

Mecanismos de protección miocárdica a distancia

Remote Mechanisms of Myocardial Protection

MARÍA A. GOYENCHE¹, MARTÍN DONATO^{MTSAC, 1, 4, *}, DIAMELA T. PAEZ¹, MARIANA GARCÉS³, TIMOTEO MARCHINI³, VIRGINIA PEREZ^{1, 4}, MARTÍN GRINSPUN¹, JULIETA DEL MAURO², CHRISTIAN HÖCHT², PABLO EVELSON^{3, *}, RICARDO J. GELPI^{MTSAC, 1, 4, *}

RESUMEN

Introducción: Se ha propuesto que el preconditionamiento isquémico remoto (PCr) reduce el tamaño del infarto a través de la activación de una vía neuronal parasimpática. Sin embargo, los mecanismos intracelulares responsables de esta protección no se conocen completamente.

Objetivo: Describir algunas de las señales intracelulares que participan en la protección del miocardio, activadas por el PCr antes de la isquemia.

Material y métodos: Corazones aislados de ratas fueron sometidos a 30 minutos de isquemia global, seguidos de 120 minutos de reperfusión (I/R). En un segundo grupo, antes del aislamiento del corazón se realizó un protocolo de PCr (tres ciclos de isquemia/reperfusión en la arteria femoral izquierda); una vez finalizado, se repitió el protocolo del grupo I/R. Adicionalmente, se estudiaron cuatro grupos experimentales, en los que antes del PCr se realizó una vagotomía cervical bilateral [SV (sección vagal)] o se administró atropina (bloqueante de los receptores muscarínicos), L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO) y 5-HD (bloqueante de los canales mK_{ATP}^{+}), respectivamente. Se midieron el tamaño del infarto y la fosforilación de la eNOS en los grupos I/R, PCr y SV. Por otro lado, se midió la producción mitocondrial de H_2O_2 .

Resultados: El PCr redujo significativamente el tamaño del infarto y este efecto fue abolido por la SV y con los tratamientos con atropina, L-NAME y 5-HD. Además, el PCr incrementó la fosforilación de la eNOS y este efecto fue abolido por la SV. Finalmente, el PCr produjo un aumento de la producción de H_2O_2 mitocondrial, hecho que también fue abolido con la SV.

Conclusiones: El PCr activa una vía muscarínica vagal, que involucra la fosforilación de la eNOS, la apertura de los canales mK_{ATP}^{+} de la mitocondria y un aumento de la producción de H_2O_2 mitocondrial.

Palabras clave: Infarto del miocardio - Protección miocárdica - Precondicionamiento isquémico

ABSTRACT

Background: Remote ischemic preconditioning (rIPC) has been suggested to reduce infarct size through the activation of a parasympathetic neural pathway. However, the intracellular mechanisms responsible for this protection remain unclear.

Objective: The aim of this study was to describe some of the intracellular protective signals activated at the cardiac level by rIPC prior to myocardial ischemia.

Methods: Isolated rat hearts were subjected to 30 minutes of global ischemia and 120 minutes of reperfusion (I/R). In a second group, before the isolation of the heart, a rIPC protocol (three cycles of left femoral artery ischemia/reperfusion) was performed, followed by the I/R protocol. Additionally, four experimental groups were studied, in which prior to the rIPC protocol a bilateral cervical vagotomy [VS (vagal section)] was performed or atropine (muscarinic receptor blocker), L-NAME (NO synthesis inhibitor), and 5-HD (mK_{ATP}^{+} channel blocker) was administered, respectively. Infarct size and eNOS phosphorylation were measured in I/R, rIPC, and VS groups. Finally, mitochondrial H_2O_2 production was assessed.

Results: Remote ischemic preconditioning significantly decreased infarct size and this effect was abolished by VS and atropine, L-NAME, and 5-HD treatments. Furthermore, rIPC increased eNOS phosphorylation and this effect was abolished by VS. Finally, rIPC increased the mitochondrial H_2O_2 production, and this effect was also abolished by VS.

Conclusions: Remote ischemic preconditioning activates a muscarinic vagal pathway involving eNOS phosphorylation, opening of mitochondrial mK_{ATP}^{+} channels, and the production of mitochondrial H_2O_2 .

Key words: Myocardial Infarction - Myocardial Protection - Ischemic Preconditioning

REV ARGENT CARDIOL 2016;84:202-207. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v84.i3.8074>

Recibido: 28/01/2016 - Aceptado: 01/03/2016

Dirección para separatas: Ricardo J. Gelpi - Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires - J. E. Uriburu 950, 2° Piso (Sector A) - (C1114AAD) Buenos Aires, Argentina - Tel./Fax 54-11-5285-2701 - e-mail: rgelpi@fmed.uba.ar

Este trabajo recibió el Premio Prof. Dr. Bernardo Houssay en el 41 Congreso Argentino de Cardiología

^{MTSAC} Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (INFICA), Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

² Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

³ Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL, UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

⁴ Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL, UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

* Miembros del Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET)

Abreviaturas

5-HD	5-hidroxidecanoato	NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial	PC	Precondicionamiento clásico
ERO	Especies reactivas del oxígeno	PCr	Precondicionamiento isquémico remoto
I/R	Isquemia/reperfusión	PPC	Presión de perfusión coronaria
L-NAME	N ^c -nitro-L-arginina metil éster	SV	Sección vagal
mK⁺_{ATP}	Canales mitocondriales del potasio sensible al adenósil trifosfato		

INTRODUCCIÓN

El precondicionamiento isquémico remoto (PCr) es una estrategia a través de la cual breves ciclos de isquemia/reperfusión (I/R) realizados en un tejido u órgano remoto protegen al corazón del daño producido por un episodio de isquemia miocárdica prolongado. Diferentes autores han descrito que la transferencia de la señal cardioprotectora desde el órgano periférico hasta el corazón es el resultado de la acción de factores humorales, vías neurales o de una interacción neurohumoral. (1) En este sentido, demostramos que el PCr activa una vía neural y que la señal alcanza el corazón a través del nervio vago. De esta manera, la acetilcolina, liberada por las terminaciones nerviosas vagales, precondiciona al corazón activando receptores muscarínicos. (2) Sin embargo, en ese trabajo no estudiamos las señales de transducción, activadas a distancia, que participan del mecanismo intracelular del PCr. Algunos autores (1, 3) afirman que el PCr activa un mecanismo de señales similar al descrito para el precondicionamiento clásico (PC), mientras que otros muestran que la cardioprotección brindada por el PCr sigue un patrón diferente. (4) Heusch (5) describe algunas de las señales de transducción que intervienen en las diferentes formas de condicionamiento isquémico. En su revisión, este autor menciona que aún existen varios problemas sin resolver al estudiar los fenómenos de protección miocárdica; particularmente, uno de ellos es la ausencia de una descripción temporal de las señales cardioprotectoras participantes. Hace varios años, Downey y colaboradores propusieron una clasificación de las señales que intervienen en el PC, la cual utiliza una secuencia lógica/causal de eventos que coinciden con la secuencia temporal del protocolo de precondicionamiento utilizado. (6, 7) De esta manera, estos autores definen un “activador” como un factor liberado durante los ciclos de I/R precondicionantes que actúa como un estímulo para activar “mediadores”, que transmiten la señal cardioprotectora durante la isquemia miocárdica prolongada a un “efector final”, el cual es responsable de atenuar la lesión irreversible durante la isquemia y la reperfusión temprana. Siguiendo con este razonamiento, diversos estudios evaluaron las señales intracelulares involucradas en la cardioprotección del PCr; (8-10) sin embargo, en estos trabajos no se ha considerado la secuencia temporal de activación de las señales. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue determinar algunas de las señales de transducción, que

actúan antes de la isquemia miocárdica prolongada, como estímulos del PCr. Se evaluó particularmente la participación de los receptores muscarínicos, la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y los canales mitocondriales del K⁺_{ATP} (mK⁺_{ATP}).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho (200 a 250 g).

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg) e intubadas para ventilarlas con una mezcla de aire ambiental y oxígeno utilizando un respirador Harvard (Modelo 683). Luego, se disecó la arteria femoral del miembro posterior izquierdo y los animales fueron distribuidos aleatoriamente en diferentes grupos experimentales.

Tras completar los protocolos *in vivo* (véase más adelante), los animales se sacrificaron con pentobarbital sódico (150 mg/kg) y cada corazón se extrajo rápidamente del animal y se montó por la raíz de la aorta en un sistema de perfusión para órgano aislado, según la técnica de Langendorff. Los corazones se perfundieron con solución *buffer* de Krebs-Henseleit, que contiene: NaCl 118,5 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 8 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Mg SO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,5 mM y glucosa 10 mM, a un pH de 7,2-7,4). La temperatura se mantuvo constante en 37 °C y, además, el *buffer* se burbujeó con gas carbógeno (95% O₂ - 5% CO₂). Se colocaron dos electrodos que se conectaron a un marcapasos para mantener una frecuencia cardíaca constante de 250 latidos por minuto. Se introdujo un balón de látex lleno con solución salina, conectado a un transductor de presión (Deltram II, Utah Medical System), en el ventrículo izquierdo. El volumen del balón se ajustó para alcanzar una presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo de entre 8 y 10 mm Hg. La presión de perfusión coronaria (PPC) también se registró con un transductor de presión conectado a la línea de perfusión. El flujo coronario se ajustó para obtener una PPC de 70,5 ± 4,2 mm Hg durante el período de estabilización inicial.

Protocolos experimentales (Figura 1)

- **Grupo 1** (I/R; n = 8): Se anestesiaron las ratas y se disecó la arteria femoral del miembro posterior izquierdo. Luego de 30 min de seguimiento, los animales se sacrificaron y los corazones se extrajeron y perfundieron según la técnica de Langendorff. Luego de 20 min de estabilización, se sometieron a 30 min de isquemia global seguidos de 120 min de reperfusión.
- **Grupo 2** (PCr; n = 9): Se repitió el protocolo del grupo 1, pero previo a la isquemia miocárdica se realizó un protocolo de PCr (tres ciclos de oclusión/reperfusión de la arteria femoral izquierda).
- **Grupo 3** [sección vagal (SV); n = 7]: Se repitió el protocolo del grupo 2, pero previo al PCr se realizó una vagotomía bilateral a nivel cervical.

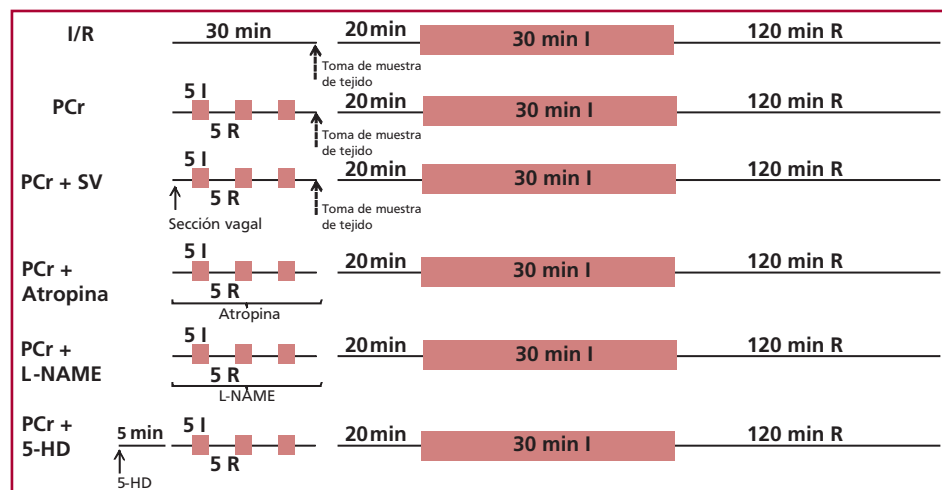


Fig. 1. Diagrama esquemático de los protocolos experimentales. I/R: Isquemia/reperfusión. PCr: Precondicionamiento isquémico remoto. I: Isquemia. R: Reperfusión. SV: Sección vagal. L-NAME: *N*^G-nitro-L-arginina metil éster. 5-HD: 5-hidroxidecanoato.

- **Grupo 4** (PCr + atropina; n = 6): Se repitió el protocolo del grupo 2, pero las ratas se trataron, durante el protocolo de PCr, con atropina (bloqueante de receptores muscarínicos; dosis de ataque 2 mg/kg y mantenimiento 1 mg/kg/h).
- **Grupo 5** [PCr + L-NAME (*N*^G-nitro-L-arginina metil éster); n = 8]: Se repitió el protocolo del grupo 2, pero las ratas se trataron, durante el protocolo de PCr, con L-NAME (inhibidor de la eNOS, 100 μM/kg).
- **Grupo 6** [PCr + 5-HD (5-hidroxidecanoato); n = 5]: Se repitió el protocolo del grupo 2, pero las ratas recibieron una dosis de 5-HD (bloqueante de canales del potasio, 100 μM) 5 min previo al PCr.

Medición del tamaño del infarto

Al finalizar los protocolos, los corazones se cortaron en secciones transversales, que se incubaron en una solución al 1% de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio durante 20 min. Con esta técnica, el tejido viable se tiñe de color rojo, mientras que la zona no teñida corresponde al área de infarto. Las secciones se escanearon y las áreas infartadas se midieron utilizando planimetría computarizada (análisis de imágenes: Image Pro Plus, versión 4.5). El tamaño del infarto se expresa como porcentaje de la superficie del ventrículo izquierdo.

Western blot

Las muestras de tejido de ventrículo izquierdo se homogeneizaron en 3 vol (w.v⁻¹) de *buffer* enfriado con hielo: NaCl 150 mM, Trizma HCl 50 mM, 1% (v.v⁻¹) desoxicolato de sodio, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM, pervanadato de sodio 1 mM (todos los reactivos de Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y un cóctel inhibidor de la proteasa al 4% (Roche Hertfordshire, Reino Unido), pH 8,0, y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. La proteína en el sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino como estándar y se resuspendió en solución 2X de *buffer* de muestra de SDS (62,5 mM de tampón Tris-HCl, pH 6,8, que contiene 2% (w.v⁻¹) de SDS, 25% (w.v⁻¹) de glicerol, 5% (v.v⁻¹) de β-mercaptoetanol y 0,01% (w.v⁻¹) de azul de bromofenol y se calentó a 95 °C durante 5 min. Una cantidad igual de proteínas (80 mg) se cargó en 8% de SDS-PAGE y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear durante 1 hora en *buffer* PBS de leche descremada al 3% (w.v⁻¹), las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes: conejo anti-eNOS (dilución 1: 750, Cell Signalling Technology,

Danvers, MA, USA), eNOS fosforilada en su residuo serina 1177 en los grupos I/R, PCr y SV, inmediatamente luego del protocolo de PCr. Las transferencias se hibridaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (dilución 1: 5.000, Santa Cruz Biotech, Inc. Dallas, TX, USA). Los complejos se visualizaron mediante la detección de quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blot sustrato). Las membranas se despojaron y reincubaron con anticuerpo fosfo-eNOS (dilución 1:750, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA). Se realizó un análisis de densitometría de las bandas utilizando el *software* Image J (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Las bandas de densidades de proteínas se normalizaron por el contenido de eNOS.

Aislamiento mitocondrial

Las mitocondrias del corazón se aislaron de tejidos homogeneizados (n = 4 por grupo) por centrifugación diferencial en una centrifuga Sorvall RC5C (Sorvall, Buckinghamshire, Inglaterra). Las muestras del corazón se lavaron y se desmenuzaron en un *buffer* STE [sacarosa 250 mM, 5 mM Tris-HCl y 2 mM EGTA (pH 7,4)]. Se realizó una breve digestión en STE suplementado con 0,5% (w/v) de BSA libre de ácido graso, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP y 2,5 UI/ml de XXIV tipo proteinasa bacteriana. Después de 4 min a 4 °C, las muestras se homogeneizaron en 1:10 de STE con un homogeneizador de vidrio Potter Elvehjem y se centrifugaron a 8.000 g durante 10 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en STE y se centrifugó a 700 g durante 10 min. El sedimento se desechó y las mitocondrias se sedimentaron a partir del sobrenadante por dos etapas de centrifugación a 8.000 g durante 10 min cada uno. Finalmente, el sedimento se lavó, se enjuagó y se resuspendió en 500 ml de tampón STE. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 0-4 °C. La pureza de las mitocondrias aisladas se evaluó mediante la determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa; solo se utilizaron mitocondrias con menos del 5% de impureza. La concentración de proteína se midió por el ensayo de Lowry usando BSA como estándar.

Producción de H₂O₂ mitocondrial

La tasa de producción mitocondrial de H₂O₂ se evaluó por la Red-peroxidasa de rábano picante Amplex, el método (HRP) descripto antes. El *buffer* de reacción consistía en 125 mM de sacarosa, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de KH₂PO₄, 2 mM de MgCl₂, y 0,01% (w/v) de BSA (pH 7,2). Amplex Red (25 mM) fue seguido de oxidación en presencia de HRP (0,5 U/ml), y malato (2 mM) y glutamato (5 mM)

como sustratos respiratorios mitocondriales. Después de un período de estabilización inicial, se añadieron recién aisladas mitocondrias del corazón (0,25 mg de proteína/ml) a la mezcla de reacción. La formación de Resorufin debido a la oxidación Amplex Red por HRP unido a H₂O₂ se midió en Perkin Elmer LS 55 Espectrómetro de fluorescencia (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) a 563 nm (excitación) y 587 nm (emisión). Los incrementos de fluorescencia fueron suprimidos en presencia de catalasa, lo que indica que los cambios en la fluorescencia se deben a la formación de H₂O₂. Los controles en la ausencia de mitocondrias aisladas o HRP indican que la oxidación no específica de la sonda es mínima (< 1%). Se realizó una curva de calibración con soluciones de H₂O₂ como estándar. La tasa de producción mitocondrial de H₂O₂ se expresó como nmol/min/mg de proteína.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media ± error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA de una vía), seguido de pruebas T con el valor de p ajustado para comparaciones múltiples (prueba de Bonferroni). Las comparaciones de datos no se consideraron significativas a menos que el valor de p correspondiente fuera inferior a 0,05/k, donde k representa el número de comparaciones.

Consideraciones éticas

Los procedimientos utilizados en estos estudios fueron aprobados por el Comité de Investigación y Cuidado Animal de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo 2948/10) en acuerdo con la guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los National Institutes of Health (NIH), USA.

RESULTADOS

En la Figura 2 se puede observar que un episodio de isquemia miocárdica de 30 minutos provocó un infarto del 52,31% ± 3,31%. El PCr disminuyó el tamaño del infarto al 31,29% ± 2,65% (p < 0,05). Tanto la vagotomía bilateral como el tratamiento con atropina abolieron el efecto protector del PCr sobre el tamaño del infarto (53,26% ± 4,29% y 51,10% ± 3,84%, respectivamente). El mismo efecto se observó en los animales tratados con L-NAME y 5-HD, en los cuales el tamaño del infarto fue del 49,11% ± 1,87% y del 53,08% ± 4,29%, respectivamente.

En la Figura 3 se muestran los cambios en la fosforilación de la eNOS en su residuo Ser 1177 antes de la isquemia miocárdica. El PCr indujo un aumento significativo de la fosforilación de la eNOS, y este efecto fue abolido por la SV bilateral.

Se ha sugerido que la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO) por parte de la mitocondria podría desempeñar un papel relevante en el preconditionamiento isquémico. (11) Por lo tanto, evaluamos la tasa de producción de H₂O₂ en mitocondrias aisladas de muestras de tejido de ventrículo izquierdo tomadas previo a la isquemia miocárdica. En la Figura 4 (Panel A) se muestra un trazado representativo durante el período de estabilización inicial y luego del agregado de mitocondrias aisladas de ratas no preconditionadas y de animales sometidos a un protocolo de PCr. Se observa que el PCr aumentó significativamente la producción y liberación de H₂O₂ por parte de las mitocondrias. Así, la

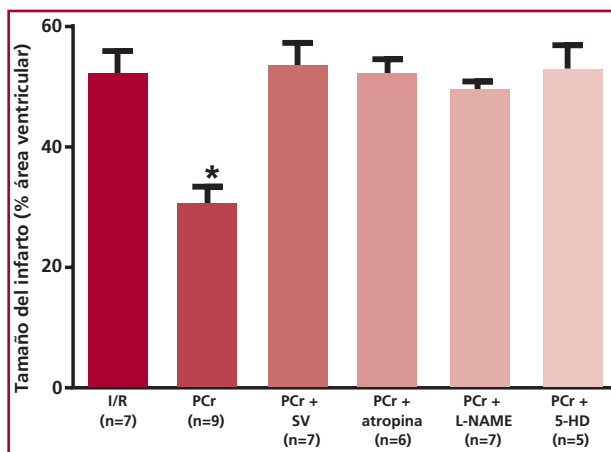


Fig. 2. Tamaño del infarto como porcentaje del área del ventrículo izquierdo. I/R: Isquemia/reperfusión. PCr: Precondicionamiento isquémico remoto. L-NAME: N^ε-nitro-L-arginina metil éster. 5-HD: 5-hidroxi-decanoato. *: p < 0,05 en comparación con los demás grupos.

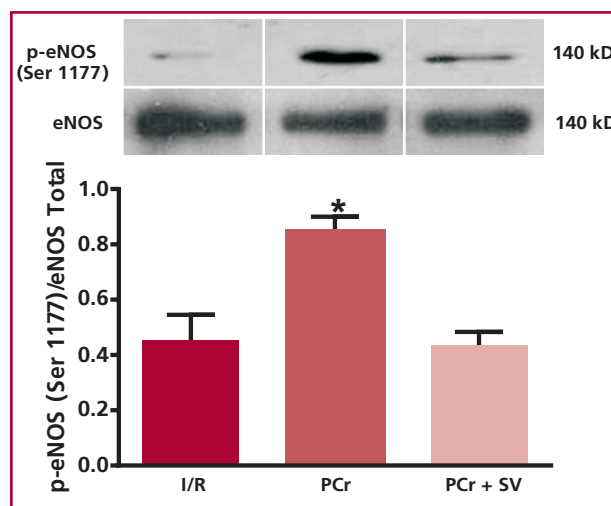


Fig. 3. Expresión de la eNOS fosforilada (Ser 1177) en tejido de ventrículo izquierdo al finalizar el protocolo de PCr. I/R: Isquemia/reperfusión. PCr: Precondicionamiento isquémico remoto. SV: Sección vagal. *: p < 0,05 en comparación con los demás grupos.

concentración de H₂O₂ mitocondrial se incrementó en un 27% en las ratas sometidas a PCr en comparación con el grupo I/R (I/R: 1,3 ± 0,1 nmol H₂O₂ min/mg de proteína; p < 0,05).

DISCUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio refuerzan la hipótesis de la existencia de una vía vagal colinérgica muscarínica para el PCr y demuestran que a nivel cardíaco se activan señales intracelulares que involucran la fosforilación de la enzima eNOS, la apertura de los canales de K⁺_{ATP} y la liberación de H₂O₂ por parte de la mitocondria. Todos estos hechos ocurren antes de la isquemia miocárdica, por lo que podrían considerarse disparadores (*triggers*) del PCr.

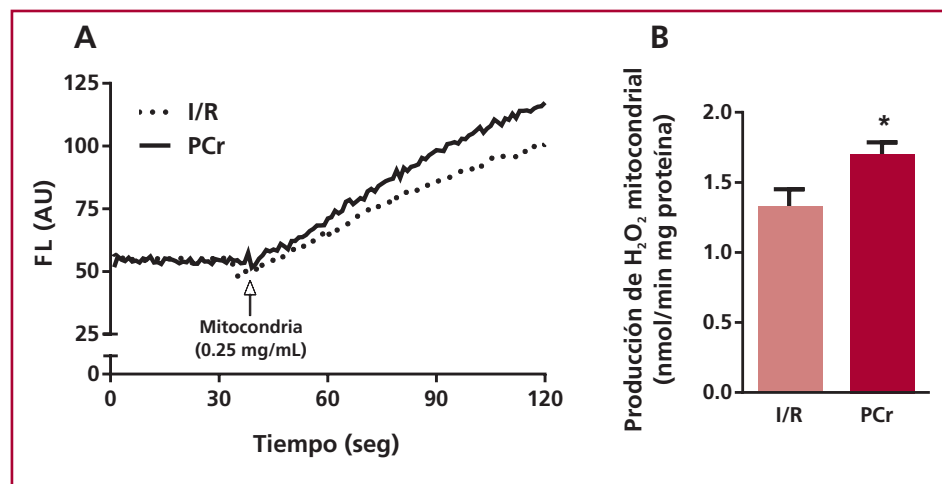


Fig. 4. En el panel **A** se muestra una traza representativa durante un período de estabilización inicial y después de la adición de mitocondrias aisladas de ratas no precondicionadas y de animales sometidos a un protocolo de PCr. En el panel **B** se muestra que la tasa de producción de H₂O₂ mitocondrial se incrementó significativamente en un 27% en ratas PCr en comparación con el grupo no precondicionado (I/R: 1,3 ± 0,1 nmol H₂O₂/min/mg de proteína; *p < 0,05). I/R: Isquemia/reperfusión. PCr: Precondicionamiento isquémico remoto.

Diferentes autores evaluaron los posibles mecanismos intracelulares involucrados en el PCr, en particular la participación de la vía de las RISK (12) y STAT 5. (13) Sin embargo, en todos esos trabajos se estudió la participación de estos complejos enzimáticos en tiempos muy disímiles: antes de la isquemia miocárdica, (14) en la reperfusión temprana (12) y en la reperfusión tardía (15) y, además, utilizando diferentes especies animales, (2, 16, 17) por lo que es difícil realizar una comparación. Por otro lado, los resultados de nuestro estudio extienden este conocimiento al demostrar que el receptor responsable de activar la protección es el receptor muscarínico. Además, la vía de activación del PCr a nivel cardíaco involucra a la eNOS, ya que al administrar L-NAME se abolió el efecto protector. En el mismo sentido, el PCr indujo la fosforilación de la eNOS antes de la isquemia miocárdica en los corazones precondicionados. El rol del óxido nítrico (NO) en el mecanismo del PCr es complejo porque podría participar a nivel del tejido u órgano donde se origina el estímulo precondicionante o a nivel cardíaco como parte de señales que llevan a la cardioprotección. En este último caso, es bien conocido que la infusión de sustancias con capacidad de incrementar la biodisponibilidad de NO ponen al corazón en un estado de precondicionamiento. (18) En nuestro caso, y como hemos mencionado, demostramos que existe fosforilación de la eNOS cardíaca inmediatamente luego de finalizar el protocolo de PCr. Además, el incremento en la producción de NO es capaz de actuar directamente sobre la mitocondria inhibiendo la cadena respiratoria y favoreciendo la producción de ERO. De hecho, en nuestro estudio mostramos que el PCr induce una mayor producción de H₂O₂ mitocondrial.

Diferentes autores mostraron que el PC o la administración de diazóxido provoca la apertura de los canales mK⁺_{ATP}; (19) por este motivo administramos 5-HD (bloqueante de los canales mK⁺_{ATP}) y observamos la pérdida del efecto protector del PCr. La apertura de los canales mK⁺_{ATP} provoca cambios importantes a nivel mitocondrial. Una vez que los canales mK⁺_{ATP} están

abiertos, se incrementa el flujo de K⁺ a la mitocondria y disminuye el potencial de membrana mitocondrial. Esta condición protegería al corazón frente a una producción exacerbada de ERO durante la reperfusión (11) y constituiría el mecanismo subyacente del efecto protector del PCr. Como se ha sugerido, (20) la producción de ERO por parte de la mitocondria podría contribuir a la apertura del canal mK⁺_{ATP}. De esta manera, el H₂O₂ podría actuar como un mensajero de la señal de protección del PCr.

Por otro lado, las ERO generadas por la mitocondria podrían activar otras enzimas redox sensibles, entre ellas la PKCε, que es una de las quinasas más importantes que participan del mecanismo del PC. (21)

CONCLUSIONES

El PCr reduce el tamaño del infarto utilizando una vía vagal muscarínica y un mecanismo que involucra la fosforilación de la enzima eNOS, la apertura de los canales mK⁺_{ATP} y la liberación de H₂O₂ por parte de la mitocondria. Todos estos fenómenos ocurren previo a la isquemia miocárdica, por lo que podrían actuar como “estímulos” del PCr.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web/ Material suplementario).

BIBLIOGRAFÍA

- Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008;79:377-86. <http://doi.org/cfvgn2>
- Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Insete J, García-Dorado D, et al. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 2013;98:425-34. <http://doi.org/bcxv>
- Lim SY, Hausenloy DJ. Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front Physiol* 2012;3:27. <http://doi.org/bcxw>
- Heinen NM, Pütz VE, Görgens JI, Huhn R, Grüber Y, Barthuber C, et al. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits

- a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock* 2011;36:45-53. <http://doi.org/fm6d2z>
5. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 2015;116:674-99. <http://doi.org/bcxx>
 6. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003;83:1113-51. <http://doi.org/bcxz>
 7. Downey JM, Krieg T, Cohen MV. Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1123:187-96. <http://doi.org/bdh8dh>
 8. Li SJ, Wu YN, Kang Y, Yin YQ, Gao WZ, Liu YX, et al. Noninvasive limb ischemic preconditioning protects against myocardial I/R injury in rats. *J Surg Res* 2010;164:162-8. <http://doi.org/b6s7dv>
 9. Breivik L, Helgeland E, Aarnes EK, Mrdalj J, Jonassen AK. Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2011;106:135-45. <http://doi.org/ds7226>
 10. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc Res* 2002;55:583-9. <http://doi.org/bh7xjp>
 11. Kalogeris T, Bao Y1, Korthuis RJ1. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2014;2:702-14. <http://doi.org/bcx2>
 12. Hausenloy DJ, Iliodromitis EK, Andreadou I, Papalouis A, Gritsopoulos G, Anastasiou-Nana M, et al. Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012;87-93. <http://doi.org/fx9hfc>
 13. Heusch G, Musiolik J, Kottenberg E, Peters J, Jakob H, Thielmann M. STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication. *Circ Res* 2012;110:111-5. <http://doi.org/d6dmxm>
 14. Li J, Xuan W, Yan R, Tropak MB, Jean-St-Michel E, Liang W, et al. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/Akt activation and is associated with nuclear accumulation of beta-catenin. *Clin Sci (Lond)* 2011;120:451-62. <http://doi.org/dcrj6m>
 15. Dow J, Bhandari A, Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. The effect of acute versus delayed remote ischemic preconditioning on reperfusion induced ventricular arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2012;23:1374-83. <http://doi.org/bcx3>
 16. Brandenburger T, Huhn R, Galas A, Pannen BH, Keitel V, Barthel F, et al. Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *J Transl Med* 2014;27:12:228.
 17. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a K_{atp} channel-dependent mechanism. *Transplantation* 2005;27:79:1691-5. <http://doi.org/bvpm3j>
 18. Sun J, Aponte AM, Kohr MJ, Tong G, Steenbergen C, Murphy E. Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-nitrosylation versus sGC/cGMP/PKG signaling? *Free Radic Biol Med* 2014;54:105-12. <http://doi.org/bcx4>
 19. Yao Z, Gross GJ. Role of nitric oxide, muscarinic receptors, and the ATP-sensitive K⁺ channel in mediating the effects of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs. *Circ Res* 1993;73:1193-201. <http://doi.org/bcx5>
 20. Fornazari M, de Paula JG, Castilho RF, Kowaltowski AJ. Redox properties of the adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel in brain mitochondria. *J Neurosci Res* 2008;86:1548-56. <http://doi.org/b848bm>
 21. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 2006;101:180-9. <http://doi.org/dcrfg>