



Universidad de la República

Facultad de Medicina

Departamento e Biofísica



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

INJURIA POR REPERFUSIÓN Y MECANISMOS CARDIOPROTECTORES ASOCIADOS.

Grupo de trabajo:

Orientador: Dr. Gonzalo Ferreira. Departamento de Biofísica

Estudiantes: Br. Sabrina Damiani, Br. Emilia Moreira, Br. Macarena Muto, Br. Luciana Nasif, Br. Juan Impagliazzo.

Montevideo, 2014.

Índice:

Resumen.....	3
Fundamentación.....	4
Introducción.....	5
Objetivo e hipótesis.....	8
Metodología.....	9
Resultados.....	12
Discusión, conclusiones y perspectiva.....	22
Agradecimientos.....	23
Bibliografía.....	24

Resumen

La enfermedad cardiovascular constituye una de las principales causas de morbimortalidad tanto en nuestro país como en el mundo, siendo el infarto agudo de miocardio su máxima expresión.

Un mecanismo de daño tisular adicional a la isquemia es la injuria por reperfusión. Las alternativas terapéuticas actuales muchas veces no logran reducir la morbimortalidad causada por lesiones de isquemia-reperfusión.

Existen sin embargo posibles intervenciones cardio-protectoras, que permiten reducir dicha lesión, como por ejemplo los condicionamientos isquémicos o farmacológicos. Una de dichas estrategias alternativas que se ha empleado con éxito es el preconditionamiento isquémico, permitiendo paliar los efectos deletéreos de la injuria por reperfusión.

En este trabajo revisamos estos conceptos e interpretamos como los flujos iónicos a través de canales iónicos pueden explicar algunos de estos mecanismos y en adición, mostramos con una serie de experimentos básicos, como puede observarse la alteración funcional de la injuria por reperfusión y como puede disminuirse la misma por preconditionamiento isquémico o farmacológico.

Palabras Clave: Isquemia, injuria por isquemia-reperfusion, preconditionamiento isquemico, cardioproteccion, canales de Ca miocárdicos, poro de transición mitocondrial.

Abreviaturas: IR: injuria por reperfusión. IAM: infarto agudo de miocardio. ROS: especies reactivas del oxígeno. PA: Potencial de acción. K-ATP: Canales de K inhibidos por ATP. mPTP: Poro de transición de la mitocondria. RS: Reticulo sarcoplasmatico. SERCA2: Bomba liberadora de Ca al retículo sarcoplasmatico. CICR: liberación de Ca inducida por Ca. PMCA: bombas de membrana plasmática de Ca. CNX: Intercambiador Ca/Na

I. Fundamentación:

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en nuestro país. Según la Organización Mundial de la Salud, la cardiopatía isquémica será la principal causa de muerte en el mundo en el año 2020¹.

La cardiopatía isquémica en su máxima expresión es el infarto agudo de miocardio (IAM), producido por la oclusión aguda de las principales arterias coronarias. Dichas arterias se caracterizan por presentar una circulación de tipo terminal, lo mismo que ocurre en otros órganos como cerebro y riñón. La importancia de esto radica en que al producirse una injuria por isquemia no existe circulación colateral que pueda suplir el aporte sanguíneo y evitar el daño letal. De esta forma en estos órganos con circulación terminal como ser corazón, cerebro o riñones, pueden producirse infartos por isquemia. En ocasiones estos daños pueden observarse también a nivel intestinal (infarto intestino-mesentérico).

Las terapias actuales para terminar con la isquemia en estos órganos son por ejemplo la trombolisis y la angioplastia percutánea primaria. Ambas apuntan a la rápida reperfusión. Sin embargo, éstas pueden potenciar el daño generado por la isquemia al ser dichos órganos reperfundidos. Este fenómeno se conoce como injuria por reperfusión (IR). La mayor comprensión de los fenómenos celulares y moleculares subyacentes a este mecanismo de daño tisular ocurridos durante la reperfusión, permitiría plantear estrategias más alentadoras con el fin de disminuir el daño causado.

Dentro de las estrategias de acondicionamiento isquémico se pueden destacar las de condicionamiento isquémico o farmacológico cardio-protector respecto a éstos daños producidos por la isquemia o IR. Entre los condicionamientos isquémicos encontramos el pre, per y post acondicionamiento, según se realice antes, durante o luego de la isquemia respectivamente. En este trabajo, se hará hincapié en el primero, dado que al realizar una intervención antes de que suceda el evento nocivo se obtiene una mayor cardioprotección. Además del pre acondicionamiento mecánico clásico, se están investigando intervenciones farmacológicas que imitan el mismo protegiendo al corazón frente a éstos daños, usando agentes farmacológicos

como por ejemplo mediante el empleo de anestésicos para generar protección miocárdica.

Dada la incidencia del infarto agudo de miocardio en Uruguay, siendo ésta una de las principales causas de morbi-mortalidad en nuestra población consideramos de importancia abordar esta temática.

Dado para la actividad miocárdica, son centrales los canales iónicos de membrana y organelos celulares, empleamos como órgano de estudio para revisar éstos temas y experimentar al respecto en el laboratorio, a corazones aislados de modelos animales. Nuestra hipótesis de trabajo es que los canales iónicos están implicados en la modulación de estas respuestas.

Para refutar dicha hipótesis, este trabajo plantea un doble propósito:

- a) El de revisar como impactan los canales iónicos en los mecanismos de daño tisular en la IR y condicionamientos y
- b) El de realizar experimentos en corazones aislados buscando caracterizar funcionalmente los daños producidos por isquemia, IR y como pueden éstos disminuirse por condicionamiento mecánico o farmacológico. Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica efectuada, se interpretarán los resultados de los experimentos en el contexto de funciones de canales probablemente afectados por estos mecanismos.

II. Introducción:

La Isquemia es una situación en la que disminuye el aporte sanguíneo al corazón. Esta situación puede darse en condiciones patológicas, por ejemplo, cuando un coágulo obstruye la luz de una arteria coronaria, o en condiciones controladas, como por ejemplo, durante una cirugía cardíaca en la cual sea necesario un campo sin sangre o exangüe. En ambos casos se elimina el aporte de oxígeno al corazón, generándose así el estrés oxidativo. Las reacciones de la cadena respiratoria mitocondrial generan también reacciones adicionales que son tóxicas para las células, debido a la generación de radicales libres². Al conjunto de los radicales libres derivados del O₂ se les

llama especies reactivas de oxígeno (ROS). Se denomina estrés oxidativo al desbalance que ocurre entre las manifestaciones celulares perjudiciales de las ROS y la capacidad celular para eliminar dichas ROS o reparar el daño producido por las mismas. Dicho de otra forma, el concepto de estrés oxidativo, se refiere a un exceso de ROS en relación a la capacidad antioxidante de la célula³. El stress oxidativo sobre el tejido cardíaco tiene efectos deletéreos sobre su funcionamiento, desde la desnaturalización de las proteínas involucradas en la contractilidad cardíaca, hasta daños en el ADN mitocondrial (ADNm)^{4, 5, 6}. Cuando esto sucede se ven las principales manifestaciones de la isquemia, como ser, la disminución del ATP y el aumento de ADP, AMP y Pi ya que la glucólisis anaerobia, producida en condiciones de isquemia, no puede suministrar suficiente oxígeno para cubrir las necesidades del corazón. Como consecuencia de estos procesos se ve una alteración que finalmente culmina con el cese de la actividad contráctil del corazón, ya que la maquinaria contráctil y su modulación por Ca^{2+} intracelular y canales iónicos pertinentes, se ven inhibidos por ADP, AMP y la disminución del pH⁷. En esta situación entonces, se producen cambios en los mecanismos de transporte iónicos, alterándose la actividad de canales iónicos voltaje y tiempo dependientes, lo que trae como consecuencias alteraciones en la actividad eléctrica del corazón que se observan como alteraciones en los potenciales de acción (PA) cardíacos y como consecuencia en registros extracelulares como Electrocardiogramas que es lo monitoreado en la práctica clínica de rutina. Estos cambios eléctricos a su vez influyen en las alteraciones de contractilidad cardíaca observadas durante procesos isquémicos. El PA en la isquemia tiene un potencial de membrana en reposo despolarizado significativamente, con un aumento lento de la fase ascendente PA, y reducción de la amplitud y duración del mismo⁸. Esta rápida despolarización del potencial de membrana en reposo durante la isquemia, es causada por una rápida redistribución de los iones K + del espacio intracelular al extracelular. Esto ocurre en parte por la apertura de canales de K inhibibles por ATP (K-ATP), así como por la inhibición de la actividad de la Na / K ATPasa, y la pérdida intracelular de K + para la glucólisis anaeróbica y acidificación intracelular⁸. Esta despolarización relativa del potencial de membrana en reposo causa una inactivación parcial de los canales de Na⁺ dependientes del voltaje, manifestándose por una marcada

reducción en la amplitud del PA. Esto, a su vez, afecta otras corrientes iónicas voltaje dependientes que se activan durante las fases 1 y 2 del PA (I_{to} e I_{Ca-L}). Todo ello altera la propagación del PA, a lo que se le suma la alteración en la expresión y distribución de las uniones gap (en isquemias crónicas), todo lo cual predispone finalmente a bloqueo de la conducción, un requisito importante para diferentes tipos de arritmias⁸. El corazón puede recuperarse de breves periodos de isquemia si se logra la reperfusión de éste a tiempo.

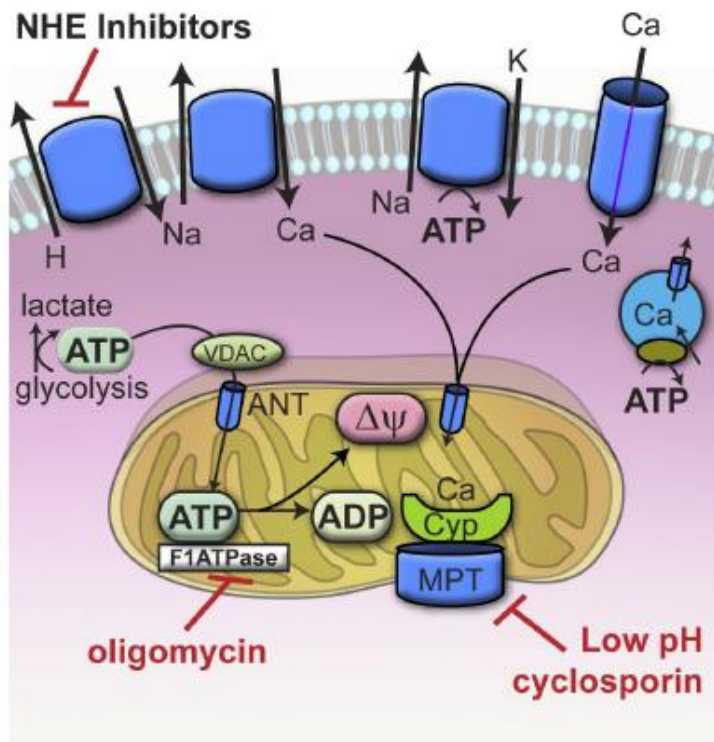


Figura 1: Durante la isquemia disminuye el ATP por lo que se da la glucólisis anaerobia, esta aumenta la producción de H dando una disminución del pH. El aumento de H se trata de compensar activando la Na/H ATPasa y Ca/Na ATPasa lo que resulta en entrada de Ca. A su vez el ATP generada es consumido por la ATPasa reversa de la mitocondria para mantener el potencial de membrana y hacer ingresar el Ca a la mitocondria. Una vez iniciada la reperfusión la normalización del pH permite que el Ca active el MPT⁹.

Ante isquemias prolongadas, sin embargo, la reperfusión no está exenta de complicaciones, ya que al reperfundir el corazón isquémico se produce la llamada injuria por reperfusión (IR). Al producirse la reperfusión del corazón, luego de un periodo de isquemia se da un efecto paradójico. En lugar de

producirse la recuperación de la funcionalidad contráctil, aumenta el daño sobre el tejido miocárdico, adicionándose al ya producido por la isquemia.

Uno de los mecanismos para la protección del miocardio ante la oclusión de la arteria coronaria aguda, es un fenómeno con potente poder cardioprotector descrito por Murry et al. en 1986 por primera vez¹⁰. Se observó que episodios transitorios de isquemia confieren protección frente a posteriores isquemias, conociéndose dicho fenómeno con el nombre de pre acondicionamiento isquémico. Este enfoque depende de que la intervención ocurra antes del evento isquémico, lo cual resulta difícil ya que la aparición de una oclusión de la arteria coronaria aguda es un evento impredecible¹¹.

III. Objetivos e hipótesis:

El objetivo general de nuestro trabajo es estudiar el rol de los canales iónicos en mecanismos de daño cardíaco relacionados a fallas isquémicas.

La hipótesis general es que en mecanismos tales como la injuria por reperfusión y pre acondicionamiento isquémico cardíaco, participan canales iónicos.

Estos objetivos e hipótesis se fundamentan en que después de una isquemia sostenida, la reperfusión causa lesiones de miocardio por múltiples mecanismos, tales como la generación de especies reactivas de oxígeno, disfunción del endotelio, acumulación de neutrófilos, etc. Los mecanismos de cardioprotección como el pre acondicionamiento isquémico, disminuyen estos eventos. Tanto para la producción de las lesiones por reperfusión, como para los mecanismos de cardioprotección, modulando y controlando todos los eventos mencionados, son centrales la pérdida de la homeostasis del calcio y la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP). Estos últimos acontecimientos están claramente relacionados a los canales iónicos, evidenciándose que los mismos juegan un rol central en la producción y modulación de todos estos eventos, justificándose así nuestra hipótesis general para revisión y aproximación experimental propuestas.

Dado lo expuesto anteriormente, nuestro primer objetivo específico en este trabajo es determinar vía revisión bibliográfica, el rol de los distintos tipos de

canales de Ca^{2+} y del mPTP, en los eventos relacionados a injuria de reperfusión y mecanismos cardioprotectores asociados, sobre todo pre acondicionamiento isquémico.

La hipótesis específica, es que ambos procesos constituyen una vía convergente final común en la generación de daño por reperfusión y en los mecanismos de cardioprotección.

Nuestro segundo objetivo específico es evaluar experimentalmente mecanismos de cardioprotección químicos y físicos, para disminuir el daño de la injuria de reperfusión.

La hipótesis específica, es que mediante mecanismos químicos, (como ser por ejemplo la exposición aguda a anestésicos generales opioides como por ejemplo remifentanilo) o por mecanismos físicos (como ser por ejemplo la fase temprana del pre acondicionamiento isquémico), se logrará una cardioprotección significativa de la injuria por reperfusión, evaluándose experimentalmente la misma, mediante funcionalidad cardíaca contráctil y eléctrica.

Este objetivo experimental se reportará en resultados y se discutirán dichos resultados en el contexto de la información aportada al cumplir el primer objetivo específico.

IV. Metodología:

El trabajo consistió en dos partes, revisión bibliográfica y trabajo experimental.

IV.a - Respecto a la revisión bibliográfica, la misma se basó en una primera instancia en la búsqueda de artículos generales referidos a la injuria por reperfusión y condicionamiento preisquémico y en una segunda instancia artículos centrados en el rol de los canales iónicos, en especial en los canales de Ca^{2+} y el rol del mPTP.

Los artículos fueron seleccionados de la base PubMed y estos debían cumplir, como criterio de inclusión, no tener más de 10 años de publicados. Las palabras clave utilizadas fueron para la primera instancia “reperfusion injury heart (or cardiac) mechanisms” y “ischemic preconditioning heart (or cardiac)

mechanisms” y para la segunda instancia “reperfusion injury heart (or cardiac ion channels” y ischemic preconditioning heart (or cardiac ion channels”.

IV.b – Respecto a las instancias experimentales, detallaremos primero el método general común que empleamos y luego mencionamos las instancias experimentales.

IV.b.1 Procedimiento general común

Para el aislamiento del corazón de cobayo, se utilizó el protocolo de Langendorff de acuerdo a la adaptación realizada por Ferreira, 1992¹². El corazón fue aislado y retroperfundido por las arterias coronarias, mediante un circuito que permite controlar el flujo de perfusión y la temperatura. A este circuito se le agregó un sistema de registro simultáneo de actividad eléctrica (mediante la aplicación de electrodos próximos a los músculos papilares, pero en la superficie del corazón), así como también un sistema de transducción de la actividad contráctil del músculo papilar.

Para la adquisición se dispuso de amplificadores unidos a una tarjeta convertora analógico-digital, convirtiendo la señal biológica de naturaleza analógica a una señal digital que es capaz de poder ser almacenada e interpretada por el software de registro.

Previo a la experimentación, el corazón aislado se colocó en un ambiente muy similar al del medio interno para que el órgano pueda subsistir. Luego se comenzó a retroperfundir mediante un sistema de tubuladuras que perfunden al corazón pasan antes por una cámara que contiene agua a una temperatura de aproximadamente 40°C. El control de temperatura se realizó mediante la remoción o inmersión de las tubuladuras en esta cámara.

Para el control de pH, nutrientes y osmolaridad, el corazón se perfundió con solución Tyrode 1,8 M. La solución de Tyrode tiene todos los componentes esenciales para mantener al corazón aislado en concentraciones apropiadas como por ejemplo (en mM) 10 Glucosa, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 1 NaH₂PO₄, 2 MgCl₂ y 145 NaCl. Los buffers (HEPES y NaH₂PO₄) permiten mantener el pH del medio interno al cual se expuso el corazón, el CaCl₂ aportó el ión Ca²⁺, esencial para la contracción muscular, la Glucosa, nutriente imprescindible para

la función trófica celular y por último, el NaCl, fue utilizado para controlar la osmolaridad de la solución. A su vez, la solución se perfundió con carbógeno (mezcla de 95% de O₂ y 5% CO₂) que permite la entrada de O₂ al tejido y también un mayor rango de amortiguación gracias a la presencia de CO₂, el cual es usado para formar el buffer HCO₃⁻/CO₂.

En ambos procedimientos se realizó una isquemia prolongada sin condicionamiento (control), luego en presencia de la intervención (farmacológica o mecánica), se repitió dicha isquemia prolongada, comparándose como repercute la intervención realizada sobre la isquemia sin condicionamiento (control).

IV.b.2 Condicionamiento/Cardioprotección farmacológica por anestésicos opioides

La primer instancia experimental consistió en la observación de la variación de los potenciales de acción frente a una situación de isquemia con el uso de remifentanilo como agente cardioprotector. El remifentanilo se agregó en una tubuladura extra al Tyrode 1.8 mM Ca²⁺.

IV.b.3 Condicionamiento/Cardioprotección mecánico (preacondicionamiento isquémico)

En esta instancia experimental se evaluó la contractilidad y conducción eléctrica de corazón aislado en condiciones de isquemia y reperfusión. El condicionamiento preisquémico se realizó con intervalos mínimos de isquemia y reperfusión de 1 minuto de duración cada uno, repetidos 5 veces. Finalmente se analizaron los resultados obtenidos en los experimentos, relacionándolos con la evidencia existente al respecto.

V. Resultados.

V.A- Revisión Bibliográfica de la Injuria por reperfusión y condicionamiento preisquémico.

V.A.1 Injuria por Reperfusión - El daño por reperfusión se produce por el aumento de la concentración de Ca²⁺ celular, siendo modulada ésta por las ROS, que de por sí, ya se encuentran elevados por las alteraciones

isquémicas. Estos aumentos son acompañados también por la liberación de enzimas, produciéndose de ese modo cambios morfológicos característicos de necrosis celular, dando lugar al área de necrosis, conocida también como área infartada⁷. La evidencia experimental más reciente sugiere que una sobrecarga citosólica de Ca^{2+} libre es uno de los principales contribuyentes de la lesión miocárdica inducida por la isquemia-reperfusión^{13, 14}. En las células cardíacas, normalmente la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tipo-L durante un PA, desencadena la apertura de los canales RyR2 del retículo sarcoplasmático (RS), permitiendo la liberación rápida y transitoria de Ca^{2+} del RS en un mecanismo de acoplamiento excito-contráctil conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR)¹⁵. Posteriormente, la relajación ocurre cuando los RyR2 se cierran, una vez que el Ca^{2+} se disocia de la troponina-c, y el Ca^{2+} es transportado hacia el RS a través de la bomba de Ca^{2+} (SERCA2a), y hacia el exterior de la célula por el intercambiador Na/Ca¹⁶. La sobrecarga de Ca^{2+} durante la IR, ocurre como consecuencia de la función alterada de RYR2 y de la captación disminuida de Ca^{2+} por SERCA2 hacia el RS. Ello se debe a la disminución en la síntesis de ATP durante la fase isquémica. Esta disminución en la síntesis de ATP también tendrá consecuencias sobre la actividad de las bombas de membrana plasmática de Ca^{2+} (PMCA) y Na/K ATPasa. La inhibición de la Na/K ATPasa es compensada por la extrusión de Na^+ a través de funcionamiento reverso del intercambiador Na/Ca (NCX). Se produce así entrada de Ca^{2+} a través de NCX, que estimula la liberación de Ca^{2+} del RS a través de RYR2 (CICR). Todo esto, sumado a la falla de SERCA2 en la recaptación de Ca hacia el RS, produce una sobrecarga de Ca citosólico¹⁶. Durante la reperfusión, el flujo de sangre se acompaña de aumento de oxígeno y del restablecimiento de la fosforilación oxidativa. Este evento trae como efecto la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción del anión superóxido (O_2^-) durante los primeros segundos de la reperfusión, desencadena una cascada de eventos que afectan el estado redox de proteínas clave que participan en la homeostasis celular¹⁶. Finalmente, otro efecto de la reperfusión es la activación de proteasas tales como caspasas y calpaínas, cuya activación es fundamental para la extensión de las lesiones de reperfusión. La activación de las calpaínas es Ca^{2+} dependiente, siendo a su vez inactivadas por un pH bajo durante la isquemia. Por lo tanto al restaurarse

el pH en la reperfusión, sumado a la alta concentración de Ca^{2+} citosólico, se libera la inhibición de la calpaína, causando degradación de RYR2, entre otros efectos deletéreos que tiene sobre el miocito¹⁶. En condiciones fisiológicas la membrana mitocondrial interna posee un potencial de membrana muy negativo y se caracteriza por ser impermeable a los iones y proteínas. En circunstancias de elevado estrés oxidativo, tal como lo es el escenario de un IAM, se produce la apertura de un canal iónico que es el poro de permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPTP), permitiendo el pasaje de moléculas de hasta 1.5 Kda. Actualmente no se ha dilucidado por completo la estructura molecular del MPTP, sin embargo se plantea que es un canal no selectivo, que se encuentra influenciado por iones y que el fosfato ejerce un rol clave como activador de la permeabilidad del poro, a través del transportador de fosfato mitocondrial¹⁷. Su importancia radica en la pérdida de gradiente electroquímico de los protones, perdiéndose el potencial de reposo mitocondrial. Por lo tanto, los estudios recientes apuntan a la protección contra la IR, evitando la apertura del MPTP como un posible blanco para la cardioprotección. Se conoce que la apertura de dicho poro está influenciada por los niveles de Ca^{2+} y pH intracelular, junto a otros metabolitos. A pH menor que 7, el MPTP está inhibido. En condiciones de isquemia donde el metabolismo oxidativo se encuentra saturado y deja de funcionar la cadena respiratoria por la pérdida del gradiente protón motriz, se utiliza de manera alternativa el metabolismo anaeróbico, de bajo rendimiento en comparación con la respiración celular generando además lactato y por lo tanto aumento del pH⁷.

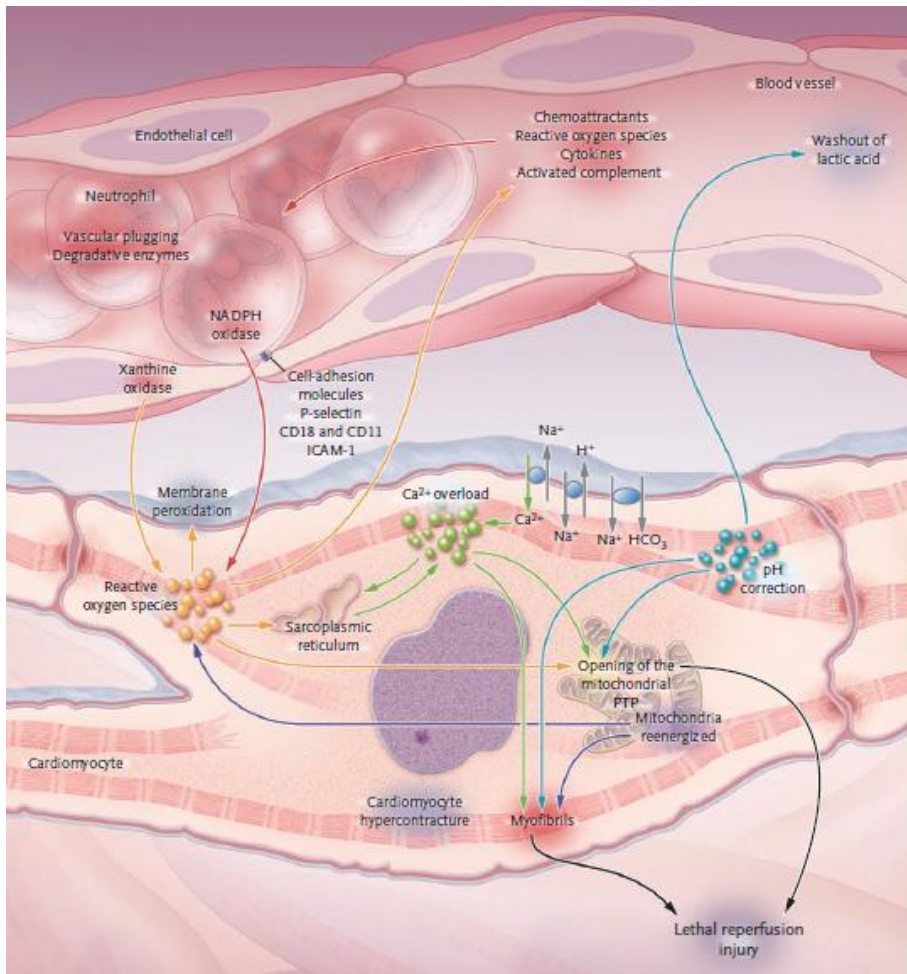


Figura 2: Los cambios durante la perfusión incluyen reenergización mitocondrial (púrpura), la generación de ROS (naranja), sobrecarga de Ca intracelular (verde), el rápida restauración del pH fisiológico (azul), y la inflamación (rojo), los cuales median la muerte celular a través de la apertura del mPTP y la inducción de la hipercontractura. ROS median la lesión miocárdica por inducción de la apertura del mPTP, actúan como factores quimiotácticos de los neutrófilos, median la disfunción del retículo sarcoplásmico y contribuyen a la sobrecarga de Ca intracelular, dañan la membrana celular por peroxidación de lípidos y causan daño oxidativo sobre el ADN. Durante la perfusión hay afluencia de Ca por el daño de la membrana del RS, disfunción mediada por ROS del RS y función inversa del intercambiador de Na/Ca. La generación de ATP por la cadena de transporte de electrones reactiva el entorno intracelular e induce sobrecarga Ca en cardiomiocitos y la muerte por hipercontractura, proceso facilitado por la rápida restauración del pH fisiológico durante perfusión. Además la restauración del

PA de membrana mitocondrial y entrada de Ca en la mitocondria junto con la pérdida del efecto inhibidor del pH ácido en el mPTP y la generación de ROS median la apertura del mPTP, esto induce la muerte por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial e hinchazón. Durante la reperfusión miocárdica, el rápido lavado de ácido láctico junto con la función de los transportadores Na⁺/H⁺ y Na⁺/HCO₃⁻ median la rápida restauración de pH fisiológico, facilitando la apertura del mPTP y hipercontractura de los cardiomiocitos¹⁸.

V.A.2 Condicionamiento cardíaco cardioprotector.- Estudios han demostrado la activación de quinasas, como Akt y ERK1 / 2 (vía RISK), en el momento de reperfusión, confieren potente poder cardioprotector contra la lesión por IR miocárdica. Dicha protección está dada gracias a que esta vía tiene como efecto final la inhibición de la abertura del poro de transición mitocondrial (MPTP) en ese momento. La activación de la vía RISK, a través de diversos factores de crecimiento y otros agentes tales como la atorvastatina, la bradiquinina, y agonistas de los receptores opioides, induce cardioprotección cuando estos son administrados durante la fase de reperfusión temprana¹⁸. Por lo tanto, la manipulación farmacológica de RISK, en el momento de reperfusión puede otorgar cardioprotección en el pre acondicionamiento isquémico y proporcionar así, un nuevo enfoque para la cardioprotección.

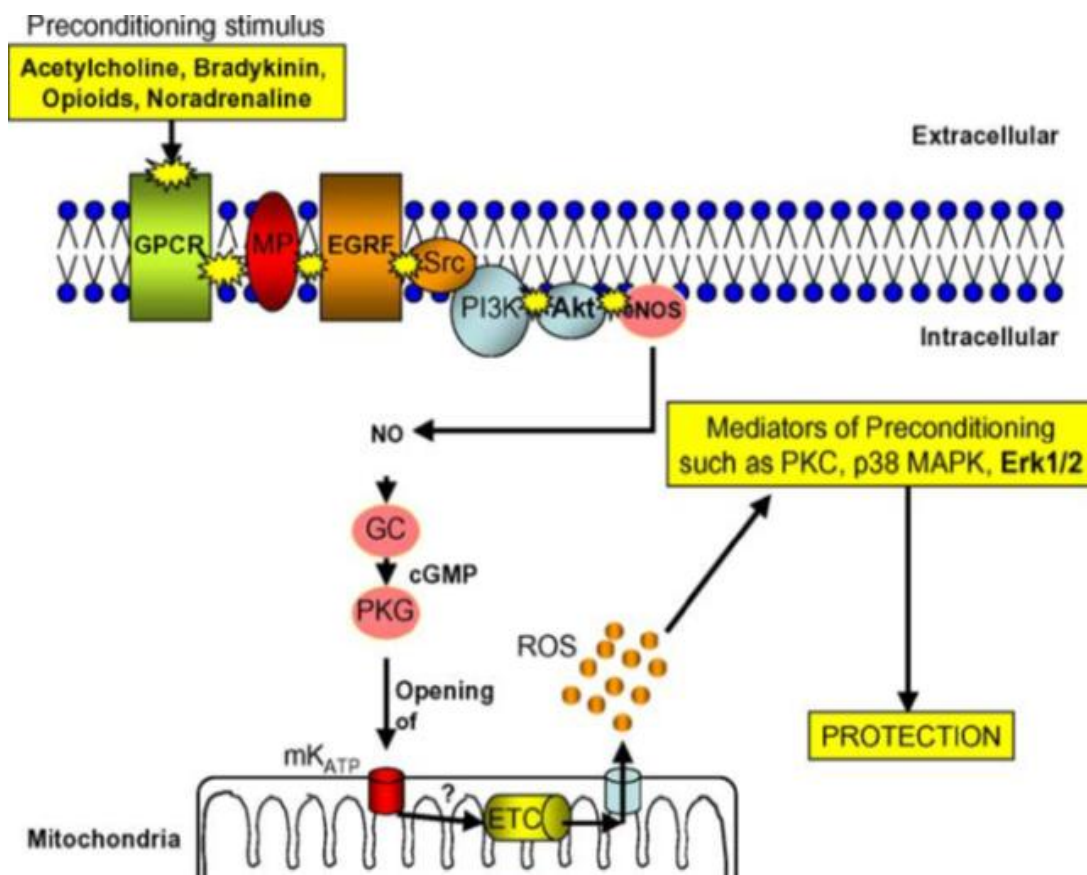


Figura 3: La activación de la proteína G-junto receptor (GPCR), en respuesta a un estímulo pre acondicionamiento isquémico, conduce a la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a través de la matriz metaloproteínasa (MP), que entonces activa la PI3K-Akt. Fosforilación de PI3K-AKT y activación de la eNOS que entonces activa la guanilato ciclasa (GC) a través de NO. Guanilato ciclasa a continuación, activa la proteína quinasa G (PKG) a través GMPc. PKG a continuación, fosforila y abre el canal de K ATP mitocondrial (mKATP), lo que resulta en la liberación mitocondrial de ROS, generada a partir de la cadena de transporte de electrones (ETC), que entonces activa los mediadores de pre acondicionamiento incluyendo Erk1 /2⁷

V.B Resultados experimentales

V.B.1 Isquemia prolongada control común a ambos procedimientos experimentales

- 1) *Isquemia control.*

La disección y aislamiento del corazón procedió de manera correcta, sin ninguna complicación. Debe tenerse en cuenta que cualquier error en este paso puede conllevar a un corazón sumamente inestable y que, por lo tanto, no será confiable para extraer registro alguno.

Se esperó 5' para que se estabilicen tanto la actividad mecánica como la eléctrica, antes de iniciar la isquemia prolongada control por 15 minutos, por inhibición de la perfusión. La temperatura se mantuvo en 37 grados Celsius por perfusión externa.

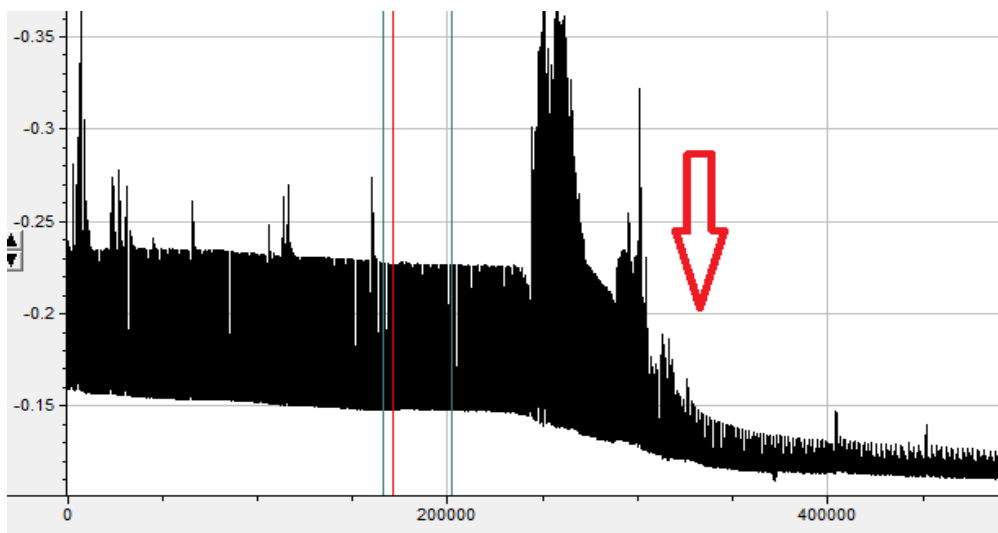


Figura 4: Registro de la actividad contráctil del músculo aislado, mostrando el inicio de la isquemia prolongada control.

En este episodio isquémico prolongado se restringieron electrolitos y consumo de O_2 del órgano por un tiempo de 15'. Inmediatamente luego de la isquemia, se produjo un notable descenso de la actividad contráctil, disminuyendo su tensión y también alteraciones en la actividad eléctrica, que se traducen como bradicardia e inestabilidad del ritmo. A medida que avanzó el tiempo de la isquemia, la contractilidad y la frecuencia disminuyeron aún más, hasta que su actividad fue casi nula. Al 1'30" de la isquemia generada el corazón prácticamente no se contraía, haciéndolo aproximadamente con una frecuencia de 15 latidos por minuto, aun cuando la temperatura se mantuvo en 37 grados celsius.

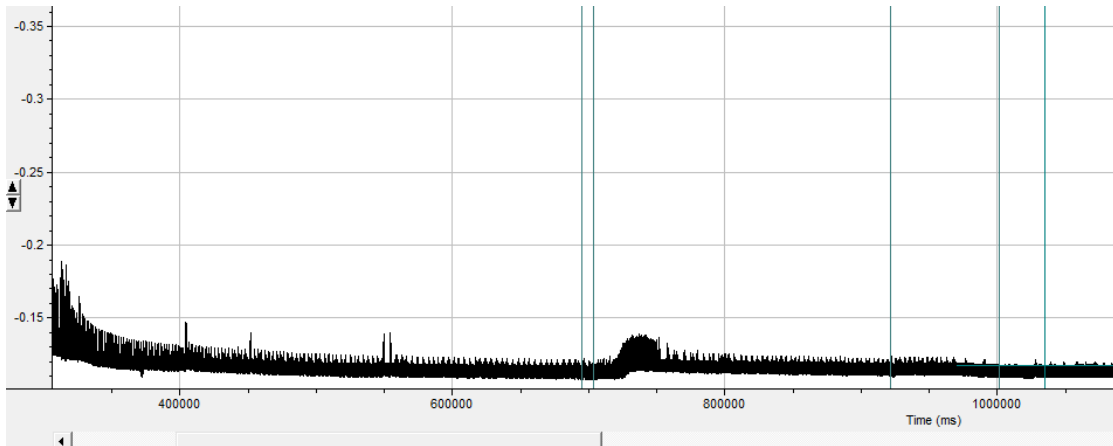


Figura 5: Registro de la actividad contráctil del músculo cardíaco durante la isquemia control.

Finalizados los 15' de isquemia, se procedió a reperfundir al corazón, evidenciándose recuperación con alteraciones en cocontracción y actividad eléctrica (arritmias). La contractilidad mecánica apareció de forma gradual, hasta que pasados los 3' el corazón retornó a condiciones similares a las del comienzo, estabilizando gradualmente el ritmo y el inotropismo a condiciones prácticamente iguales a las iniciales (preisquémicas).

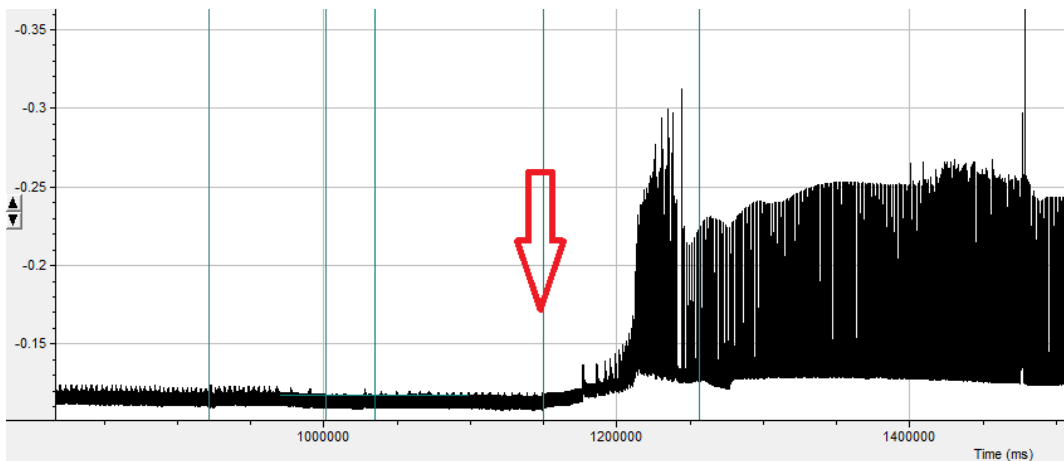


Figura 6: Registro de la actividad contráctil del músculo cardíaco durante la reperfusión. La flecha indica el inicio de la reperfusión.

V.B.2 – Cardioprotección farmacológica por anestésicos opioides

2) Efecto del agregado de remifentanilo 4.8 nM, a la inducción de isquemia prolongada y reperfusión (condicionamiento, cardioprotección farmacológica).

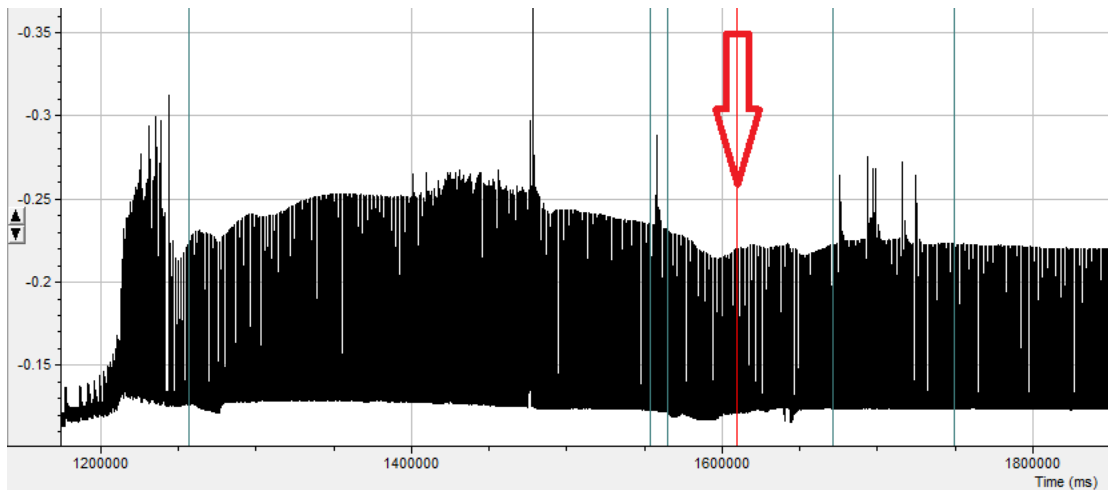


Figura 7: Registro de la actividad contráctil del músculo cardíaco. La flecha roja indica el momento en que se administró el remifentanilo.

Pasados los 7' de recuperación, se aplicó una solución de remifentanilo 4,8 nM. Se observó un leve inotropismo negativo, acompañado de alteraciones leves a nivel del registro eléctrico. Se observó también bradicardia.

A los 5' de perfusión con remifentanilo, se indujo una nueva isquemia prolongada de 15' de duración, pero en presencia de remifentanilo 4.8 nM. El declive de la función cardíaca tardó considerablemente más tiempo, conservándose la contractilidad por mayor tiempo, con incluso un leve aumento en su inotropismo con respecto al de la isquemia control. A nivel del registro eléctrico los efectos de alteraciones en el ritmo y caída de la frecuencia durante la isquemia fueron también francamente disminuidos.

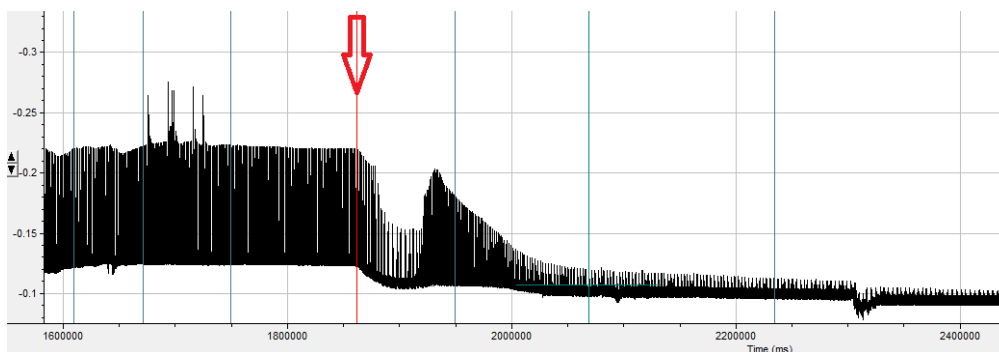


Figura 8: Registro de la actividad contráctil del músculo cardíaco. La flecha roja indica el inicio de la isquemia.

La reperfusión se realizó con la misma solución de remifentanilo agregada anteriormente. Se registró una rápida recuperación de la función cardíaca al 1'30", en comparación con los 3'30" de la isquemia control. Sin embargo, la recuperación cursó con una bradicardia que pronto desaparece.

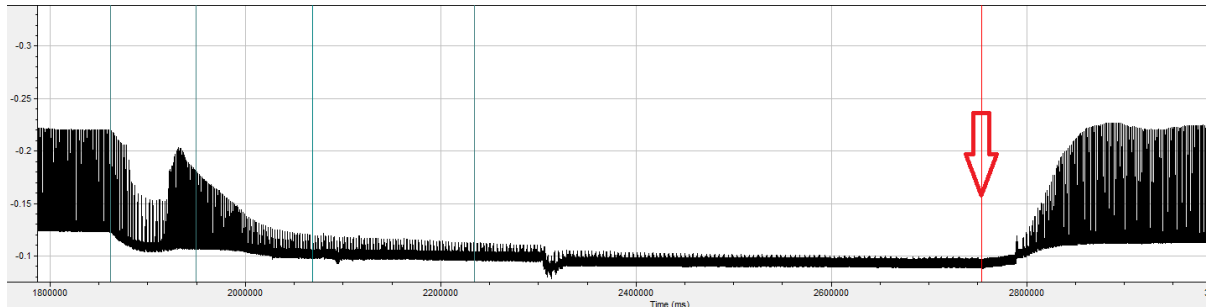


Figura 9: Registro de la actividad contráctil del músculo cardíaco durante la isquemia con remifentanilo. La flecha indica el momento en que se ha hecho la reperfusión con remifentanilo.

V.B.3 – Cardioprotección farmacológica por precondicionamiento isquémico.

Se esperó 5 minutos para que el corazón se estabilice y luego se empezaron a inducir las isquemias como se observa en la figura siguiente.

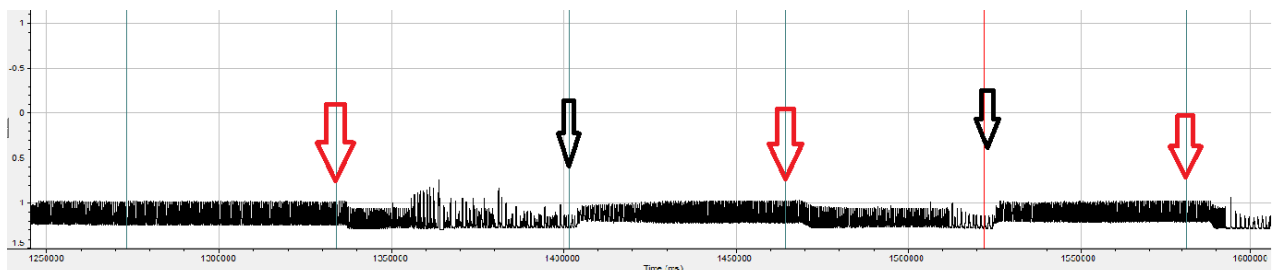


Figura 10: Inducción de varias isquemias de corta duración y posterior reperfusión. Las flechas rojas indican el tiempo en que fue inducida la isquemia y las flechas negras indican el instante que se inició la reperfusión. Registro de la actividad mecánica del corazón aislado de cobayo. En la figura se observan los procedimientos reiterados de isquemia y reperfusión breves y reiterados, constituyendo así un precondicionamiento isquémico. La reperfusión cursa de manera normal, con el corazón recuperando su actividad contráctil progresivamente hasta alcanzar un valor de contractilidad inicial previo a la isquemia. Sin embargo, se observa que para cada episodio breve de isquemia y subsecuente reperfusión, la contractilidad

se altera brevemente si la comparamos con valores iniciales. En la inducción de los últimos episodios de isquemia reperusión breves, es interesante notar que la actividad mecánica del corazón decae ya más lentamente en comparación con la primera isquemia. Tampoco hallamos pérdidas del ritmo como en los primeros episodios. Esto puede explicarse por el condicionamiento preisquémico ocurrido en los episodios iniciales de la salva de episodios a los que se sometió el corazón. Este condicionamiento cardíaco, permitió la generación de mecanismos intrínsecos que permitieron soportar la alta carga de estrés generado por la isquemia.

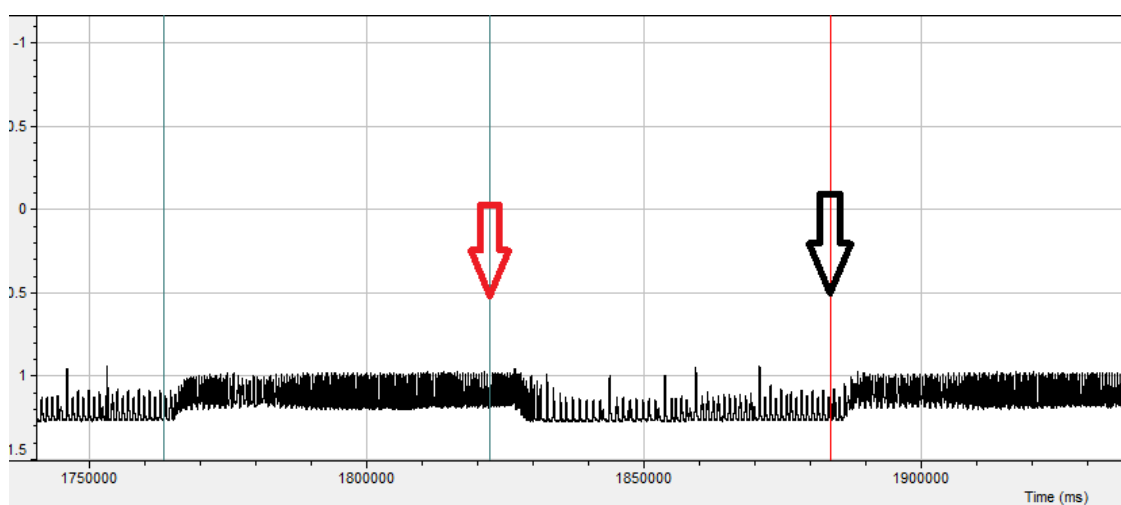


Figura 11: Última isquemia breve y su reperusión correspondiente. La flecha roja indica inicio de la isquemia. La flecha negra indica inicio de la reperusión. Registro de la actividad mecánica del corazón aislado de cobayo.

En esta última isquemia breve es evidente el condicionamiento que tiene el corazón al presentar un ritmo y frecuencia casi estable, en comparación con los protocolos de isquemia anteriores.

Por último, se realizó una isquemia de larga duración (15 minutos), pero en esta ocasión precedida por los episodios repetidos de isquemia y reperusión breves (condicionamiento preisquémico mecánico). Se observó como en la isquemia prolongada control efectuada previamente, un descenso progresivo tanto de la actividad contráctil como eléctrica del corazón. Resulta interesante señalar que el corazón se adaptó a esta situación de manera similar a lo observado con el condicionamiento farmacológico por remifentanilo, notándose

un declive de la actividad contráctil que en presencia de condicionamiento presiquémico mecánico, tardó varios minutos en cesar al compararse con la isquemia control prolongada.

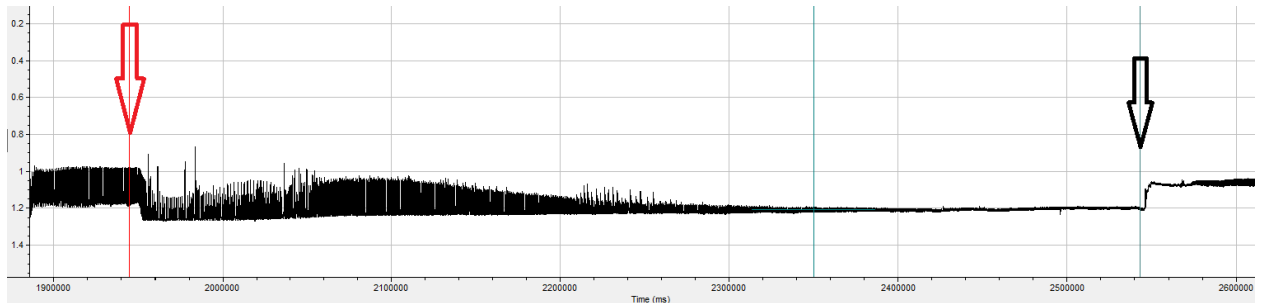


Figura 12: Protocolo de isquemia prolongado. La flecha roja indica el comienzo de la isquemia y la flecha negra indica el instante que se comenzó la reperfusión. Registro de la actividad mecánica del corazón aislado de cobayo.

VI. Discusión, Conclusiones y Perspectivas:

En base a lo observado durante la actividad práctica, coincidentemente con la bibliografía utilizada se puede decir que la isquemia es una situación en la que disminuye el aporte sanguíneo al corazón y como consecuencia se ve una alteración que finalmente culmina con el cese de la actividad contráctil⁷.

A punto de partida de comprender las fallas funcionales a nivel orgánico, celular y molecular en la isquemia y en la injuria por isquemia reperfusión (IR), planteamos es posible plantear los posibles blancos terapéuticos con el fin de disminuir los daños producidos por la IR.

También observamos que episodios transitorios de isquemia confieren protección frente a posteriores isquemias, conociéndose dicho fenómeno con el nombre de pre acondicionamiento isquémico, siendo un condicionamiento o mecanismo de cardioprotección originariamente mecánico⁷.

Tanto los mecanismos cardioprotectores farmacológicos como los mecánicos, se mostraron efectivos para proteger al corazón ante las alteraciones funcionales y daños provocados por una isquemia prolongada. Esto fue demostrado experimentalmente. En ambos casos se observó una disminución de la contractilidad más lenta durante la instalación de la isquemia.

Concomitantemente también se observaron alteraciones eléctricas menos pronunciadas y más lentas en aparecer en presencia de los agentes cardioprotectores. Las prolongaciones de los efectos deletéreos de la isquemia por la presencia de los agentes cardioprotectores fueron de alrededor de 2 a 3 minutos (desde 1 30 a 3 30 o 4 30 luego de iniciada la isquemia prolongada) En concordancia, la recuperación de la capacidad contráctil y estabilización de la actividad eléctrica ante una reperfusión luego de una isquemia prolongada, es francamente más rápida en presencia de ambos agentes cardioprotectores, en comparación con la ausencia de los mismos durante la situación control.

A raíz de estas observaciones entonces podemos afirmar el efecto cardioprotector del remifentanilo en el evento de isquemia y de reperfusión además del ya conocido efecto anestésico.

En relación al condicionamiento mecánico, éste produjo efectos similares a los del farmacológico, permitiendo plantearnos la pregunta de si hay concordancia o sinergismo de las vías moleculares de ambos mecanismos. A partir de estos experimentos demostramos también el efecto cardioprotector del preacondicionamiento mecánico.

En suma, por todo lo expuesto anteriormente se puede concluir que el preacondicionamiento, tanto mecánico como farmacológico constituyen posibles estrategias terapéuticas destinadas a disminuir los daños durante la isquemia como las alteraciones producidas por injuria por reperfusión. Tanto el canal o poro mitocondrial (MPTP), así como el manejo de Ca^{2+} intracelular por múltiples transportadores y canales, son eventos centrales para comprender estos mecanismos de daño y protección cardíacos.

VI. Agradecimientos:

A los integrantes del equipo del laboratorio de canales iónicos, principalmente a nuestro tutor Dr. PhD. Gonzalo Ferreira, quien nos guió con dedicación y entusiasmo durante todo este proceso de aprendizaje.

Además agradecer a los ayudantes del departamento y estudiantes de la Licenciatura en Biología Humana, Carlos Costa y Hugo Torres por su colaboración en todas las actividades prácticas.

VII. Bibliografía:

1. Perk, J., et al. (2012). "European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)." Eur Heart J **33**(13): 1635-1701.
2. Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-230.
3. Tsutsui, H., et al. (2011). "Oxidative stress and heart failure." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **301**(6): H2181-H2190.
4. Zhang, T., et al. (2004). "Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: friends or foes?" Recent Prog Horm Res **59**: 141-168.
5. Baradaran, A., et al. (2014). "Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants." J Res Med Sci **19**(4): 358-367.
6. Nickel, A., et al. (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination." J Mol Cell Cardiol **73**: 26-33.
7. Halestrap, A. P., et al. (2007). "The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning." Biochim Biophys Acta **1767**(8): 1007-1031.
8. Akar, J. G. and F. G. Akar (2007). "Regulation of ion channels and arrhythmias in the Ischemic heart." J Electrocardiol **40**(6 Suppl): S37-41.
9. Murphy, E. and C. Steenbergen (2008). "Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury." Physiol Rev **88**(2): 581-609.
10. Murry, C. E., et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." Circulation **74**(5): 1124-1136.

11. Hausenloy, D. J., et al. (2005). "Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(2): H971-976.
12. Ferreira, G. (1992). Registro y caracterización del movimiento de carga intramembrana en miocitos aislados de miocardio ventricular de cobayo. Tesis de Maestría. PEDECIBA: 1-176.
13. Gottlieb, R. A. (2011). "Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury." J Cardiovasc Pharmacol Ther **16**(3-4): 233-238.
14. Bell, J. R., et al. (2014). "CaMKII-dependent responses to ischemia and reperfusion challenges in the heart." Front Pharmacol **5**: 96.
15. Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.
16. Fauconnier, J., et al. (2013). "Type 2 ryanodine receptor: a novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion." Pharmacol Ther **138**(3): 323-332.
17. Leung, A. W. and A. P. Halestrap (2008). "Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 946-952.
18. Yellon, D. M. and D. J. Hausenloy (2007). "Myocardial reperfusion injury." N Engl J Med **357**(11): 1121-1135.
19. Hausenloy, D. J., et al. (2005). "The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning." Trends Cardiovasc Med **15**(2): 69-75.

NOTA : Si bien las figuras 1, 2 y 3 se tomaron de los trabajos mencionados por su claridad y estética, deseamos dejar constancia que hemos trabajado en versiones en español de las mismas. Decidimos poner las originales en esta monografía por su claridad conceptual y por respeto a los autores hemos leído.