

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

Francisco Correa-Segura,* Cecilia Zazueta*

RESUMEN

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

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

ABSTRACT

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

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

* Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México, DF.

Correspondencia:

M en C. Francisco Correa Segura
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano Núm. 1, Col. Sección XVI, 04480 México, D.F., E-mail. correasegura@salud.gob.mx

Recibido: 21-05-2008

Aceptado: 25-07-2009

INTRODUCCIÓN

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

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

En el estudio del miocardio isquémico-reperfundido, tan variados son los mecanismos de daño, como las estrategias descritas para su protección. Destacan los tratamientos con sustancias antioxidantes, la utilización de fármacos que actúan sobre el calcio intracelular y de compuestos que previenen la disfunción mitocondrial.⁷⁻⁹ Sin embargo, hay alternativas de naturaleza mecánica que han demostrado ser altamente efectivas. A pesar de que las estrategias que trataremos en esta revisión son relativamente nuevas, cabe mencionar que la idea nace desde los años 80; entonces se observó que la reperfusión de bajo flujo en comparación con la reperfusión de flujo normal, mejoraba la actividad contráctil del corazón, re-

duciendo parcialmente el daño por reperfusión.¹⁰ En concreto, en esta revisión se tratará de las dos estrategias mecánicas más estudiadas a la fecha, la primera de ellas consiste en la adaptación del corazón a la hipoxia crónica, mediante una serie de oclusioniones breves antes de una isquemia prolongada y del restablecimiento del flujo coronario. Esta maniobra, conocida como pre-acondicionamiento aumenta la recuperación de la función cardíaca y reduce el tamaño del infarto.¹¹ La segunda estrategia fue reportada en el año 2003 por el grupo de Zhao, demostraron que en un modelo canino episodios breves de isquemia-reperfusión llevados a cabo de forma cíclica después de un período prolongado de isquemia pero antes de establecer la reperfusión, reducen el tamaño del infarto.¹² El post-acondicionamiento tiene una clara ventaja sobre el pre-acondicionamiento al ponerlo en un escenario clínico, pues se podría aplicar a sujetos con infarto (isquemia). En esta revisión, se describirán los conceptos clásicos y los datos más recientes sobre los posibles mecanismos que intervienen en la protección derivada del pre-acondicionamiento y del post-acondicionamiento.

El pre-acondicionamiento

El primer reporte citado en la literatura referente a una maniobra mecánica fue en 1986, por el grupo de Murry y cols.¹¹ Su aportación más importante fue la observación de que el tamaño de infarto resultante de una isquemia de 40 minutos de duración, provocada por la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior en un modelo canino, podía ser reducido significativamente si el corazón se sometía a cuatro episodios breves de 5 minutos de isquemia, seguidos por 5 minutos de reperfusión antes de una isquemia prolongada (40 minutos). A este fenómeno se le llamó pre-acondicionamiento (PreC), y en su momento fue el mecanismo de protección fisiológica más poderoso. El grupo atribuyó el efecto protector a una rápida adaptación del metabolismo cardíaco en respuesta a la isquemia. La fácil reproducción del fenómeno en distintas especies animales, en poco tiempo convirtió al PreC en una maniobra cardioprotectora con buenos estándares.

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

24 a 72 horas después de la maniobra de PreC y de la reperfusión.

Mecanismos moleculares del pre-acondicionamiento

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

tores sobre las células cardíacas activan diferentes vías de señalización, contribuyendo a la protección del miocardio.

Papel de la adenosina

Uno de los hallazgos más importantes realizados en el estudio de maniobra de PreC es la participación de diversos receptores, los cuales incrementan su actividad en presencia de PreC. En el caso de los receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3), se sabe, que cuando se administra norepinefrina (un activador de estos receptores) durante la reperfusión, se estimula el efecto del PreC, en un modelo de corazón de rata.¹³

La liberación de adenosina no sólo promueve la generación de óxido nítrico (NO) en la maniobra de PreC, sino también activa a sus receptores, en particular al receptor A_2 . Este hecho se puso de manifiesto cuando se demostró que los efectos protectores del PreC desaparecían al administrar antagonistas selectivos de los receptores de adenosina A_2 .¹⁴ La ventana de efectividad del PreC está determinada por 2 factores: el primero es la concentración de adenosina, que debe ser lo suficientemente alta para inducir la generación de NO mediante la activación de los receptores de adenosina A_2 ; y el segundo factor es una baja concentración de xantina para evitar los efectos perjudiciales de ésta. Lo que está muy claro es que el bloqueo farmacológico de una vía o de un receptor involucrado en la cardioprotección inhiben el efecto protector del PreC, por el contrario, los activadores de los receptores mimetizan lo que ocurre en el PreC.

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

Durante la isquemia

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

En la reperfusión

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

Papel del óxido nítrico

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

Por otra parte, se ha demostrado también que el PreC inhibe la producción de las endotelinas, hecho que también ayuda a la mejoría de la microcirculación. No se ha detectado la forma inducible de la enzima iNOS en estas condiciones, lo que parece indicar que la iNOS podría participar en una fase tardía del PreC, situación que puede adquirir especial relevancia en el ámbito clínico.¹⁵

Vías de señalización molecular

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

La importancia de la proteína cinasa C (PKC) en la maniobra del pre-acondicionamiento fue reportado por el grupo de Mitchell y cols.¹⁶ La PKC es una serina/treoninacinasas que se activa por cofactores lipídicos. Existen múltiples isoformas de PKC en el corazón, cada una de las cuales tiene un sustrato específico. Las formas clásicas (α , β y γ) son dependientes de diacilglicerol (DAG) y de calcio. Las isoformas (δ , η y ϵ) son independientes de la concentración de calcio y sólo necesitan DAG. La inhibición específica de la PKC con estaurosporina bloquea el desarrollo del PreC. Por el contrario, la estimulación de la PKC con ésteres de forbol o con DAG puede mimetizar la protección brindada por el PreC.¹⁷ Los eventos intracelulares que ocurren luego de la activación de la PKC son de gran interés en la actualidad y es por esta razón que se están desarrollando numerosas investigaciones en este sentido. Las tirosina cinasas, de la misma manera que la PKC, pertenecen a una familia de enzimas que tienen la capacidad de fosforilar proteínas. Las tirosina cinasas fosforilan los residuos tirosina de determinadas proteínas y juegan un papel importante como mediadoras en muchos eventos que involucran señales de transducción intracelular. Se ha sugerido que estas dos vías forman parte de una cascada de señalización. Al administrar a corazones reperfundidos un inhibidor de la tirosina cinasa junto con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), un activador directo de la PKC, se observó que el PMA redujo el tamaño de infarto en forma similar al pre-acondicionamiento. Sin embargo, dicha protec-

ción desapareció cuando se administró el inhibidor de la tirosina cinasa.¹⁸ Si la PKC y la tirosina cinasa están involucradas en el fenómeno de PreC, es probable que estos dos componentes sean un paso más de una larga cascada de cinasas. Una de las mayores cascadas de cinasas, por lo menos en el corazón de mamífero, es la de la familia de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAP cinasas). Estas enzimas pueden ser activadas por tirosina cinasas, PKC, proteínas G acopladas a receptores y ciertos tipos de estrés celular. Existen al menos tres cascadas de MAP cinasas identificadas en el corazón, éstas son: las cinasas reguladas extracelularmente (ERK) y dos familias de MAP cinasas activadas por estrés oxidativo: la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la p38/cinasa reactivadora. La cascada que involucra la MAP-ERK es la mejor estudiada, es activada por factores de crecimiento y receptores acoplados a proteínas G₂₇. Sin embargo, no existe evidencia experimental que involucre a esta cinasa en el PreC. Por el contrario, las MAP cinasas JNK y/o p38 podrían intervenir en el PreC. Existen al menos dos isoformas de MAP-JNK en el corazón: MAP-JNK1 y MAP-JNK229. De gran importancia es el hecho que las dos isoformas de la MAP-JNK están activadas durante la reperfusión. Se ha demostrado que MAP-JNK1 y MAP-JNK2 son activadas por la reperfusión, pero no son modificadas por la isquemia; de esta manera, breves períodos de isquemia seguidos por breves períodos de reperfusión (tal como ocurre en el PreC) podrían activar la cascada que involucra a la MAP-JNK. Además, la estimulación de receptores acoplados a una proteína G y de la PKC también podrían activar la MAP-JNK. Otro miembro de estas cinasas es la MAP-KAPK-2, que fosforila una proteína de choque térmico denominada HSP27. La fosforilación de la HSP27 promueve la polimerización de los filamentos de actina, incrementando la estabilidad del citoesqueleto. La sobreexpresión de HSP27 en miocitos aislados de rata les confirió protección frente a la isquemia, mientras que la disminución en la expresión de esta proteína exacerbó el daño isquémico.¹⁹ Además, se sabe que isquemias prolongadas (30 minutos) provocan que el citoesqueleto se desordene. Así, la activación de la cascada de la MAP cinasa p38/HSP27 podría explicar los efectos benéficos del PreC sobre el citoesqueleto celular.

Canales de potasio dependientes de ATP

Los canales de potasio (K⁺ ATP) han sido involucrados como parte de los mecanismos activados por el

PreC. Los canales de K^+ ATP se han descrito en diversos tejidos. Estos canales son de conductancia intermedia y se inhiben por concentraciones fisiológicas de ATP. En la actualidad se sabe que otros moduladores endógenos modifican la actividad de estos canales. Entre ellos podemos destacar el pH, los ácidos grasos, el óxido nítrico, nucleótidos y varios ligandos (adenosina, acetilcolina, benzopirenos, cianoguanidinas). En cuanto al PreC, en un principio se pensó que los canales involucrados eran los ubicados en el sarcolema y que éstos activaban un efecto protector al acortar la duración del potencial de acción. Sin embargo, se ha demostrado que los canales involucrados en el PreC son los ubicados en la mitocondria (mito K^+ ATP). Estos canales son similares estructuralmente a los de la membrana plasmática, pero presentan importantes diferencias en lo que respecta a su respuesta farmacológica. No está claro, por lo menos hasta este momento, por qué la apertura de los mito K^+ ATP podría tener efectos cardioprotectores,²⁰ sin embargo se ha sugerido que la apertura de los mito K^+ ATP despolariza la membrana mitocondrial interna con la consecuente entrada de K^+ al interior de la mitocondria, reduciendo la entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial y evitando la formación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Datos recientes apoyan que los mito K^+ ATP pueden actuar como otros mediadores en la transducción de señales del PreC. El grupo de Wang y cols. (1999),²¹ describió que la protección brindada por el diazóxido (un activador de canales mito K^+ ATP) puede ser anulada con la administración de un antagonista de la PKC. Así, la apertura de los mito K^+ ATP sería un paso más en la cadena de eventos intracelulares que ocurren en el PreC. Se conoce mucho acerca de los mecanismos intracelulares involucrados en el PreC, pero una interrogante sin contestar sigue siendo cuál es el efector final responsable de la protección miocárdica.

Finalmente, es preciso señalar que la mayoría de los estudios que han evaluado los efectos del PreC se han realizado en modelos de animales sanos y pocos lo han hecho en animales con algún tipo de patología (hipertrofia, hipercolesterolemia, etc.). En este sentido hay que destacar que entre el 30 y 40% de los pacientes con cardiopatía isquémica, presentan algún grado de hipercolesterolemia, por lo tanto, sería relevante para comprender el mecanismo involucrado en el fenómeno de isquemia y reperfusión utilizar por ejemplo, animales con niveles elevados de colesterol en sangre. Al respecto se han hecho algunos estudios que han ofrecido resultados contradictorios. El grupo

de Ferdinandy en 1998,²² observó que la protección por el PreC se mantenía en animales hipercolesterolémicos, al igual que en ratas control pre-tratadas con farnesol (un metabolito intermediario en la síntesis del colesterol). Por otro lado, se ha demostrado que el efecto protector del PreC se pierde con una dieta hipercolesterolémica en conejos; sin embargo, al tratar a los animales con pravastatina, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, se recuperó la cardioprotección por PreC.²³

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

El post-acondicionamiento

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

El post-acondicionamiento se presenta como un “nuevo” mecanismo de protección endógena con ma-

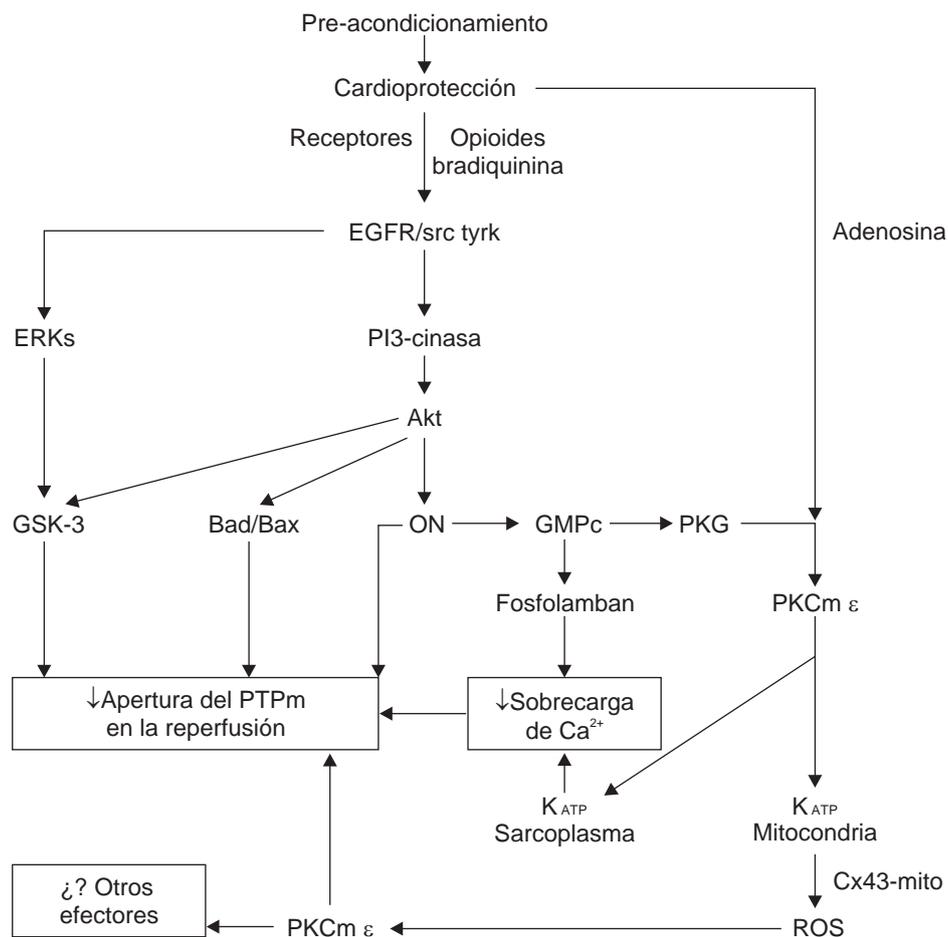


Figura 1. Esquema que representa algunas de las vías que están involucradas en la cardioprotección, activadas por el preacondicionamiento. La maniobra de preacondicionamiento promueve la acumulación de varios ligandos acoplados a receptores de proteína G, como los opioides y bradiquinina. Akt fosforila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

Modificado de Ferdinandy P., 1998.²²

yores posibilidades de ser extrapolado al ámbito clínico, particularmente en aquellos pacientes sometidos a angioplastia primaria.

Efecto protector del post-acondicionamiento (PC)

Dependiendo de la especie, el modelo o los factores que active la maniobra del PC logra reducir el ta-

maño del infarto hasta en un 70% respecto a un corazón con la misma área de riesgo (corazón control). Estos hallazgos han sido comprobados por un gran número de grupos de investigación, incluyendo el nuestro. Además, se ha demostrado que muchos de los eventos que ocurren durante los primeros minutos de la reperfusión (Cuadro II) son revertidos por el PC.

Cuadro 2. Algunos eventos que ocurren con el inicio de la reperfusión y que el post-acondicionamiento revierte. Modificado de Vinten J., 2007.²⁵

Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Células endoteliales
Neutrófilos
Expresión de P-selectina
Disfunción de células endoteliales
Daño en la síntesis y en la liberación de óxido nítrico
Expresión de citocinas
Factor de necrosis tumoral α
Interleucinas 6 y 8
Recalcalinización
Activación del intercambiador sodio-protón (Na/H)
Acumulación masiva de calcio
En la mitocondria
En citosol
Apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial
Activación de cinasas de rescate (PI-3Cinasa, ERK_{1/2})
Hipercontractura

Mecanismos propuestos activados por el post-acondicionamiento

Efecto del pH

El grupo de Cohen y cols. (2007),²⁵ reportó que una lenta reintroducción de oxígeno y una acidosis prolongada del tejido durante la reperfusión, mejoraba la condición del corazón frente a la reperfusión, esta protección se redujo en presencia de agentes alcaloides, así como con atrapadores de radicales libres, como el N-2-mercaptopropilglicina. Estos datos sugieren que la viabilidad del tejido cardíaco tras el PC, podría estar relacionado con un ambiente ácido o un pH bajo en el tejido. En este sentido, se sabe que un pH ácido evita la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). En esta condición, la reintroducción gradual de oxígeno podría reducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el tejido, evitando el estrés oxidativo por efecto de la reperfusión. Sin embargo, a la fecha no se ha medido el pH, ni los productos ácidos generados durante la maniobra de PC.

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

La evidencia experimental sugiere que en los primeros minutos de la reperfusión se mimetiza lo que ocurre durante la respuesta inflamatoria. En ambos casos, hay activación de neutrófilos, así como activación de

células endoteliales; conforme avanza el tiempo de reperfusión hay reclutamiento de neutrófilos que de inicio se adhieren al endotelio y finalmente migran al parénquima. Tanto los neutrófilos como las células endoteliales sintetizan mediadores pro-inflamatorios (factor de necrosis tumoral α [FNT α], interleucina 6 [IL-6], IL-8) así como ERO que en pocos minutos causan daño tisular irreversible.

Se ha demostrado que la maniobra de PC disminuye la disfunción endotelial, reduce la adherencia de neutrófilos al endotelio, así como su acumulación en el miocardio reperfundido y que además no hay acumulación de FNT α .²⁶ Por otro lado, se ha observado cardioprotección al depletar la población de neutrófilos en modelos de oclusión coronaria en rata utilizando antisueros. De manera separada, tanto la depleción de neutrófilos como el PC redujeron el tamaño del infarto. Sin embargo, la combinación de ambas no potenció el efecto de la maniobra. Se sabe que los neutrófilos, al igual que los oxidantes y las moléculas proinflamatorias contribuyen de manera significativa a la patogénesis del daño por reperfusión, entonces es concebible que los mecanismos que los regulan pueden estar mediados por el PC.

Proteína G acoplada a receptores

La proteína G acoplada a receptores (GRP) ha sido implicada en la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento. La estimulación de esta proteína por adenosina u opioides al inicio de la reperfusión, está asociada con una disminución en el tamaño del infarto.²⁷ Basta la estimulación de uno de los receptores para producir un efecto protector. Es muy interesante el hecho de que el bloqueo de los receptores inhibe el efecto protector del PC frente a la reperfusión. A continuación se revisará a detalle la implicación de la proteína G y de sus tres principales receptores en el post-acondicionamiento:

— Receptores de adenosina

De los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), los receptores A_{2A} y A_3 tienen un efecto cardioprotector cuando se activan durante la reperfusión.²⁸ Se ha demostrado que la administración de agonista del receptor A_{2A} (ATL146e) reduce el tamaño del infarto en un modelo de ratón normal, pero no tiene efecto al administrarlo en un modelo de ratón *knock-out* para el receptor A_{2A} . Estos resultados sugieren que la adenosina actúa atenuando el daño por reperfusión a través de un mecanismo antiinflamatorio. De acuerdo con estas observaciones,

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

— Receptores de bradiquinina

El grupo de Yang y cols. (2004)³⁰ reportó que la administración de bradiquinina durante la reperfusión reduce el tamaño del infarto a través un mecanismo relacionado con la inducción de cinasas de sobrevivencia y la vía de producción de óxido nítrico. El grupo de Bell y cols. (2003),³¹ reportó resultados similares en un modelo de isquemia y reperfusión. Lamentablemente, a la fecha no hay ningún reporte que relacione la administración de la bradiquinina y el PC.

— Receptores a opioides

Se conocen tres subtipos de receptores a opioides μ , δ y el κ . Los receptores δ y κ se expresan en cardiomiocitos. En el corazón se sintetizan tres péptidos opioides: endorfinas, enkefalinas y dinorfinas. La liberación de los péptidos opioides y la subsiguiente estimulación de los receptores δ y κ en corazón ofrecen cardioprotección. Así pues, se ha demostrado que la administración de opioides de manera exógena al inicio de la reperfusión disminuye el tamaño del infarto.³² Sin embargo, la estimulación del receptor opioide κ durante el periodo de reperfusión no ofrece ninguna cardioprotección, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de la activación de estos receptores obedece a la activación de cinasas de salvamento (RISK). En este sentido se ha identificado la participación de la GSK3, pues al ser fosforilada y por tanto inactivada, se obtiene un efecto cardioprotector. En este escenario de síntesis y liberación de péptidos opioides por el corazón, en modelos de isquemia/reperfusión, queda claro que estos péptidos juegan un

papel parcial en la cardioprotección derivada del PC. El grupo de Kin y cols. (2005),³³ ha descrito la participación de los péptidos opioides en un modelo de PC; este grupo observó que el efecto del PC se pierde al administrar naloxona, este agonista bloquea en particular los receptores δ y κ , cuando se administra 5 minutos antes de la reperfusión.

Otras vías de señalización en el post-acondicionamiento

— PI3K y ERK_{1/2}

Después de la maniobra de post-acondicionamiento, se activan cinasas de sobrevivencia al daño por reperfusión RISK, por sus siglas en inglés (*Reperfusion Injury Survival Kinase*), la PI3K y la MEK-ERK_{1/2}. La vía de activación de la cinasa PI3K/AKT está ligada a la síntesis de óxido nítrico, este último es un importante regulador de la cardioprotección mediada por PC. La participación de esta cinasa y su relación con la síntesis de óxido nítrico ha llevado a sugerir que los canales de potasio mitocondriales activados por ATP y el poro de la transición de la permeabilidad (PTPm) son mecanismos blancos de la cardioprotección derivada del PC (*Figura 2*). La regulación de este PTPm es crucial, ya que es un punto clave en la supervivencia o en la muerte celular. Por otro lado, la inhibición de la actividad de la cinasa PI3K limita la reducción del tamaño del infarto en corazones que se sometieron a la maniobra de PC. De igual manera la activación de la cinasa MEK-ERK_{1/2} es un punto clave en la protección de un corazón con la maniobra de PC. Se sabe que la estimulación de la MEK-ERK_{1/2} durante los primeros minutos de la reperfusión abate los efectos de la reperfusión, por otro lado la inhibición farmacológica de la MEK-ERK_{1/2} inhibe el efecto del PC en un modelo de corazón aislado de conejo. La participación de ambas cinasas es consistente con la estimulación de la GPCR (proteína G acoplada a receptores) por ligandos endógenos.³⁴

— Proteína cinasa C (PKC)

La proteína cinasa C ha sido un elemento clave en la cardioprotección derivada tanto del pre como del post-acondicionamiento. Se sabe que los ligandos de la GPCR estimulan a la fosfolipasa C y la generación de inositol trifosfato y diacilglicerol que estimulan la actividad de la PKC. En modelos murinos, se sabe que las isoformas de la PKC que predominan son la δ y la ϵ , ambas isoformas están involucradas en la patogénesis del daño por isquemia/reperfusión. La isoforma δ se transloca a la mitocondria en los primeros minutos de la reperfusión, induciendo una mayor

producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la translocación de PKC δ se ha relacionado también con disfunción mitocondrial y con liberación de citocromo C.³⁵ Por otro lado, la isoforma ϵ de la PKC tiene la particularidad de inhibir la formación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. El grupo de Zatta y cols. (2006),³⁷ reportó que en un modelo de PC en rata, el uso de un agonista no selectivo de la PKC (queleritrina) inhibe el efecto cardioprotector del PC. El grupo de Penna y cols. (2006), obtuvo resultados similares al usar un inhibidor de la PKC ϵ (KIE-1). Observaron que el tamaño del infarto no disminuyó en presencia del inhibidor en corazones post-acondicionados.^{36,37} La maniobra del PC incrementa los niveles de la PKC ϵ respecto a un miocardio sin la maniobra, lo cual sugiere que además de ser translocada a la mitocondria, la PKC ϵ también se transloca a otros sitios. Por el contrario, la translocación de la isoforma PKC δ se reduce en corazones post-acondicionados. Los resultados hasta el momento sugieren que la cardioprotección del PC es dependiente de la actividad de la PKC y que la maniobra mecánica incrementa los niveles de PKC ϵ , que a su vez reprime los efectos no protectores de la PKC δ .²⁹

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

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

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

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

En la maniobra de post-acondicionamiento se ha propuesto que hay una reducción en la producción de ERO y ésta podría ser un mecanismo de cardioprotección en la maniobra mecánica frente a la reperfusión. Se ha demostrado en cultivos celulares que la exposición parcial (reducida) a oxígeno disminuye la formación de ERO, simulando lo que podría ocurrir en el PC. En este modelo se demostró que la disminución en la generación de $O_2^{\cdot-}$ está asociada con la reducción de la sobrecarga de calcio en la mitocondria y con la inhibición de la muerte celular.³⁹ En modelos animales se ha asociado la maniobra de PC con una menor señal del dihidroéolidio, que se utiliza como un detector del estado oxidativo celular en el miocardio. Este resultado concuerda con la reducción en la lipoperoxidación de lípidos de membrana que reportan muchos grupos de investigación en modelos de oclusión coronaria con maniobra de PC y reperfusión.^{12,40} Además, se ha demostrado que la maniobra de PC atenúa la generación de ERO del endotelio vascular coronario en el área reperfundida, después de 24 horas de reperfusión. Esta reducción es en parte responsable de preservar la función endotelial del epicardio de las arterias coronarias, en un modelo *in vivo* de corazón con PC.⁴¹ A pesar de los datos que demuestran que el post-acondicionamiento reduce la generación de ERO, hay un grupo de investigación que ha perfundido antioxidantes como N-acetil-cisteína al

inicio de la reperfusión y que ha demostrado que el efecto cardioprotector del PC se pierde por efecto de este antioxidante, dejando claro el efecto dual de los mismos.⁴² Por otro lado, se sabe que el PC mantiene las reservas antioxidantes del miocardio. Se ha demostrado que el PC mantiene los niveles de glutatión (GSH), el mayor sistema celular antioxidante, así, el PC no sólo evita el estallido del estrés oxidativo en el miocardio por ERO, sino que también mantiene los niveles de antioxidantes endógenos.⁴³

Sobrecarga de calcio

En los primeros minutos de la reperfusión hay una acumulación masiva de calcio en el citosol, el cual es responsable de activar fosfolipasas, proteasas y nucleasas. En la mitocondria, el Ca^{2+} entra a través del uniportador de calcio, permitiendo la acumulación masiva de este ion en el organelo, promoviendo la apertura de un poro no específico transmembranal (PTPm) y un aumento en la generación de ERO, estos procesos conllevan a la muerte celular,⁴⁴ en este sentido se sabe que evitando la sobrecarga de calcio durante la reperfusión, con inhibidores específicos de la entrada masiva de calcio (por ejemplo el Ru360), se inhibe el daño por reperfusión en un modelo de corazón aislado.^{45,46}

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

Transición de la permeabilidad mitocondrial

La génesis de la lesión por reperfusión después de un período de isquemia, está íntimamente ligada a la función mitocondrial. La transición de la permeabilidad mitocondrial se caracteriza por la apertura de un poro no específico dependiente de voltaje entre las membranas interna y externa mitocondrial, que se denomina poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). La formación de este poro provoca un colapso total del potencial de membrana, el desacoplamiento de la cadena respiratoria y sirve como vía de salida a pequeñas moléculas $\leq 1,500$ Da y a otros factores proapoptóticos que promueven el inicio y la ejecución de la necrosis o apoptosis. Una pieza clave en el daño de la reperfusión es la regula-

ción de la apertura de este poro, pues la sobrecarga de calcio, así como el estallido del estrés oxidativo son fenómenos que promueven su apertura durante los primeros minutos de la reperfusión. Otros inductores de la apertura de este poro durante la reperfusión son la alcalinización del pH intracelular y la fosforilación de proteínas cinasas, entre otros factores. Es por ello que la inhibición farmacológica de este poro con ciclosporina A, o con análogos de este inmunosupresor, evitan el daño por reperfusión. En cuanto a la regulación de este poro durante la maniobra de post-acondicionamiento, se sabe que mitocondrias aisladas de corazones sometidos a la maniobra de PC, son igual de resistentes a la inducción de la transición de la permeabilidad, que las de corazones perfundidos con un análogo de la ciclosporina A.⁴⁸ Experimentos posteriores demostraron que la disminución en la apertura del PTPm se debía a la participación de la fosforilación de la proteína cinasa AKT.⁴⁹

El papel del post-acondicionamiento en la apoptosis

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

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

El conocimiento del papel de la apoptosis en la cardioprotección por post-acondicionamiento es limitado. Se sabe que el PC inhibe a proteínas cinasas como la JNK y la p38MAPK que son reguladores del factor pro-apoptótico BAX. De este modo se ha sugerido que podría haber una disminución en la señalización apoptótica por BAX.⁵² Este posible mecanismo y algunos otros discutidos en la revisión se encuentran esquematizados en la *figura 2*.

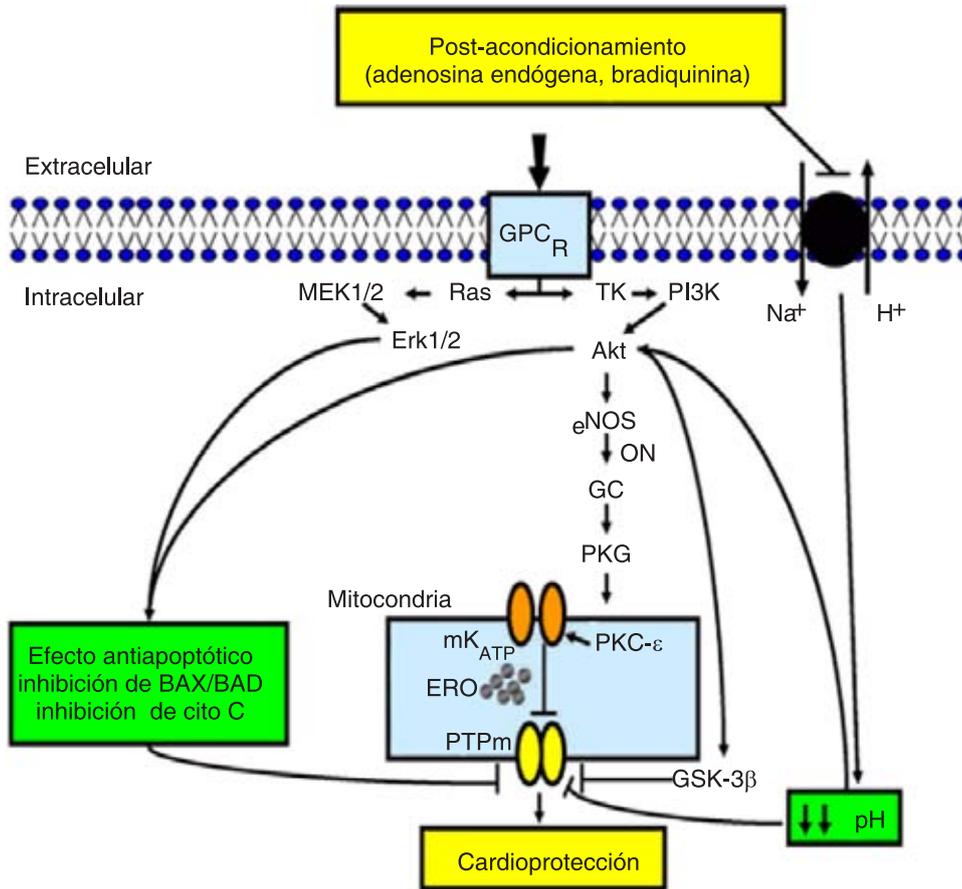


Figura 2. Este esquema muestra la relación entre diversos mecanismos de cardioprotección activados por el post-acondicionamiento. Muchas de las vías de la señalización convergen en la mitocondria y en específico en el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), la formación de este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

Modificado de Hausenloy D., 2007.⁵³

CONCLUSIONES

No cabe duda que la reperfusión es el único mecanismo para salvar al corazón de un daño isquémico. Sin embargo, las propuestas que veían a la reperfusión como una etapa oportuna de cardioprotección han quedado de lado, en el sentido de ver al tiempo de reperfusión como una oportunidad de aplicar cualquier tipo de terapias que indujera cardioprotección. A pesar de los cientos de trabajos que han propuesto aplicar estrategias cardioprotectoras al tiempo de la reperfusión, sólo unas pocas han sido puestas en práctica.⁵² En este sentido, el mejor entendimiento de los mecanismos que ocasionan el daño por reperfusión nos permitirá acercarnos hacia nuevas opciones terapéuticas. La maniobra de pre-acondicionamiento, que en modelos animales es una estrategia infalible frente al daño por reperfusión, no es aplicable en humanos, debido a que no se puede determinar el momento en el que una persona sufrirá un evento isquémico. Por otro lado, la maniobra de post-acondicionamiento reduce significativamente el daño por reperfusión y,

aunque los mecanismos que activa no están del todo claros, tiene amplias posibilidades de ser aplicada en seres humanos, representando una estrategia cardioprotectora superior a la producida por cualquier fármaco aplicado durante la reperfusión. La maniobra de post-acondicionamiento ha puesto de manifiesto la importancia de los primeros minutos de la reperfusión, que son determinantes, por ejemplo, para el desarrollo del tamaño del infarto. Al limitar el daño del miocardio con una manipulación de naturaleza mecánica, que luce simple en su implementación, podría obtenerse un beneficio clínico terapéutico, sobre todo en los terrenos de la cirugía de revascularización coronaria y en la terapia intervencionista. Es por ello que, con base en las evidencias experimentales, quienes trabajamos para instituciones involucradas en el estudio y tratamiento del corazón, debemos impulsar la utilización de estrategias alternativas que disminuyan la mortalidad y aumenten la sobrevivencia de los pacientes, teniendo presente que en México como en el mundo, las enfermedades isquémicas ocupan los primeros lugares en las estadísticas de mortalidad.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

1. Becker LC, Ambrosio G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis.* 1987; 30: 23-44.
2. Forman MB, Virmani R, Puett DW. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 1990; 81: 69-78.
3. Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res.* 1992; 26: 101-8.
4. De Moissac D, Gurevich R, Zheng H, Singal P, Kirshenbaum L. Caspase activation and mitochondrial C release during hypoxia-mediated apoptosis of ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 53-63.
5. Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R, Brown G. Release of mitochondrial cytochrome C and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischemia. *Biochem Biophys Acta.* 2001; 1537: 101-9.
6. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin, Kostin S, Zimmermann R, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 197-208.
7. Haramaki N, Packer L, Assadnazar H, Zimmer G. Cardiac recovery during post-ischemic reperfusion is improved by combination of vitamin E with dihydrolipoic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 196: 1101-7.
8. Yoon S, McMillin-Wood J, Michael L, Lewis R, Entman M. Protection of canine cardiac mitochondrial function by verapamil-cardioplegia during ischemic arrest. *Circ Res.* 1985; 56: 704-8.
9. García-Rivas G de J, Guerrero-Hernández A, Guerrero-Serna G, Rodríguez-Zavala J, Zazueta C. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in the post-ischemic heart. *FEBS J.* 2005; 272: 3477-88.
10. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986; 92: 613-20.
11. Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124-36.
12. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H579-H588.
13. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res.* 1993; 73: 656-70.
14. Peralta C, Hotter G, Clossa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999; 29: 126-32.
15. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1200-8.
16. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res.* 1995; 76: 73-81.
17. Downey J, Cohen M, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: The role of adenosine and protein kinase C. In: Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 723: 82-98.
18. Baines C, Cohen M, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: The role of kinases and mitochondrial KATP channels. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999; 10: 741-54.
19. Cohen M, Baines C, Downey J. I schemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol.* 2000; 62: 79-109.
20. Gross G, Fryer R. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res.* 1999; 84: 973-9.
21. Wang Y, Hirai K, Ashraf M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res.* 1999; 85: 731-41.
22. Ferdinandy P, Csonka C, Csont T, Szilvassy Z, Dux L. Rapid pacing- induced preconditioning is recaptured by farnesol treatment in hearts of cholesterol-fed rats: role of polyprenyl derivatives and nitric oxide. *Mol Cell Biochem.* 1998; 186: 27-34.
23. Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34: 2120-5.
24. Vinten-Johansen J. Postconditioning: a mechanical maneuver that trigger biological and molecular cardioprotective response to reperfusion. *Heart Fail Rev.* 2007; 12: 235-44.
25. Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: Staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation.* 2007; 115: 1895-1903.
26. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol.* 2002; 97: 268-75.
27. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, et al. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation.* 1987; 76: 1135-45.
28. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Ramos SI, Marshall M, Wang XQ, et al. Infarct-sparing effect of A2Adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation.* 2005; 111: 2190-7.
29. Philipp S, Yang X-M, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 308-14.
30. Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 36: 411-21.

31. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of P18K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 185-93.
32. Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 709-18.
33. Kin H, Zatta AJ, Jiang R, Reeves JG, Mykytenko J, Sorescu G, et al. Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by postconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38: 827.
34. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Post-conditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005; 111: 194-7.
35. Churchill EN, Szweda LI. Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 439: 194-9.
36. Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signaling. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 315-24.
37. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redoxsensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol.* 2006; 101: 180-9.
38. Ytrehus K, Myklebust R, Mjos OD. Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 1986; 20: 597-603.
39. Sun H-Y, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol.* 2005; 288: H1900-1908.
40. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg.* 2004; 78: 961-9.
41. Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, Kin H, Zatta AJ, Jiang R, et al. Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2007; 102: 90-100.
42. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redoxsensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol.* 2006; 101: 180-189.
43. Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion. *FASEB J.* 2005; 19: 354-61.
44. Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem.* 1988; 178: 489-501.
45. Correa F, Soto V, Zazueta C. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 787-98.
46. Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: H2321-H2328.
47. Sun H Y, Wang N P, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton R A, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H1900-H1908.
48. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005; 111: 194-7.
49. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovas Res.* 2006; 69: 178-85.
50. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 132-42.
51. Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis.* 2006; 11: 1583-93.
52. Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer RM, Balshaw D Jr, Lathrop DA. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res.* 2004; 95: 125-34.
53. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2007; 116: 173-91.