liberan ácidos grasos de las membranas estructurales dando lugar a sustratos

secundarios que forman especies reactivas del oxígeno en la reperfusión y que contribuyen al progreso del deterioro de las membranas durante la misma (5). Nuestro último objetivo era comprobar el papel de otras vías, y en concreto la de la PLA₂ con lo que nos centramos en la iPLA₂ que es la responsable de la liberación de AA cuyos productos de oxidación son muy dañinos para las membranas (184, 185). La inhibición irreversible con Bel (186) de la iPLA₂ ha conseguido recuperar los parámetros hemodinámicos pero no llegó a los niveles alcanzados por el PI y la adenosina. Además, observamos que en este grupo hay una mejoría inicial en las presiones cardiacas, pero con el tiempo de reperfusión va disminuyendo. La iPLA₂ es fundamental en la reorganización y reestructuración de las membranas celulares durante la reperfusión. Su inhibición irreversible con Bel puede ser responsable del deterioro observado en reperfusión.

No se sabe en que momento y como se activan las fosfolipasas durante la isquemia. Sería interesante ver si hay alguna relación entre la vía activada por la adenosina y la iPLA₂, hacer estudios de I-R en cardiomiocitos de corazones de rata y estudiar en que momento se activa esta iPLA₂. Por otro lado también sería interesante estudiar que vías se potencian durante el PI cuando al inhibir los canales K_{ATP} aplicamos ADP o dipyridamol.

6.6. Protección proporcionada por péptidos producidos y liberados en situaciones de isquemia-reperfusión: La Urocortina

Ante situaciones de estrés como puede ser la I-R, el corazón libera distintas sustancias que pueden ser beneficiosas a corto plazo para superar dicho estrés. Entre estas sustancias, además de la adenosina, se encuentran péptidos que a través de su receptor van a tener distintos efectos sobre el corazón. Uno de estos es la Urocortina (Ucn) que pertenece a la familia del factor liberador de corticotropinas (CRF) y que tanto esta como su receptor, el CRF-R2

se encuentran en el corazón y aumentan su expresión ante I-R ⁽¹⁸⁷⁾. Se ha descrito que la Ucn tiene un potente efecto inotrópico y lusotrópico positivo en corazones de rata y oveja y que estos efectos están mediados a partir del receptor CRF-R2 ⁽¹⁸⁸⁾, aunque no se conoce la vía por la que tiene lugar este efecto. Actualmente estamos tratando de determinar la vía de señalización implicada en este efecto inotrópico positivo de la Ucn sobre el miocardio y que está mediada por la activación del receptor para la Ucn CRF-R2.

Por otro lado está siendo muy estudiado el papel de la Ucn como péptido endógeno cardioprotector ante I-R ⁽¹³⁷⁻¹⁴¹⁾. En nuestro laboratorio y con nuestro modelo de corazón aislado de rata hemos observado que, efectivamente la Ucn es capaz de proteger la función hemodinámica de corazones expuestos I-R (Fig 4-31), que la recuperación es incluso mayor que la del PI (Fig 4-32) y que en este efecto protector parecen estar implicados los canales K_{ATP} (Fig 4-33). Sería interesante determinar si en el papel protector de la Ucn están implicados los canales K_{ATP} de la mitocondria o de la membrana plasmática, o ambos. También sería interesante determinar los efectos agudos sobre la contractilidad del miocardio y las vías implicadas para caracterizar los efectos de la Ucn sobre el corazón de rata aislado y profundido.

7.- CONCLUSIONES:

- 1.- 45 minutos de isquemia provoca lesiones por el síndrome de I-R en corazón aislado de conejo perfundido *ex vivo* en el sistema Lángendorff.
- 2.- Un Ciclo de 5 minutos de isquemia y otros 5 de reperfusión induce el PI frente a una isquemia crónica de 45 minutos.
- 3.- La infusión de ADP como precursor de adenosina, mejora significativamente la función contráctil del corazón, simulando parcialmente los efectos beneficiosos del PI.
- 4.- La inhibición del transportador de nucleótidos mediante dipiridamol mejora significativamente la función contráctil del corazón tras I-R.
- 5.- PI junto con la infusión de ADP o dipiridamol no produce efectos sumatorios.
- 6.- La inhibición de los receptores para la adenosina no impide la recuperación proporcionada por el PI.
- 7.- La inhibición de los receptores para la adenosina previene la recuperación mediante ADP exógeno, sin embargo no afecta a la protección inducida por dipiridamol.
- 8.- Los canales de K_{ATP} participan activamente en la protección inducida por el PI.
- 9.- Los canales de K_{ATP} parecen ser los efectores finales del preconditionamiento farmacológico con ADP y dipiridamol.
- 10.- Otras vías de señalización endógenas, como la $iPLA_2$ y la Ucn, son posibles alternativas para potenciar la protección miocárdica frente al síndrome de I-R.

8.- BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Meldrum DR, Mitchell MB, Banerjee A, Harken AH. Cardiac preconditioning. Induction of endogenous tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Arch surg.* 1993; 128: 1208-1211.
- 2.- Fernando de la Serna. Disfunción cardiaca de origen isquémico: Miocardio Atontado. Miocardio hibernado. Fenómeno de Acondicionamiento. En: *Insuficiencia Cardiaca Crónica. Capítulo 11: Atontamiento. Hibernación. Actualización. 2do.Semestre 2004; 212-227.*
- 3.- Braunwald E., Sobel BE. Riego coronario e isquemia miocárdica. En: *Braunwald E Tratado de cardiología. Interamericana McGraw-Hill. 1993: Cap 38; 1299-1341.*
- 4.- Mitchell MB, Winter Ch B, Banerjee A, Harken AH. The relationship between ischemia-reperfusion injury, myocardial stunning and cardiac preconditioning. *Surgery.* 1993; 177: 97-114.
- 5.- Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999 Jul; 79(3): 917-1017.
- 6.- Braunwald E. Control of myocardial oxygen consumption: Physiologic and clinical considerations. *Am J Cardiol.* 1997; 27: 416-421.
- 7.- Jennings RB, Reimer KA. Total ischemia in dog hearts in vitro. I. Comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs severe ischemia. *Circ Res.* 1981; 49:892.
- 8.- Lucchesi BR. Myocardial reoxygenation injury. *Curr Concepts.* 1990; 1: 4-60.
- 9.- Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the perfused heart. *J Biol Chem.* 1988; 263: 1353-1357.
- 10.- Sedlis SP, Corr PB, Sobel BE, Ahumada GG. Lysophosphatidylcholine potentiates Ca²⁺ accumulation in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1983; 244: H32-H38.
- 11.- Uehara A, Yasukochi M, Imanaga I. Modulation of ryanodine binding to

- the cardiac Ca²⁺ release channel by arachidonic acid. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1996; 28: 43-51
- 12.- Mancuso DJ, Abendschein DR, Jenkins ChM, Han X, Saffitz JE, Schuessler RB, and Gross RW. Cardiac ischemia activates calcium-indepenent phospholipase A₂, precipitating ventricular tachyarrhythmias in transgenic mice. *J Biol Chem*: 2003; 278, 25(20): 22231-22236.
- 13.- Weiner JM, Apstein CS, Arthur JH. Persistence of myocardial injury following brief periods of coronary occlusion. *Cardiovasc Res.* 1976; 10: 678-686.
- 14.- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitclie RJ, et al. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1975; 56: 978-985.
- 15.- Bulkley BH, Hutchins GM. Myocardial consequences of coronary artery bypass graft surgery: The paradox of necrosis in areas of revascularization. *Circulation.* 1977; 56: 906-913.
- 16.- Vinten-Johansen J, Johnston WE, Mills SA, et al. Reperfusion injury after temporary coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988; 95: 960-968.
- 17.- Vinten-Johansen J, Nakanishi K. Postcardioplegia acute cardiac dysfunction and reperfusion injury. *J Thorac and vasc Anest.* 1993; 7 (Suppl 2): 6-18.
- 18.- Gebhard MM. Myocardial protection and ischemia tolerance of the globally ischemia heart. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1990; 38: 55-59.
- 19.- Reibel DK, Rovetto MJ. Myocardial adenosine salvage rates and restoration of ATP content following ischemia. *Am J Physiol.* 1979; 237: 247-252.
- 20.- Humphrey SM, Holliss DJ, Seelye RN. Myocardial adenine pool depletion and recovery of mechanical function following ischemia. *Am J Physiol.* 1985; 248: 644-651.
- 21.- Saks VA, Rosenshtraukh LV, Smirnov VN, Chazov EI. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978; 56: 691-706.
- 22.- Jacobus WE. Respiratory control and the integration of heart high energy

- phosphate metabolism by mitochondrial creatine kinase . *Ann Rev Physiol.* 1985; 47: 707-725.
- 23.- Neubauer S, Hamman BL, Perry SB, et al. Velocity of the creatine kinase reaction decreases in postischemic myocardium: A ^{31}P -NMR magnetization transfer study of the isolated ferret heart. *Circ Res.* 1988; 63: 1-15.
- 24.- Mohrman DE, Heller LJ. Characteristics of cardiac cells. En: *Cardiovascular Physiology.* Ed McGraw-Hill. 4ª Edición 1997: 21-46.
- 25.- Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{++} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts: Possible involvement of H^+/Na^+ exchange and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange. *Circ Res.* 1989; 65: 1045-1056.
- 26.- Philipson KD, Bershon MM, Nishimoto A. Effects of pH on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res.* 1982; 50: 287-293.
- 27.- Marban E. Myocardial stunning and hibernation: The Physiology behind the colloquialism. *Circulation.* 1991; 83: 681-688.
- 28.- Kusoaka H, Koretsure Y, Chacko VP, Weisfeldt ML, Marban E. Excitation-contraction coupling in postischemic myocardium. Does failure of activator Ca^{++} transients underlie stunning? *Circ Res.* 1990; 66: 1268- 1276.
- 29.- Kusoaka H, Porterfield JK, Weisman HF, et al. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium: Depressed Ca^{++} activation of contraction as a consequence of reperfusion induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest.* 1987; 79: 950- 961.
- 30.- Hess ML, Krause SM, Greenfield LJ. Assessment of hypothermic, cardioplegic protection of the global ischemic canine myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1980; 80: 293- 301.
- 31.- McCallister LP, Daiello AC, Tyers GF. Morphometric observations of the effects of normothermic arrest on dog myocardial ultrastructure. *J Mol Cell Cardiol.* 1978; 10: 67- 80.
- 32.- Gerlach E, Nees S, Becker BF. The vascular endothelium: A survey of some

- newly involving biochemical and physiological features. *Bas Res Cardiol.* 1985; 80: 459- 474.
- 33.- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimsura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cels. *Nature.* 1988; 332: 411- 415.
- 34.- Palmar RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 525- 526.
- 35.- Ku DD. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science.* 1982; 218: 576-578.
- 36.- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320: 454- 456.
- 37.- Tsao PS, Lefer AM. Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol.* 1990; 259: H1660- H1666.
- 38.- Hearse DJ. Reperfusion-induced injury: Fallacy or pharmacologic target. *Age of reperfusion.* 1991; 3: 1- 6.
- 39.- Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic manipulation. *Circulation.* 1989; 84: 1949- 1062.
- 40.- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion: Evidence that myocardial "Stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res.* 1989; 65: 608- 621.
- 41.- Banerjee A, Grosso MA, Brown JM, et al. Oxygen metabolite effects on creatine Kinase and cardiac energetics after reperfusion. *Am J Physiol.* 1991; 261: H590- H597.
- 42.- Jackson CV, Mickelson JK, Pope TK, et al. O₂ mediated free radical-mediated myocardial and vascular dysfunction. *Am J Physiol.* 1986; 251: H1225-

H1231.

43.-Bolli R, Zhu WX, Hartley CJ, et al. Attenuation of dysfunction in the postischemic "stunned" myocardium by dimethylthiourea. *Circulation*. 1987; 76: 458-468.

44.- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. Direct evidence that oxygen- derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 4695- 4699.

45.- Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1999 Sep;43(4):860-78.

46.- Zhao ZQ, McGee DS, Nakanishi K, Toombs CF, Johnston WE. Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. *Circulation*. 1993; 88:709-719.

47.- Arnold JMO, Braunwald E, Sandor T, Kloner RA. Inotropic stimulation of reperfused myocardium with dopamine: Effects on infarct size and myocardial function. *J Am Coll Cardiol*. 1985; 6: 1026- 1034.

48.- Murry CE, Jennings RB and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5), 1124-1136.

49.- Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill MI and Jennings RB. Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol*. 1986; 251: H1306-H1315.

50.- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER and Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res*. 1990; 66(4): 1133-1142.

51.- Iwamoto T, Miura T, Adachi T, et al. Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free radicals scavengers in the rabbit. *Circulation*. 1991; 83: 1015-1022.

52.- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE and Pugsley WB. Ischemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res*. 1992; 26: 983-

987.

53.- Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion induced arrhythmias. *Am J Physiol.* 1987; 253: H1470-H1476.

54.- Lawson CS, Coltart DJ, Hearse DJ. "Dose"-dependency and temporal characteristics of protection by ischemic preconditioning against ischemia-induced arrhythmias in rats hearts. *J Moll Cell Cardiol.* 1993; 25: 1391-1402.

55.- Lawson CS, Avkiran M, Shattock MJ, et al. Preconditioning and reperfusion arrhythmias in the isolated rat heart: true protection or temporal shift in vulnerability. *Cardiovasc Res.* 1993; 27:2274-2281.

56.- Jenkins DP, Yellon DM. Biología general del preconditionamiento isquémico. En Yellon DM, Rahimtoola SH, Opie LH. Nuevos síndromes isquémicos. Ed J y C Ediciones Médicas SL Barcelona.1998: 204-214.

57.- Sandhu R, Diaz RJ, Wilson GJ. Comparison of ischemic preconditioning in blood and buffer perfused isolated heart models. *Cardiovasc Res.* 1993; 27:602-607.

58.- Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, Kloner RA. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation.* 1992; 85: 2247-2254.

59.- Bunch FT, Thornton J, Cohen MV, Downey JM. Adenosine is an endogenous protectant against stunning during repetitive ischemic episodes in the heart. *Am Heart J.* 1992; 24:1440-1446.

60.- Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FIJ, Donnelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation.* 1993; 87: 881-892.

61.- Albuquerque CP, Gerstenblith G, Weiss RG. Importance of metabolic inhibition and cellular pH in mediating preconditioning contractile and metabolic effects in rat hearts. *Circ Res.* 1994; 74: 139-150.

62.- Vuorinen K, Ylitalo K, Peuhkurine K, et al. Mechanism of ischemic preconditioning in rat myocardium. *Circulation.* 1995; 91: 2810-2818.

63.- Albuquerque CP, Gerstenblith G, Weiss RG. Myocardial buffering capacity

- in ischemia preconditioned rat hearts. *J Moll Cell Cardiol.* 1995; 27: 777-781.
- 64.- de Jong JW, de Jonge R, Marchesani A, Janssen M, Bardamante S. Controversies in preconditioning (Review). *Cardiovasc. Drugs Ther* 1996; 10: 767-773.
- 65.- Yellon DM, Baxter GF, García-Dorado D, Heusch G, Sumeria MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions (Review). *Cardiovasc Res* 1998; 37: 21-33.
- 66.- Downey JM, Cohen MV. Signal transduction in ischemic preconditioning (Review). *Adv Exp Med Biol* 1997; 430: 39-55.
- 67.- Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein Kinase C (Review). *Ann NY Acad Sci* 1994; 723: 82- 98.
- 68.- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fujii H, Oe H, Hori M et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72: 1293-1299.
- 69.- Dana A, Jonassen AK, Yamashita N, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase.. *Circulation.* 2000 Jun 20;101(24):2841-8.
- 70.- Anu PUNN, James W. MOCKRIDGE, Saleha FAROOQUI, Michael S. MARBER and Richard J. HEADS. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochem. J.* (2000) 350, 891±899.
- 71.- Perrault LP, Menasché P. Preconditioning: Can nature's shield be raised against surgical ischemic-reperfusion injury? *Ann Thorac Surg.* 1999; 68: 1988-1994.
- 72.- Krack M, Rahmanian P, Haverich A. Ischemic preconditioning enhances donor heart preservation. *Trasplantation.* 1996; 62: 17-22.
- 73.- Galinanes M, Argano V, Hearse DJ. Can ischemic preconditioning ensure optimal myocardial protection when delivery of cardioplegia is impaired?

- Circulation. 1995; 92(Suppl II): 389-394.
- 74.- Cohen G, Borger MA, Weisel RD, Rao V. Intraoperative myocardial protection: Current trends and future perspectives. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68: 1995-2001.
- 75.- Rao V, Ivanov J, Weisel RD, et al. Predictors of low cardiac output syndrome following coronary artery bypass. *J Thorac Cardiovasc surg.* 1996; 112: 38-51.
- 76.- Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ, et al. Intracoronary L-Arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol.* 1992; 263: H1650-H1658.
- 77.- Nonami Y, Rao V, Shiono N, Ogoshi S. Quenching the effects of L-Arginine on free radical injury in cultured cardiomyocytes. *Surg Today.* 1998; 28:379-384.
- 78.- Lee HT, LaFaro RJ, Reed GE. Pretreatment of human myocardium with Adenosine during open heart surgery. *J Card Surg.* 1995; 10: 665-676.
- 79.- Leeser MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R. Preconditioning of human myocardium with Adenosine during coronary angioplasty. *Circulation.* 1997; 95: 2500-2507.
- 80.- Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Eng J Med.* 1996; 334: 7-12.
- 81.- Atsushi Kuno a, Stuart D. Critz b, Lin Cui a, James M. Downey a, et al. Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43 (2007) 262–271.
- 82.- Meldrum DR, Cleveland JCJr, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac preconditioning with calcium: clinically accessible myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 112: 778-786.
- 83.- Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K channel. *Circ*

Res. 1995; 77: 1030-1035.

84.- Cleveland JC, Meldrum DR, Cain BS, Banerjee A, Harken AH. Oral sulfonylurea

hypoglycaemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation*. 1997; 96: 29-32.

85.- Grover GJ. Protective effects of ATP sensitive potassium channels openers in models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Res*. 1994; 28: 778-792.

86.- Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian Heart. *J Physiol (Lond)*. 1929; 68: 213-237.

87.- Berne RM. Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 1963; 204: 317-322.

88.- Martin BJ, Lasley RD, Mentzer Jr RM. Infarct size reduction with the nucleoside transport inhibitor R-75231 in swine. *Am J Physiol*. 1997; 272: H1857-H 1865.

89.- Möser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of Adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*. 1989; 256: C799-C806.

90.- Mullane K, Bullough D. Harnessing an endogenous cardioprotective mechanism: cellular sources and sites of action of adenosine (Review). *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1041-1054.

91.- Hori M, Kitakaze M. Adenosine, the heart and coronary circulation (Review). *Hypertension* 1991; 18: 565-574.

92.- Ely SW, Mentzer RM, Lasley RD, Lee BK, Berne RM. Functional and metabolic evidence of enhanced myocardial tolerance to ischemia and reperfusion with adenosine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985; 90: 549-556.

93.- Schrader J. Adenosine. A homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism (Editorial). *Circulation* 1990; 81: 389-391.

94.- Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes (Review). *FESEB J*

- 1995; 9: 359–365.
- 95.- Berne RM. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res* 1980; 47: 807-813.
- 96.- Mubagwa K, Mullane K, Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation (Review). *Cardiovasc Res* 1996; 32: 797- 813.
- 97.- Freeman GL, Colston JT, Hultman J. Influence of adenosine on left ventricular performance in conscious dogs. *Am J Physiol* 1990; 258: H424-H430.
- 98.- Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion- an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44: 1038-1055.
- 99.- Neumann J, Gupta RC, Jones JR, Bodor GS, Bartel S, Krause E-G et al. Interaction of α -adrenoceptor and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1655- 1667.
- 100.- Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive K⁺channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1990; 259: H820-H826.
- 101.- Nelson L. Bernardo, Shinji Okubo, Mohammed M. Maaieh, Mark A. Wood and Rakesh C. Kukreja. Delayed preconditioning with adenosine is mediated by opening of ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit heart. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 1999; 277(46): H128-H135.
- 102.- Mentzer Jr RM, Bungler R, Lasley RD. Adenosine enhanced preservation of myocardial function and energetics. Possible involvement of the adenosine A1 receptors system (Review). *Card Res* 1993; 27: 28-35.
- 103.- Valdivia CR, Lasley RD, Hegge JO, Valdivia HH, Mentzer RM. Adenosine pre-treatment prevents myocardial stunning-induced reduction of ryanodine receptor function. *Circulation* 1996; 94 (Suppl): A185.
- 104.- Meininger CJ, Granger HJ. Mechanisms leading to adenosine-stimulated proliferation of microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1990; 258: H198-

H206.

105.- Zhao ZQ, McGee S, Nakanishi K, Toombs CF, Johnston WE, Ashar MS et al. Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. *Circulation* 1993; 88: 709-719.

106.- Shneyvays V, Nawrath H, Jacobson KA, Shainberg A. Induction of apoptosis in cardiac myocytes by an A₃ adenosine receptor agonist. *Exp Cell Res* 1998; 243: 383-397.

107.- James D. McCully, Yoshiya Toyoda, Masahisa Uematsu, Robert D. Stewart and Sydney Levitsky. Adenosine-enhanced ischemic preconditioning: adenosine receptor involvement during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: H591-H602.

108.- Asakura M, Kitakaze M, Sakata Y, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogida H, Liao Y, Node K, Takashima S, Tada M, Hori M. Adenosine-induced cardiac gene expression of ischemic murine hearts revealed by cDNA array hybridization. *Circ J* 2002; 66: 93-96.

109.- Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. Nature. 1983 Sep 8-14;305(5930):147-8

110.- Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Evidence for mitochondrial K ATP channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2000 Mar;45(4):934-40.

111.- Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of K_{ATP} channel. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62: 79-109.

112.- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. 1991; 352: 244-247.

113.- Brian O'Rourke. Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. *Circ Res*. 2000; 87: 845-855.

114.- Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*. 1999; 84: 973-979.

-
- 115.- Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol.* 1994; 266: H137-H146.
- 116.- Gysembergh A, Margonari H, Loufoua J, Ovize A, Andre-Fouet X, Minaire Y, Ovize M. Stretch-induced protection shares a common mechanism with ischemic preconditioning in rabbit heart. *Am J Physiol.* 1998; 274: H995-964.
- 117.- Hoag JB, Quian YZ, Nayeem MA, D'Angelo M, Kukreja RC. ATP-sensitive potassium channel mediates delayed ischemic protection by heat stress in rabbit heart. *Am J Physiol.* 1997; 273: H2458-H2464.
- 118.- Yoshiya Toyoda, Ingeborg Friehs, Robert A. Parker, Sidney Levitsky and James D. McCully. Differential role of sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2694- H2703.
- 119.- Dunker DJ, Verdouw PD. Role of K_{ATP} channels in ischemic preconditioning and cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2000; 14: 7-16.
- 120.- Thornton JD, Thornton, CS, Sterling DL, Downey JM. Blockade of ATP-sensitive potassium channels increases infarct size but does not prevent preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res.* 1993; 72: 44-49.
- 121.- Tomai F, Crea F, Chiariello L, Giofrè PA. Ischemic preconditioning in humans : Models, mediators and clinical relevance. *Circulation.* 1999; 100: 559-563.
- 122.- Carr CS, Hill RJ, Masamune H, Kennedy SP, Knight DR, Tracey WR, Yellon MD. Evidence for a role for both A₁ and A₃ receptors in protection of isolated human atrial muscle against simulated ischemia. *Cardiovasc Res.* 1997; 36: 52-59.
- 123.- Ikonomidis JS, Tumiati LC, Weisel RD. Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischemia. *Cardiovasc Res.* 1994; 28: 1285-1291.
- 124.- Ikonomidis JS, Shirai T, Weisel RD, Mickle DAG. Human cardiomyocyte preconditioning is Adenosine A₁ receptor dependent. *Circulation.* 1994; 90

(Suppl I, part 2): 477-482.

125.- Wollmering MM, Fullerton DA, walther JM, et al. Preconditioning protects function and viability in human ventricle. *Circulation*. 1994; 90 (Suppl I, part 2): 477.

126.- Yellon DM, Alkhulaifi AM. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993; 342: 276-277.

127.- Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischemic preconditioning reduces Troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart*. 1997; 77: 314-318.

128.- Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Pente de Poppo A et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by Glibenclamide, a selective ATP-sensitive K channel blocker. *Circulation*. 1994; 90: 700-705.

129.- Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Ghini AS, De Paulis R, et al. Phentolamine prevents adaptation to ischemia during coronary angioplasty. Role of alpha-adrenergic receptors in ischemic preconditioning. *Circulation*. 1997; 96: 2171-2177.

130.- Antonio Crisafulli, Franco Melis, Filippo Tocco, Umberto M. Santobonni, Carlo Lai, Giovanni Angioy, Luigi Lorrari, Gianluigi Pittau, Alberto Concu and Pasquale Pagliaro. Exercise-induced and nitroglycerin-induced myocardial preconditioning improves hemodynamics in patients with angina. *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2004;287: H235- H242.

131.- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J and col. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotrophin-releasing factor. *Nature*. 1995; 378: 287-92.

132.- Scarabelli T, Knight R. Urocortins: Take them to heart. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004; 2: 335-342.

133.- Huang Y, Chan FL, Lau CW, Tsang SY, He GW, Chen ZY, Yao X. Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery:

- role of nitric oxide and K⁺ channels. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 1467-1476.
- 134.- Kimura Y, Takahashi K, Totsune K, et al. Expression of urocortin and corticotrophin-releasing factor receptor subtypes in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 340-346.
- 135.- Parkes DG, Vaughan J, et al. Cardiac inotropic actions of urocortin in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1997; 272: H2115-22.
- 136.- Latchman DS. Urocortin protects against ischaemic injury via a MAPK-dependent pathway. *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11: 167-169.
- 137.- Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23: 71-77.
- 138.- Brar BK, Stephanou A, Knight RA and Latchman DS. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J. Moll Cell Cardiol.* 2002; 34: 483-492.
- 139.- Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Latchman DS, Yellon DM, et al. Urocortin protect against ischaemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000; 275: 8508-8514.
- 140.- Lawrence K, Chanalaris A, Scarabelli TM, Latchman DS, et al. KATP channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect. *Circulation.* 2002; 106 (12): 1556-1562.
- 141.- Lawrence KM, Townsend PA, et al. The cardioprotective effect of urocortin during ischaemia/reperfusion involves de prevention of mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321: 476-486.
- 142.- Lawrence KM, Scarabelli TM, et al. Urocortin protects cardiac myocytes from ischaemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A₂ gene expression. *FASEB J.* 2003; 17 (15): 2313-2315.
- 143.- Bolling SF, Olszanski DA, Childs KF, Gallagher KP, Ning X-H. Stunning, Preconditioning and functional recovery after global myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg.* 1994; 58: 822-827.

- 144.- Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused Warm-blooded heart. According to Langendorff. 1st English Edition. 1988. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, D-7806 March, West Germany.
- 145.- Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Tsuchida A, Limura O. Infarct size limiting effect of preconditioning: its duration and dose-response relationship. *Circulation*. 1990; 82 (suppl III) 271.
- 146.- Tsuchida A, Liu GS, Wilborn WH, Downey JM. Pretreatment with the Adenosine A1 selective agonist, 2-chloro-N6-cyclopentyl-adenosine (CCPA), cause a sustained limitation of infarct size in rabbits. *Cardiovasc Res*. 1993; 27: 652-656.
- 147.- Derek M Yellon and James M Downey. Preconditioning the myocardium: From cellular Physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003; 83: 1113-1151.
- 148.- Baghelai K, Graham LJ, Wechsler AS, Jakoi ER. Phenylephrine induces delayed cardioprotection against necrosis without amelioration of stunning. *Ann Thorac Surg*. 1999 Oct; 68(4): 1219-1224.
- 149.- Alfredo Gamboa, Robert Abraham, Andre Diedrich, Cyndya Shiba, Sachin Y. Paranjape, Ginnie Farley, Italo Biaggioni. Role of Adenosine and Nitric Oxide on the Mechanisms of Action of Dipyridamole. *Stroke*. 2005;36:2170-2175.
- 150.- David A. Ford, Stanley L. Hazen, Jeffrey E. Saffitz and Richard W. Gross. The Rapid and Reversible Activation of a Calcium-independent Plasmalogen-selective Phospholipase A₂ during Myocardial Ischemia. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 5629-5633).
- 151.- Leon J. De Windt, Jodil Willems, Theo H. M. Roemen, Will A. Coumans, Robert S. Reneman, Ger J. Van Der Vusse and Marc Van Bilsen. Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A₂. *AJP - Heart* 280:2572-2580, 2001.
- 152.- Wolf MJ, Wang J, Turk J, Gross RW. Depletion of intracellular calcium

stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A₂. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization. *J Biol Chem.* 1997 Jan 17; 272(3):1522-6.

153.- Smani T, Rodríguez-Domínguez A, Hmadcha A, Calderón-Sánchez E, Horrillo-Ledesma A, Ordóñez A. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ and store operated pathway in urocortin-induced vasodilation of rat coronary artery. *Circ Res.* 2007; 101 (11):1194-203.

154.- Bhawanjit K. Brar, Anne K. Jonassen, Elena M. Egorina, Alon Chen, Alejandra Negro, Marilyn H. Perrin, Ole D., David S. Latchman, Kuo-Fen Lee, and Wylie Vale. Urocortin-II and Urocortin-III Are Cardioprotective against Ischemia Reperfusion Injury: An Essential Endogenous Cardioprotective Role for Corticotropin Releasing Factor Receptor Type 2 in the Murine Heart. *Endocrinology* 2004; 145 (1):24–35

155.- Bhawanjit K. Brar, Anastasis Stephanou, Anne Okosi, Kevin M. Lawrence, Richard A. Knight, Michael S. Marber, David S. Latchman. CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Molecular and Cellular Endocrinology* 158 (1999) 55–63

156.- Kevin M. Lawrence, Tiziano M. Scarabelli, Lance Turtle, Anastasios Chanalaris, Paul A. Townsend, Christopher J. Carroll, Mike Hubank, Anastasis Stephanou, Richard A. Knight and David S. Latchman. Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium insensitive phospholipase A₂ gene expression. *FASEB* 2003; Oct 16

157.- Miriam T. Rademaker, Vicky A. Cameron, Christopher J. Charles and A. Mark Richards. Integrated hemodynamic, hormonal, and renal actions of urocortin 2 in normal and paced sheep: beneficial effects in heart failure. *Circulation* 2005; 112; 3624-3632

158.- Baghelai K, Graham LJ, Wechsler AS, Jakoi ER. Delayed myocardial preconditioning by alpha1-adrenoceptors involves inhibition of apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 May;117(5):980-6.

- 159.- Miura T, Goto M, Urabe K, Heñido A, Shimamoto K, Limura O. Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning? *Circulation*. 1991; 84: 2504-2512.
- 160.- Kida M, Fujiwara H, Ishida M, Kawai Ch. Et al. Ischemic preconditioning preserves Creatine Phosphate and intracellular pH. *Circulation*. 1991; 84: 2495-2503.
- 161.- Tofukuji M, Metais C, Li J, Hariawala M, et al. Effects of ischemic preconditioning on myocardial perfusion, function and microvascular regulation. *Circulation*. 1998; 98 (II): 197-205.
- 162.- Harken AH, Simson MB, Haselgrove J, and others. Early ischemia after complete coronary ligation in the rabbit, dog, pig and monkey. *Am J Physiol*. 1981; 241: 202-210.
- 163.- de Jaegere PPT, Suyker WJL. Off pump coronary artery bypass surgery. 2008. *Heart*; 88: 313-318.
- 164.- Pöling J, Rees W, Mantovani V, Klaus S, Bahlmann L, Ziaukas V, Hübner N, Warnecke H. Evaluation of myocardial metabolism with microdialysis during bypass surgery with cold blood-or Calafiore cardioplegia. *European J of Cardio-Thoracic Surg*. 2006. (30) 597-603.
- 165.- Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Yano T, Tezuka H, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokota Y, Nakamura T, Obata J, Kanazawa M, Kawabata K, Hanasaki K, Kugiyama K. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2- deficient mice. 2008. *Circulation*. 117: 2977-2985.
- 166.- Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Schuler M, Bugge F, Mayer H, Grau AJ. Course of platelet activation markers after ischemic stroke. 2002. *Stroke*. 33: 2570-2574.
- 167.- Xu Y, Huo Y, Toufektsian MC, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD, French BA, Yang Z. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. 2006. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290: H692- H699.
- 168.- James D. McCully, Masahisa Uematsu, Robert A. Parker and Sidney

Levitsky. Adenosine-enhanced ischemic preconditioning provides enhanced postischemic recovery and limitation of infarct size in the rabbit heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 116: 154-162.

169.- Eric L. Kilpatrick, Prakash Narayan, Robert M. Mentzer Jr. and Robert D. Lasley. Adenosine A3 agonist cardioprotection in isolated rat and rabbit hearts is blocked by the A1 antagonist DPCPX. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H847-H853.

170.- Manché A, Phil M, Edmondson SJ, Hearse DJ. Dynamics of early postischemic myocardial functional recovery. Evidence of reperfusion-induced injury? *Circulation.* 1995; 92: 526-534.

171.- Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Alpha 1-adrenergic agonist precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein Kinase C. *Circ. Res.* 1994; Sep 75(3): 576-585.

172.- Olafsson B, Forman MB, Puett DW, 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.

173.- Goto M, Miura T, Hiodoromitis EK, O'Leary EL, Ishimoto R, Yellon DM, Shimura O. Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. *Cardiovasc Res.* 1991; 25(11): 943-949.

174.- Lasley RD, Hegge JO, Noble MA and Mentzer RM Jr. Comparison of interstitial fluid and coronary venous adenosine levels in in vivo porcine myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(6): 1137-1147.

175.- Alfredo Gamboa, Andrew C. Ertl, Fernando Costa, et al. Blockade of nucleoside transport is required for delivery of intraarterial Adenosine into the interstitium. Relevance to therapeutic preconditioning in humans. *Circulation.* 2003; 108: 2631-2635.

176.- Vicent M. Figueredo, Ivan Diamond, Hui-Zhong Zhou and S. Albert Camacho. Chronic dipyridamole therapy produces sustained protection against

cardiac ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.*1999; 277: H2091-H2097.

177.- Susana M. Mosca, Ricardo J. Gelpi and Horacio E, Cingolani. Adenosine and dipyridamole mimic the effects of ischemic preconditioning. *J Moll Cell Cardiol.* 1994; 26: 1403-1409.

178.- Ahn HS, Crim W, Romano M, Sybertz E, Pitts B. Effects of selective inhibitors on cyclic nucleotide phosphodiesterases of rabbit aorta. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 3331- 3339.

179.- Aktas B, Utz A, Hoening-Liedl P, Walter U, Geiger J. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signalling in human platelets. In vitro and in vivo/ex vivo studies. 2003. *Stroke.* 34: 764-769.

180.- Goto M, Liu Y, Yang X-M, Ardell JL, Cohen MV, and Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 77: 611–621, 1995.

181.- de Jong JW, de Jonge R, Keijzer E, Bradamante S. The role of adenosine in preconditioning. *Pharmacol ther.* 2000; 87: 141-149.

182.- Guro Valen. Cellular signalling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. *Ann Med.* 2003; 35: 300-307.

183.- Hossein Ardehali, Brian O'Rourke. Mitochondrial KATP channels in cell survival and death. *J of Mol and Cell Cardiol.* 39 (2005) 7–16.

184.- David J. Mancuso, Dana R. Abendschein, Christopher M. Jenkins, Xianlin Han, Jeffrey E. Saffitz, Richard B. Schuessler, and Richard W. Gross. Cardiac Ischemia Activates Calcium-independent Phospholipase A2, Precipitating Ventricular Tachyarrhythmias in Transgenic Mice. Rescue of the lethal electrophysiologic phenotype by mechanism-based inhibition. *J Biol Chem* ; 2003: Vol. 278, No. 25, June 20

185.- Scott D. Williams and Roberta A. Gottlieb. Inhibition of mitochondrialcalcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) attenuates

mitochondrial phospholipids loss and is cardioprotective. *Biochem J.* 2002; 362: 23-32.

186.- Williams SD, Hsu FF, Ford DA. Electrospray ionization mass spectrometry analyses of nuclear membrane phospholipid loss after reperfusion of ischemic myocardium. *J Lipid Res.* 2000 Oct; 41(10):1585-95.

187.- Knight RA, Chen-Scarabelli C, Yuan Z, et al. Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett.* 2008; 582: 984-990.

188.- Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, et al. The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 3697-3702.