

## Precondicionamiento isquemico: de los mecanismos basicos a las aplicaciones clinicas

MICHAEL V. COHEN, JAMES M. DOWNEY

### RESUMEN

**Cuando el corazon** se somete a un periodo transitorio de isquemia no letal, rapidamente se adapta, tornandose resistente al infarto frente a una nueva isquemia. Esta adaptación se llama precondicionamiento (PC). Esta cardioproteccion mostro que esta mediada por la **estimulación de receptores ligados a la PKC** (adenosina, bradiquinina, opioides, etc.) y estos receptores protegen activando a la proteinquinasa C (**PCK**). La PCK es el primer elemento de una cascada de quinasas compleja, que se activa durante la isquemia prolongada en el corazon precondicionado. Estudios recientes implican que la proteinquinasa ( $p38$ ) activada por mitogeno ( $p38$  MAPK) **lleva la sepal desde la PKC** hasta los canales mitocondriales de  $K_{ATP}$ , provocando su apertura y protegiendo así al corazon. La cardioproteccion del PC ocurre **en todas las especies probadas hasta el momento**, y posiblemente tambien en el hombre. Se espera que, a medida que se comprenda más integralmente el mecanismo del precondicionamiento, el precondicionamiento farmacológico se torne practico para el use clinico. *REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 285-299.*

*Palabras clave:* Adenosina - Canales de  $K_{ATP}$  - MAPKAPK2 -  $p38$  MAPK - Proteinquinasa C - Tirosinquinasa

### INTRODUCCION

Dado que la enfermedad arterial coronaria es la principal causa de mortalidad, durante años los cardiólogos han intentado hallar técnicas que permitan reducir al mínimo los efectos deletéreos de la isquemia miocárdica y disminuir la extensión del infarto de miocardio después de la oclusión coronaria. Si bien el concepto de protección farmacológica del miocardio isquémico fue propuesto por primera vez por Maroko y colaboradores (1) hace más de dos décadas, y que desde entonces ha sido objeto de intensas investigaciones, aún no contamos con un agente aprobado que aumente la resistencia del corazón al infarto en el contexto clínico. El obstáculo primario para el desarrollo de una droga de este tipo ha sido la falta de conocimientos acerca del modo en que la isquemia provoca la muerte de los miocitos. Los candidatos previos como agentes terapéuticos como los betabloqueantes, los secuestradores de radicales libres y los antagonistas calcícos produjeron resultados divergentes cuando se probaron en modelos en animales. (2, 3) Sin embargo, en 1986 se

descubrió un mecanismo de protección endógeno en la forma de precondicionamiento isquémico. (4) Esta fue la primera intervención que limitó, en forma inequívoca, el tamaño del infarto en un modelo en animal. Se estima que si se pudiese comprender este mecanismo de protección, sería posible emular este efecto en forma farmacológica y, finalmente, administrar agentes antiinfarto a los pacientes antes de los infartos agudos de miocardio o en el momento en que estos se presentaran.

### Historia natural del precondicionamiento

El precondicionamiento isquémico fue descrito por primera vez por Murry y colaboradores. (4) Los autores observaron que el tamaño del infarto que resulta de la oclusión durante 40 minutos de una rama de la arteria coronaria de perro se podía reducir en gran medida si el corazón se sometía a cuatro periodos previos breves de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión antes de la isquemia sostenida. Encontraron que el corazón se autoadaptaba en el lapso de minutos para resistir al infarto pro-

ducido por la isquemia. Este fenomeno se denomina preconditionamiento isquemico clasico y su existencia se ha demostrado en todas las especies probadas, incluidos la rata, (5) el conejo (6, 7) y el cerdo. (8) Las evidencias mas recientes indican que el preconditionamiento clasico es seguido de una segunda ventana de proteccion, menos potente, pero que dura varios dias. (9, 10) No es posible examinar directamente los corazones humanos se pueden preconditionar contra el infarto. Sin embargo, existen fuertes evidencias circunstanciales de que en el corazon humano existe el preconditionamiento. (11, 12)

La isquemia transitoria produce ademas una depresion no letal de la funcion contractil del miocardio, llamada atontamiento, asi como arritmias que aparecen durante la isquemia y la reperfusion. Si bien existe controversia acerca del efecto protector del preconditionamiento contra el atontamiento, existe evidencia considerable de que el preconditionamiento mejora las arritmias inducidas por la isquemia y la reperfusion. Sin embargo, todos estos trabajos se han hecho en perros (13) y en ratas (14) que presentan una incidencia elevada de arritmias durante la isquemia y despues de ella. El efecto antiarritmico ha sido dificil de demostrar en conejos.

#### El preconditionamiento esta mediado por receptores

Los estudios iniciales demostraron que el preconditionamiento clasico no implicaba la apertura de las colaterales de las coronarias, (4) la induccion de antioxidantes, (15) la sintesis de proteinas protectoras (16) o cambios de las ATPasas mitocondriales. (17) El primer avance importante se produjo cuando se demostro que la proteccion estaba mediada por receptores. Durante la isquemia, el miocardio libera numerosas sustancias quimicas, que incluyen adenosina, catecolaminas, angiotensina II, bradiquinina y endotelina. Todas estas sustancias pueden ocupar receptores de las celulas cardiacas y, como se explica mas adelante, pueden contribuir al preconditionamiento.

La adenosina es un subproducto del catabolismo dentro de la celula isquemica. Es producida por el corazon cuando hay una hidrolisis neta de ATP. La eliminacion de dos fosfatos de alta energia genera AMP. Este ultimo es desfosforilado por la 5'-nucleotidasa para producir adenosina libre, que puede salir de la celula con facilidad. Una vez en el espacio intersticial, la adenosina se une a los receptores de la superficie de los cardiomiocitos. En 1991 comunicamos que la adenosina desempenaba un papel importante en el preconditionamiento isquemico. (7) Observamos que el bloqueo del receptor de adenosina abortaba la proteccion por preconditionamiento isquemico en los corazones de conejo;

no obstante, tenia poco efecto en los corazones no preconditionados. Mas aun, la infusion intracoronaria de adenosina o de R(-)-N<sup>6</sup>-(2-fenilisopropilo) adenosina C (R-PIA), un agonista selectivo del receptor A<sub>1</sub>, durante 5 minutos, simulo el efecto protector en reemplazo de una isquemia condicionante de 5 minutos. Se concluyo que la adenosina, actuando a traves de sus receptores A<sub>1</sub>, gatillaba el preconditionamiento. La hipotesis de la adenosina ha sido validada por muchos estudios realizados en conejos, (18) cerdos, (19) perros (20) e incluso en tejido humano. (21)

Ademas de la adenosina, otros sistemas de receptores contribuyen a gatillar el preconditionamiento en el corazon de conejo. Vegh y colaboradores (22) comunicaron que, en perros, la bradiquinina contribuyo como un gatillo para el efecto antiarritmico del preconditionamiento. Se demostro luego que la infusion del HOE 140, un inhibidor selectivo del receptor B<sub>2</sub> de bradiquinina, antes de una isquemia de 5 minutos bloqueaba la proteccion en conejos anestesiados. (23) Por el contrario, una breve infusion de bradiquinina redujo el infarto. La explicacion de esta novedosa observacion fue que la oclusion de 5 minutos estuvo justo por encima del umbral para preconditionar el corazon. Si tanto los receptores de adenosina como los de bradiquinina contribuyesen a la activacion de la via de la sepal descendente (*downstream*), la perdida de cualquiera de los componentes aumentaria el umbral necesario para gatillar la proteccion. De este modo, el HOE 140 no podria evitar la proteccion de 4 ciclos de preconditionamiento, los cuales, supuestamente, producirian suficiente cantidad acumulada de adenosina para alcanzar el umbral de proteccion.

La rata ha resultado un modelo sorprendente. Mientras que algunos han propuesto que los receptores α<sub>1</sub>-adrenérgicos gatillan la proteccion (24) y otros han sugerido que el principal disparador es el calcio, (25) queda claro que la adenosina juega un papel muy limitado, (26) si es que desempeña alguno (6) en esta especie. El antagonista del receptor opioide naloxona bloqueo la proteccion del preconditionamiento contra el infarto en las ratas, sugiriendo que los opioides son el gatillo endogeno predominante en el corazon de la rata. (19) Tambien se demostro en conejos que la naloxona bloqueo la proteccion de un ciclo de preconditionamiento, si bien no afectó la proteccion lograda por varios, lo cual sugirio que los opioides actuan en conjunto con la adenosina y la bradiquinina. (27) Todos los receptores mencionados lineas arriba tienen un rasgo en comun: se unen a la proteinquinasa C (PKC) de los cardiomiocitos. Se sabe, ademas, que los radicales libres activan la PKC y, de hecho, los secuestradores de radicales libres tambien elevan el umbral para el

precondicionamiento. (28, 29) Los receptores  $\alpha_1$  de angiotensina y los  $ET_B$  de endotelina han mostrado que también se acoplan a la PKC en los cardiomiocitos. La activación de estos receptores, según se demostró, emula la protección del precondicionamiento isquémico contra el infarto, pero su bloqueo no aumenta el umbral para el precondicionamiento. (30-32) De este modo, no parece que estos receptores sean los gatillos endógenos del precondicionamiento, al menos en el corazón del conejo.

### **El papel de la proteinquinasa C en el precondicionamiento**

La adenosina se une al dominio extracelular de un receptor proteico complejo que atraviesa la membrana celular, el cual, cuando se encuentra ocupado, activa una proteína mensajera, llamada proteína G. Cuando se activa, la proteína G provoca una serie de eventos intracelulares, que incluyen la activación de las proteinquinasas. Las evidencias actuales sugieren que la adenosina y sus receptores generan la protección mediante la activación de una proteinquinasa en particular, la PKC. Los inhibidores específicos de la proteinquinasa C como la estaurosporina abortarían la protección del precondicionamiento isquémico en el corazón del conejo (33) y de la rata, (24) pero tendrían poco efecto sobre los corazones no condicionados. Por otra parte, los activadores directos de la PKC como los ésteres de forbol o los diacilgliceroles pueden simular la protección del precondicionamiento en varios modelos en animales, incluso en los cardiomiocitos humanos (12) y de conejo. (34)

Estos datos confirman claramente que la PKC está implicada en el precondicionamiento de los conejos, las ratas y el tejido humano. Sin embargo, los estudios sobre el papel de la PKC en animales de experimentación más grandes han generado ciertas dudas respecto de la importancia universal de esta quinasa en la vía de transducción de la señal de precondicionamiento. (35) La investigación hecha en perros arrojó resultados conflictivos, (36, 37) tal vez relacionados en parte con las dificultades para lograr concentraciones plasmáticas suficientemente elevadas de los antagonistas de la PKC hemodinámicamente desestabilizantes y de costo muy alto. Un trabajo inicial concluyó que la inhibición de la PKC en los cerdos tampoco lograba bloquear el precondicionamiento. (38) Si bien un estudio de seguimiento del mismo grupo de investigadores confirmó esta observación, también notaron que el bloqueo simultáneo de la PKC con estaurosporina y de la tirosinquinasa con gonisteína (véase más adelante) revertían la protección. (8) Por lo tanto, la PKC resulta realmente importante para la protección por el pre-

condicionamiento en el miocardio porcino. Estos datos sugieren que en algunas especies existe una vía que contiene al menos una tirosinquinasa y actúa en paralelo con la PKC. El alto grado de redundancia tanto a nivel del receptor como de la quinasa pareciera que asegura la protección.

La activación de la PKC durante el precondicionamiento isquémico exhibe dependencia temporal. La infusión de estaurosporina separada por 5 minutos del periodo de precondicionamiento isquémico no evitó que se desarrollara la protección en el corazón aislado de conejo. (39) Sin embargo, cuando el inhibidor de la PKC se administró inmediatamente antes del periodo de isquemia y se continuó durante el periodo prolongado de isquemia, se abolió por completo la reducción del tamaño del infarto consecuente al precondicionamiento. Estos datos indican que no se requiere actividad de la PKC durante el periodo de precondicionamiento, sino que esta resulta esencial solo durante la isquemia sostenida.

Este hallazgo genera el interrogante respecto del modo en que las células recuerdan que han sido precondicionadas. La respuesta más probable en un sistema que involucra a las quinastas sería la presencia o la ausencia de fosforilación de un componente crítico. Se podría plantear la hipótesis de que en tanto el sustrato efector permanezca fosforilado, el corazón estará precondicionado. El experimento con estaurosporina que se comentó argumenta en contra de la hipótesis de la fosforilación, dado que si esta fuese correcta, la estaurosporina debería haber bloqueado la fosforilación durante la fase de gatillado, y aun así no se abolió la protección. Una de las características centrales de la activación de la PKC es la translocación de la quinasa desde el citosol a las membranas y estructuras del citoesqueleto. Las evidencias recientes señalan que la translocación depende de la unión de la PKC a una familia de proteínas llamadas receptores de la quinasa C activada (RACK, del inglés *receptors of activated C-kinase*). (40) Liu y colaboradores (41) propusieron que la translocación de la PKC explica la discrepancia temporal entre la estimulación del receptor y la activación de la quinasa y podría representar la memoria del precondicionamiento isquémico. La hipótesis propone que los agonistas gatilladores liberados durante la isquemia precondicionante inducen la translocación relativamente lenta de la PKC al sitio efector. La quinasa estaría en suspenso, de modo que por la inducción de la segunda isquemia la PKC se reactivaría en forma suficientemente precoz como para proteger la célula. La hipótesis de la translocación también explicaría por qué los receptores de adenosina deben ser ocupados nuevamente al inicio de la segunda isquemia. (42) En consecuencia, en tanto la

PKC permanezca translocada, el corazón estará precondicionado. Sin embargo, cuando la enzima retorna al citosol, esta protección se perderá.

Los datos que apoyan la hipótesis de la translocación aun son debatidos. La desorganización de los microtubulos con colchicina, que inhibe la translocación intracelular, bloquea el precondicionamiento isquémico en los conejos. (41) Sin embargo, un estudio posterior hecho en los miocitos de conejo no logra documentar la translocación de la PKC después del precondicionamiento isquémico o el tratamiento con adenosina. (6) Además, las diferencias en la distribución subcelular de la PKC total, entre los corazones precondicionados y no precondicionados no pudieron verse en los perros. (36) Esto hizo que los investigadores dudaran nuevamente de que la PKC se activara en algún momento durante el precondicionamiento, haciendo que cumpliera una función de memoria. (35) Los datos más convincentes en apoyo a la translocación de la PKC han sido comunicados por Ping y colaboradores. (43) Usando una metodología muy precisa, hallaron que en el miocardio de conejo había 11 isoenzimas de la PKC. Después de varios ciclos de oclusión coronaria breve/reperfusión, documentaron la translocación selectiva de las isoenzimas PKC $\epsilon$  y  $\eta$  a la fracción particulada del corazón de conejo. De esta forma, quedó claro que la imposibilidad de Przyklenk y colaboradores (36) de detectar la translocación de la PKC después del precondicionamiento del miocardio canino, se relacionaba con que solo midieron la actividad de la PKC total y no la de sus isoenzimas específicas. La medición de la translocación o actividad de la PKC total simplemente no refleja las alteraciones sutiles en la distribución subcelular de una o dos isoenzimas cruciales. Varios grupos han mostrado también evidencias convincentes de la translocación de la PKC en corazón de rata intacto, precondicionado, usando inmunohistoquímica (24,44) o técnicas de *immunoblotting*. (45, 46) La translocación de isoenzimas también se ha observado en los cardiomiocitos aislados de ratas neonatas, durante el precondicionamiento por hipoxia. (40,47) Mientras que en la actualidad muchos datos apoyan el papel de la PKC en el precondicionamiento isquémico, aun no logran probar su función en la memoria.

Para servir como memoria, la translocación de la PKC debería correlacionarse con la ventana de protección que provee un estímulo precondicionante. Si bien la ocupación del receptor resulta en la translocación de la PKC, esta última retorna rápidamente al citosol con la desaparición de los agonistas del receptor. (48) Resulta interesante el hecho de que Albert y Ford (49) no hayan podido detectar la translocación de la isoenzima de PKC después de 5 minutos de isquemia global y de 15 minutos de reper-

fusión en el corazón aislado de rata, pero que si hayan podido hacerlo durante un período ulterior de 30 minutos de isquemia global. En estos corazones, la translocación se asocia con la fosforilación de proteínas particuladas específicas, asociadas con la fosforilación. Por otra parte, el grupo de Parrat ha comunicado la existencia de translocaciones que persisten hasta 4 horas después del precondicionamiento. (50) Nunca se ha realizado una prueba cuidadosa de la hipótesis de la translocación en relación con la memoria del precondicionamiento y su validez aun no está resuelta.

No todas las isoenzimas de la PKC se translocan por el precondicionamiento. Ping y colaboradores (43) vieron que solo la PKC $\epsilon$  y  $\eta$  se translocaban después de una isquemia breve con reperfusión en el conejo, mientras que Mitchell y colaboradores (24) comunicaron el movimiento de la PKC  $\epsilon$  y  $\delta$  en el corazón de la rata precondicionada por la isquemia. En otros estudios en los corazones de rata intactos, (45, 46) así como en los efectuados en cardiomiocitos aislados, (40, 47) se registraron translocaciones de las isoenzimas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  en combinaciones variables. Pero la translocación de cualquier isoenzima dada no prueba que esa isoenzima sea la responsable del precondicionamiento. El movimiento de una isoenzima de la PKC del citosol a la membrana podría ser simplemente un epifenómeno resultante de la isquemia, sin que se gatille ninguna protección consecuente. En un estudio reciente bloqueamos isoenzimas específicas en un modelo de precondicionamiento en cardiomiocitos de conejo, empleando péptidos pequeños, idénticos a las porciones de los dominios de unión de las RACK, de las isoenzimas respectivas. Dado que cada péptido derivaba de una isoenzima, cada uno bloqueaba la translocación a su RACK y, por lo tanto, la activación solo de la isoenzima de la cual derivaba. Solo el péptido anti- $\epsilon$  bloqueó la protección del precondicionamiento. (51) Los péptidos anti-( $\delta$ ,  $\delta$  y  $\eta$ ) no tuvieron efecto sobre la protección del precondicionamiento isquémico en este modelo. Se concluyó que la PKC $\epsilon$  actúa sola para proteger al corazón. Se desconoce si opera por especificidad con el sustrato o por especificidad de las RACK asociadas con  $\epsilon$ .

#### 5'-nucleotidasa

Una teoría atractiva sobre el mecanismo de precondicionamiento se sustenta en la activación de la 5'-nucleotidasa. Esta enzima cataliza la desfosforilación del 5'-monofosfato de adenosina (AMP) a adenosina. Durante la isquemia, el ATP se metaboliza a AMP a medida que las células sin oxígeno vacían sus depósitos de alta energía. La cantidad de adenosina producida por la célula cardíaca se ve limitada entonces por la actividad de la 5'-

nucleotidasa en esa célula. Kitazake y colaboradores, quienes presentaron esta teoría, mostraron que la 5'-nucleotidasa es activada por la PKC, (52) y propusieron que un corazón precondicionado está protegido porque libera más adenosina. (37) Kitazake planteó la hipótesis de que la PKC activa la 5'-nucleotidasa, la que a su vez produce la liberación de adenosina, y que, en tanto la 5'-nucleotidasa está activada, el corazón estará precondicionado. Pero esta hipótesis ha sido desafiada por varias observaciones. En primer lugar, el corazón precondicionado libera, en realidad, menos adenosina durante la isquemia que un corazón no precondicionado. (53) En segundo lugar, los niveles de adenosina durante la isquemia de miocardio pueden aumentar en varios órdenes de magnitud, después del tratamiento con un inhibidor de la adenosina desaminasa, pero sin que ello asegure protección. (54) Finalmente, los experimentos realizados en corazón de conejo indican que la PKC está corriente abajo (*downstream*) de la adenosina en la vía del precondicionamiento, (55) y no corriente arriba (*upstream*) como lo requeriría la hipótesis de la 5'-nucleotidasa. De este modo, la protección por un activador directo de la PKC no se vería bloqueada por un antagonista del receptor de adenosina, pero un bloqueante de la PKC podría evitar la protección inducida por un agonista del receptor de adenosina.

A pesar de estas observaciones, la 5'-nucleotidasa aún desempeña un papel importante. En el precondicionamiento isquémico, la adenosina actúa no solo como gatillo sino también como mediador durante el período de isquemia prolongada. Pero durante esa segunda oclusión, el pH del tejido no cae tanto. (56) Si bien la acidosis atenuada no parece que esté relacionada con la protección ulterior, el pH más alto promueve un aumento de la actividad de la adenosinquinasa que, al refosforilar la adenosina, disminuye su acumulación en el espacio intersticial. (57) La activación de la 5'-nucleotidasa se opone a este efecto, garantizando de este modo la presencia de suficiente adenosina durante la segunda oclusión. Así, la activación de la 5'-nucleotidasa sirve probablemente como un sistema de retroalimentación positiva para reforzar la protección.

#### Oxido nítrico

Se ha propuesto que el óxido nítrico (NO) puede desempeñar un papel en el precondicionamiento isquémico. Vegh y Parrat (58, 59) concluyeron que el NO estaba implicado en el precondicionamiento inducido por marcapaseo, contra las arritmias, en el corazón de perro. Bolli y colaboradores (10) tienen evidencias convincentes de que el NO actúa como gatillador y al mismo tiempo como mediador de la protección en la fase tardía, que se manifiesta 24

horas después del precondicionamiento isquémico. Finalmente, Yoshida y colaboradores (60) han notado que el NO producido por la isquemia-reperfusion provoca la translocación de la PKC y mejora la recuperación de la función en el corazón de rata. A pesar de estos datos, ha sido difícil demostrar que el NO desempeña algún papel en el precondicionamiento clásico contra el infarto. Encontramos que la introducción en el líquido de perfusión del L-NAME, un bloqueante de la NO sintetasas, no lograba bloquear el efecto precondicionante antiinfarto en los corazones aislados de conejo. (61) Patel y colaboradores (62) encontraron que la inhibición del NO en el corazón de conejo *in situ* no solo no lograba impedir la protección sino que resultaba levemente protectora.

#### Tirosinquininasas

Si bien el conocimiento actual con respecto a las señales celulares después de la activación del receptor apunta a que la PKC sea parte de la vía que lleva a la protección por precondicionamiento, no resulta obvio que esta esté por detrás de la PKC. Experimentos recientes han arrojado luz sobre la vía de la transducción de la señal distal a la PKC, en el proceso de precondicionamiento. La PKC pertenece a un gran grupo de quininas que fosforilan las proteínas sustrato en el residuo de serina o de treonina. Además de las quininas de serina/treonina celulares, existe además otra clase de quininas que fosforilan los residuos de tirosina. Maulik y colaboradores (63) fueron los primeros en demostrar en corazones precondicionados de rata que la isoflavona genisteína, un antagonista relativamente selectivo de la tirosinquinasa, bloquea la recuperación funcional aumentada después de la isquemia. En la vía de la transducción de la señal en conejos parece que está presente al menos una tirosinquinasa, dado que tanto la genisteína como la lavendustina A, un antagonista químicamente distinto y aun más selectivo de la tirosinquinasa, abolió la protección en corazones precondicionados (64) pero no tuvo efectos sobre los infartos de corazones no precondicionados.

Hay dos grupos principales de tirosinquininasas: las de receptores y las citosólicas. Las tirosinquininasas pueden estar bien corriente arriba o corriente abajo de la PKC en las cascadas de quinasa. Las tirosinquininasas de los receptores pueden estimular la fosfolipasa D, (63) que a su vez activa la PKC. Alternativamente, el PMA puede producir fosforilación de la tirosina dependiente de PKC en las células. (65) Pero se cree que la tirosinquinasa implicada en el precondicionamiento está corriente abajo de la PKC y no que sea parte de un receptor de superficie, dado que tanto la genisteína como la lavendustina A blo-

quearon la proteccion lograda por activacion directa de la PKC por accion de un forbol ester. (64) Las tirosinquinazas citosolicas estan ampliamente distribuidas en las celulas. Las MEK responsables de activar las MAP quinazas son buenos ejemplos de tirosinquinazas dependientes de PKC (vease mas adelante).

Nuestro estudio en conejos (64) sugirio que la PKC y las tirosinquinazas estan en serie. Pero en otras especies, las tirosinquinazas tambien pueden presentarse en una segunda via que excluye a la PKC (*bypass*). En el corazon de cerdo, ni los antagonistas de la PKC ni la tirosinquinasa sola pudieron bloquear la proteccion del preconditionamiento isquemico. En el caso de que se combinaran, la proteccion se eliminaba por completo. (8) Esta conducta sugiere la existencia de otra via de transduccion de la sepal, que es paralela a la PKC y contiene al menos una tirosinquinasa. El corazon de la rata puede actuar en forma similar. (66, 67). Los multiples ciclos de preconditionamiento tambien pueden superar la anulacion de la proteccion por bloqueantes de la PKC en el corazon de conejo, sugiriendo la presencia de una via de derivacion, que evita la PKC en esta especie. (68, 69) Practicamente no se conoce nada acerca de la via de *bypass* aparte de la observacion de que contiene al menos una tirosinquinasa.

#### Proteinquinazas activadas por mitogeno

Un grupo de quinazas es llamado proteinquinazas activadas por mitogeno (MAPK, del ingles *mitogen-activated-protein-kinases*). Las principales MAPK que se encuentran en el tejido cardiaco incluyen las quinazas reguladas por senales extracelulares (ERK1 /2), las quinazas NH<sub>2</sub>terminales p46 y p54 c-jun, las proteinquinazas activadas por el estres (JNK/SAPK) y la MAPK p38. Estas cascadas de MAPK pueden ser activadas por tirosinquinazas de receptores, la fosfolipasa C, los receptores acopiados a la proteina G y por diversas situaciones de estres celular como la isquemia. (70-72) Originalmente se encontro que las MAPK estaban intimamente comprometidas en la expresion genetica, pero se estan identificando otras funciones. Recientemente varios estudios han examinado el papel potencial de la MAPK p38 como constituyente de la via de preconditionamiento distal a la PKC. (63, 73)

Las MAP quinazas comparten un esquema de activacion similar. Una MAPK quinasa quinasa (conocida tambien como MAPKKK o MEKK) se activa por fosforilacion y a su vez fosforila a una MAPK quinasa (MKK o MEK) de los residuos de serina/treonina. (71). La MKK es una quinasa dual que fosforila simultaneamente tanto a la treonina como a una tirosina dentro de la zona Treo-X-Tir de la quinasa MAP. (74) La fosforilacion de ambos residuos resul-

to esencial para la activacion de la MAP quinasa. Todas las MAP quinazas son quinazas de prolina dirigidas a serina/treonina, preferentemente fosforilando los residuos de serina y treonina dentro de una secuencia Pro-X-Ser/Treo-Pro. Se sabe que la MAPK p38 activa directamente a la proteinquinasa 2 activada por proteinquinasa activada por mitogeno (MAPKAPK2) en forma dependiente de la fosforilacion, lo cual a su vez lleva a la fosforilacion de una proteina de bajo peso molecular del *shock* termico, la HSP 27. (75, 76) En algunas celulas la fosforilacion de la HSP 27 lleva a la polimerizacion de la actina del citoesqueleto, (77) lo cual parece aumentar la tolerancia del citoesqueleto al estres.

La relacion entre la PKC y la MAPK p38 activada por el estres y las cascadas de JNK no esta establecida con certeza. Sin embargo, una breve exposicion a la adenosina aumenta la actividad de la MAPK p38 en el corazon de rata (78, 79) y Maulik y colaboradores (63) mostraron que la actividad de la MAPKAPK2 aumentaba en corazones de rata preconditionados. Hemos obtenido datos similares en el corazon de conejo. (80) Aun mas importante es la observacion de Clerk y colaboradores (81) de que la activacion de la PKC eleva la actividad de la MAPKAPK2 en los cardiomiocitos del ventriculo de rata neonata. La activacion de los receptores acopiados a G y posteriormente de la PKC, puede estimular a la JNK. (82) Por otra parte, Ping y colaboradores (83) demostraron recientemente que la transfeccion de los cardiomiocitos de conejo con el cDNA de tipo salvaje de la PKC-ε induce la activacion de la JNK p46/p54, mientras que la activacion de la JNK por la oclusion y reperfusion de las coronarias en corazones de conejo queda abolida por la queleritrina. (84)

Maulik y colaboradores (85) comunicaron que las actividades de MAPK p 38 y MAPKAPK2 aumentaban en el corazon de rata preconditionado. Nuestros estudios revelaron que el nivel de fosforilacion del sitio de activacion de la MAPK p38 en el miocardio de conejo aumenta especificamente durante la isquemia, pero solo si inicialmente el corazon se habia puesto en un estado de preconditionamiento. (73) Esta conducta se correlaciona bien con la observacion de que la PKC ejerce su efecto protector solo durante la isquemia. (37) Recientemente hemos demostrado que la MAPKAPK2 durante la isquemia no se activa en el corazon de conejo aislado no preconditionado, pero que su actividad se incrementa cuatro veces durante la isquemia en un corazon ya preconditionado. (80) El pretratamiento con anisomicina, un activador de las vias de la MAPK/JNK p38 mimetiza por completo el efecto antiinfarto del preconditionamiento. (73) Mas aun, la proteccion de la anisomicina no podria ser bloqueada por el bloqueante de la PKC queleritrina, lo

cual prueba que la MAPK p38 esta corriente abajo de la PKC. (64) En conjunto, estos resultados sostienen un papel de la cascada de la MAPK p38 en la via de transduccion de la sepal preconditionamiento isquemico.

Es necesario reconocer que no todos los investigadores estan de acuerdo. Quiza las observaciones mas controvertidas han sido las hechas con el SB203580, un antagonista putativamente selectivo de la activacion de la MAPK p38. (86) En las celulas aisladas (73) y en el corazon de rata intacto (85) este antagonista bloquea por completo la proteccion del preconditionamiento isquemico. Estos datos aparentemente confirman nuestra presuncion acerca de la importancia central de la MAPK p38. Sin embargo, Armstrong y colaboradores (87) publicaron que el SB203580 promueve lesiones en las celulas no preconditionadas, mientras que otros han concluido que el SB203580 en realidad protege a los cardiomiocitos. (88, 89)

Finalmente, en algunas especies la proteinquinasa activada por el segundo estres, la JNK, puede ser mas importante para la proteccion que la MAPK p38. Barancik y colaboradores (90) encontraron que el preconditionamiento isquemico del miocardio de cerdo aumentaba en gran medida la actividad de la JNK y no la de la MAPK p38. Mas aun, la reduccion del tamano del infarto en los cerdos despues de la administracion de la anisomicina se correlacionaba con la actividad aumentada de la JNK pero no de la MAPK p38. (91) En el conejo no hemos detectado ningun incremento en la actividad de la JNK en el miocardio preconditionado (datos no publicados).

La tercera cascada de la MAPK es la via de la quinasa regulada desde el medio extracelular (ERK). Se activa por los receptores acoplados a la proteina G y por el factor de crecimiento. (74) Hay pocas evidencias de que esta cascada este implicada en el preconditionamiento isquemico (92) y nuestro hallazgo no publicado de que el PD 98059, un inhibidor potente de la via de la ERK, no lograba evitar la proteccion por el preconditionamiento en corazones de conejo confirma esta impresion.

El canal de  $K_{ATP}$  de las mitocondrias puede ser el efector final del preconditionamiento

Muchos investigadores han buscado el esquivo efector final. Hasta ahora ninguno ha sido identificado en forma inequivoca. Gross y Auchampach (93) fueron los primeros en proponer que el canal de  $K_{ATP}$  es el efector final del preconditionamiento isquemico. Estos canales son inhibidos por el ATP en la baja escala de concentracion micromolar y se abren a medida que caen los niveles de ATP. (94) Gran parte de la evidencia que apoya la hipotesis de que la apertura del canal de  $K_{ATP}$  representa el paso final en la

transduccion de la sepal del preconditionamiento se basa sobre estudios farmacologicos con abridores y cerradores de canales. En el corazon de perro, los abridores del canal de  $K_{ATP}$  emulan la proteccion del preconditionamiento isquemico, (93) mientras que los bloqueantes de canales como la glibenclamida (93) y el 5-hidroxidecanoato (95) abortan la proteccion. Estas observaciones se han hecho en muchos modelos que incluyen el musculo trabecular de la auricula humana. (11) La glibenclamida tambien bloquea la proteccion que da el preconditionamiento al corazon de conejo, (96) pero este efecto parece que es dependiente de la anestesia. (97)

Originalmente se propuso que la apertura de los canales del  $K_{ATP}$  del sarcolema provocaba un acortamiento de la duracion del potencial de accion miocardico, el cual a su vez ejerceria una accion cardioplejica. Sin embargo, el BMS-180448 (98) y la cromacalima, (99) otros abridores de canales de  $K_{ATP}$ , tambien resultaron protectores, independientemente de cualquier acortamiento del potencial de accion. La dofetilida, un agente antiarritmico de clase III, abolio el acortamiento del potencial de accion visto en los corazones preconditionados, pero no logro abolir la proteccion del preconditionamiento. (100) El 5-hidroxidecanoato (5-HD), el primero en mostrar su potente accion bloqueante de los canales de  $K_{ATP}$  en el musculo liso vascular, resulto efectivo en el bloqueo de la proteccion por el preconditionamiento. (93, 95) Posteriormente se encontro que el 5-HD no puede bloquear las corrientes  $I_{K_{ATP}}$  inducidas por la cromacalima en los cardiomiocitos. (101) Estas observaciones sugieren que hay una disociacion entre la proteccion y cualquier efecto sobre la duracion del potencial de accion y, por lo tanto, sobre los canales de  $K_{ATP}$  del sarcolema.

Estos datos que generan confusion pueden reconciliarse reconociendo que hay dos poblaciones distintas de canales de  $K_{ATP}$ : los que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria y los del sarcolema. Los canales de  $K_{ATP}$  de la mitocondria y del sarcolema tienen caracteristicas distintas. Los grupos de Marban y Grover (102) plantearon simultaneamente la hipotesis de que el preconditionamiento era el resultado de la apertura de los canales mitocondriales, no los del sarcolema. Encontraron que el diazoxido, un abridor selectivo del canal mitocondrial, resultaba efectivo para preservar la funcion posisquemica del corazon de rata, al igual que lo hacia el preconditionamiento. Esta proteccion era independiente del estado funcional de los canales de  $K_{ATP}$  del sarcolema y que el 5-HD, el potente bloqueante de los canales mitocondriales de  $K_{ATP}$ , podria revertir esa proteccion. (102) Se han obtenido resultados similares en los cardiomiocitos de conejo. (61) Encontramos que el diazoxido reducía sig-

nificativamente el tamaño del infarto en conejos anestesiados y que el 5-HD podía bloquear la protección del preconditionamiento isquémico. (103) Además, el HMR 1883, un cerrador selectivo, recientemente presentado, de los canales de  $K_{ATP}$  del sarcolema, (104) no tuvo efecto sobre la reducción del infarto en corazones de conejo preconditionados en dosis que cerraban los canales de  $K_{ATP}$  del sarcolema, según se ponía de manifiesto por una duración menor del intervalo Q-T en el electrocardiograma. (39) Mas aun, la protección del activador de MAPK p38, la anisomicina, también podía bloquearse con 5-HD, lo cual sugiere que la cascada de quinasas activada durante el preconditionamiento finalmente termina con la apertura de los canales de  $K_{ATP}$  mitocondriales. (103) No está claro por qué la apertura de los canales de  $K_{ATP}$  de la mitocondria tendría ese efecto de protección. La apertura de los canales haría que la mitocondria se hinche y los desacoplara ligeramente. Ninguno de estos efectos sería deseable durante la isquemia.

La evidencia señalada da fuerte sustento al compromiso de los canales de  $K_{ATP}$  de la mitocondria en la protección del preconditionamiento. Si bien la apertura de estos canales parece que es necesaria para la protección, no hay una evidencia definitiva de que, de hecho, sean los efectores finales.

Datos recientes de nuestro laboratorio indican que los canales de  $K_{ATP}$  de la mitocondria pueden actuar simplemente como otro paso en la transducción de la señal. (105) Encontramos que una exposición de 5 minutos al diazóxido dejó al corazón de conejo aislado en un estado protegido durante al menos 30 minutos después de haber lavado el diazóxido, conducta que recuerda la que se ve con una isquemia breve, adenosina o cualquiera de los otros agonistas gatilladores. Mas aun, los estudios temporales mostraron que el 5-HD podía bloquear la protección del preconditionamiento isquémico, cuando su administración era previa al episodio de preconditionamiento isquémico, pero que no tenía efecto cuando estaba presente solo durante la isquemia inicial. El 5-HA tuvo efectos similares cuando la protección se gatillo con una infusión de diazóxido de 5 minutos en reemplazo de la isquemia. El grupo de Ashraf ha comunicado que la protección del diazóxido en el corazón de rata puede ser bloqueada por un antagonista de la PKC, (106) resultado que nuevamente pondría al canal de  $K_{ATP}$  lejos, corriente arriba. Así, la apertura de los canales de  $K_{ATP}$  de la mitocondria parece que actúa más como un gatillo que como un efector final de la protección del preconditionamiento.

Debemos considerar la posibilidad de que otras entidades distintas de los canales de  $K_{ATP}$  sean los efectores finales. De hecho, un estudio muy reciente ha sugerido que es un canal de  $Cl^-$  y no un canal de

$K^+$  el responsable de la protección. (107) La apertura de un canal regulador de volumen protegería por oposición a la hinchazón osmótica asociada con la isquemia. Así, un canal iónico muy distinto e incluso una proteína no identificada podría ser aun el efector final.

Evidencia de que el preconditionamiento ocurre en el corazón humano

Existe además evidencia de que el tejido cardíaco humano puede ser preconditionado. En estudios de tejido y de células de miocardio humano escindido pareciera que los mecanismos de preconditionamiento son notablemente similares a los observados en animales de experimentación. Ikonomidis y colaboradores (12) observaron una sobrevivencia aumentada de los cardiomiocitos en cultivo, expuestos a una isquemia prolongada simulada, cuando eran preconditionados con episodios previos de isquemia breve simulada. Esta protección dependía tanto de la adenosina como de la PKC. El grupo de Yellon llevó a cabo una serie de estudios en trabéculas de aurícula humana, expuestas a isquemia y reperfusión, y en las que luego se midió la función contractil. (11, 21) Observaron que la activación del receptor de adenosina aumentaba la recuperación posisquémica de la función, al igual que lo hacía el abridor de canal de  $K_{ATP}$ , cromacalima y la estimulación de la PKC con un análogo de diacilglicerol.

A raíz de las limitaciones obvias, ha sido difícil proporcionar evidencia convincente de que el preconditionamiento salva al miocardio isquémico en el corazón humano intacto. Tomai y colaboradores (108) han resumido recientemente algunas de las observaciones clínicas disponibles y concluyeron que el preconditionamiento se había demostrado claramente en seres humanos. Dado que se ha observado preconditionamiento en todo modelo en animales evaluado hasta el momento, ciertamente sería inesperado que el hombre no pudiese ser preconditionado. Pero, a pesar del trabajo optimista de Tomai, debe consignarse que la evidencia disponible no permite concluir que se haya demostrado en forma indudable preconditionamiento en el hombre. La razón puede ser la naturaleza de las herramientas de investigación disponibles para los investigadores clínicos.

Un intento inicial de proporcionar pruebas del preconditionamiento en el ser humano provino de pacientes sometidos a cirugía de revascularización. Yellon y colaboradores (109) comunicaron que períodos breves de pinzamiento antes de inducir la fibrilación ventricular, para la anastomosis coronaria de un *bypass*, daban por resultado una preservación mayor de los niveles de ATP del miocardio que en los corazones no preconditionados, y que se consideraba que esto representaba cardioprotección. Sin



embargo, estos investigadores repitieron el protocolo en otra cohorte de pacientes y no pudieron detectar ninguna evidencia de preservacion de ATP en el miocardio preconditionado. (110) Sin embargo, observaron que la troponina T del suero era algo mas alta en los pacientes no preconditionados despues de la cirugia de revascularizacion y consideraron que esta diferencia era evidencia de cardioproteccion. Otros han observado una liberacion mayor de MB de creatinquinasa despues de una detencion cardioplejica en pacientes que han tenido preconditionamiento que en los controles. (111)

Otra observacion clinica que da apoyo a la notion de que en los seres humanos ocurre el preconditionamiento isquemico proviene de estudios de pacientes que exhiben angina preinfarto. La angina preinfarto reduce el tamaño del infarto miocardico, segun lo miden las curvas de CK, mejora la funcion ventricular, reduce la frecuencia de insuficiencia cardiaca congestiva clinica, reduce las arritmias y la probabilidad de ruptura ventricular. (112-116) Estas investigaciones concluyeron que estos episodios anginosos, y por lo tanto la isquemia supuestamente breve, preconditionaron al corazon para evitar la oclusion coronaria.

Pero varias consideraciones disminuyen el entusiasmo en favor de esta ultima postura. En primer lugar, la presencia de vasos coronarios colaterales se ha considerado con poca frecuencia por la falta de angiograffa de las coronarias. Aun asi, Hirai y colaboradores (117) notaron que las colaterales de las coronarias eran mas frecuentes en los sujetos con angina previa, y que la funcion regional del ventriculo izquierdo era mejor en quienes tenian un desarrollo colateral mayor. Si las colaterales estan, de hecho, mejor desarrolladas en aquellos con anginas preinfarto, entonces podria proporcionarse una rapida explicacion para esta funcion cardiaca mejorada y el mejor pronostico sin necesidad de postular la existencia de otros factores cardioprotectores. En segundo lugar, aquellos individuos con angina preinfarto lisan el trombo que ocluye la arteria coronaria y restablecen el flujo distal mas rapido que los que no han tenido angina. (118) La reperfusion ocurre aproximadamente 21 minutos mas rapido despues de la iniciacion de la infusion del agente trombolitico en aquellos con angina previa. Las razones de esta diferencia son inciertas, pero una reperfusion mas rapida podria resultar en menos infarto, to cual se traducirfa en una evolucion clinica mejor, sin necesidad de un fenomeno preconditionante. Es interesante notar que la mayoria de los estudios en animales han encontrado que el preconditionamiento del periodo isquemico ofrece un grado de proteccion equivalente a un acortamiento del periodo isquemico en aproximadamente 20 minutos. (119) De

este modo, reperfundir un corazon 20 minutos antes serfa tan protector como el preconditionamiento isquemico. Finalmente, al menos un estudio ha demostrado los beneficios clinicos de la angina preinfarto solo en menores de 65 aflos, (120) limitando de esta forma la aplicabilidad general de cualquier mecanismo de proteccion. Aun asi, no queda claro si estos estudios de poblacion han probado ya en forma inequivoca que existe preconditionamiento isquemico en los seres humanos.

*¿El segmento ST es un fndice del estado preconditionado?*

Una de las primeras observaciones que sugirieron que el preconditionamiento podria ocurrir en los seres humanos fue hecha en pacientes sometidos a angioplastia coronaria. En varios trabajos clinicos se noto disminucion del dolor de pecho, amplitud reducida del segmento ST y cantidad reducida de la produccion de lactato durante las ulteriores inflaciones del balon de la angioplastia cuando se comparaba con la primera de ellas (121, 122). Tomai y colaboradores encontraron que la atenuacion del segmento ST durante las inflaciones secuenciales del balon se podia abolir con bloqueantes del receptor de adenosina (123) o del canal de  $K_{ATP}$ . (124) Pero Cribier y colaboradores (122) propusieron que la amplitud disminuida del segmento ST, visible en las posteriores inflaciones del balon, podria reflejar un retardo en la apertura de los vasos colaterales nativos mas que algun efecto de preconditionamiento isquemico. Estas observaciones llevaron a varios estudios con animales para probar si el segmento ST se podria emplear para determinar la presencia de un estado preconditionado. En un corazon de cerdo, carente de vasos colaterales coronarios, el cambio en el patron de corrimiento del segmento ST durante las oclusiones coronarias fue identico al comunicado para el ser humano. (125) Los cerdos fueron sometidos a tres oclusiones coronarias de 5 minutos cada una, separadas por 15 minutos de reperfusion. Durante la segunda y la tercera oclusion, el segmento ST se incremento aproximadamente en la mitad del tiempo que en la primera oclusion. Se vio un patron identico en los conejos. (126) Mas aun, el bloqueo del receptor de adenosina que aborta la proteccion por el preconditionamiento, tambien bloqueaba la escalera descendente de la respuesta del segmento ST durante la segunda y la tercera oclusion coronaria. Además, el preconditionamiento farmacologico del corazon con tiramina abolio esta respuesta escalonada en el segmento ST. La ultima observacion parece logica, dado que el corazon habria estado en estado preconditionado antes de la primera oclusion. Todo lo anterior parece dar apoyo a que el segmento ST es un indicador confiable del estado preconditionado del corazon.

Sin embargo, datos recientes muestran que la amplitud del segmento ST refleja la actividad del  $K_{ATP}$  del sarcolema, que aparentemente es comparable a la actividad del canal mitocondrial, durante el preconditionamiento isquémico. (127) El 5-HD, el antagonista del canal de  $K_{ATP}$  de las mitocondrias, conocido por abortar la protección miocárdica, no pudo bloquear esta respuesta escalonada del segmento ST del corazón de conejo. Mas aun, el HMR 1883, un bloqueante exclusivo de los canales de  $K_{ATP}$  del sarcolema, abolió por completo cualquier cambio en los segmentos ST de la primera a la segunda oclusión en el conejo, pero no pudo bloquear la protección miocárdica del preconditionamiento isquémico. Por lo tanto, la disociación entre el segmento ST y la respuesta histológica del miocardio a las oclusiones coronarias secuenciales sugieren que la primera no podría igualarse con la última. Además, los estudios clínicos que postulan la hipótesis de que los cambios en el flujo de las colaterales coronarias podrían explicar los cambios en el segmento ST evidentes durante las oclusiones coronarias secuenciales (122, 128) complementan las conclusiones previas y generan dudas acerca de lo acertado de aceptar este modelo clínico de cambio de segmento ST durante la angioplastia coronaria como completamente confiable para la identificación de los agentes bloqueantes o emuladores del preconditionamiento.

En resumen, los datos que pretenden demostrar que existe preconditionamiento en el corazón humano intacto no son claros. Los datos existentes son estimulantes, pero difícilmente concluyentes. Se espera que estudios adicionales aclaren el panorama.

#### Precondicionamiento farmacológico

Las investigaciones sobre el mecanismo del preconditionamiento se han asociado con la expectativa de que el preconditionamiento farmacológico se transforme con rapidez en una práctica para su uso en seres humanos. Es bastante sencillo preconditionar al corazón. La administración intracoronaria de cualquiera de los agonistas acoplados al receptor de PKC pondría al corazón en un estado preconditionado durante aproximadamente 1 hora. Se pueden dar agentes  $A_1$  selectivos por adenosina por vía intravenosa, (30) al igual que opioides, (27, 129) agonistas  $A_3$  de adenosina (130) y un cóctel de adenosina/noradrenalina. (131) Sin embargo, la necesidad de administrar todos los agonistas anteriores un tiempo previo al inicio de la isquemia presenta un problema abrumador. En pocas ocasiones es posible el pretratamiento en el contexto de un infarto agudo de miocardio. Existen algunas evidencias de que los inhibidores de la fosfatasa son eficaces cuando se dan precozmente después del inicio de la isquemia. (132, 133) Sin embargo, nunca se ha verificado su eficacia

en un modelo de corazón *in situ*, empleando al infarto como punto final. Los requisitos de pretratamiento han hecho que el preconditionamiento quede limitado a un tratamiento profiláctico contra la isquemia iatrogénica, como ocurre en la cirugía cardíaca. Para los pacientes con un *bypass* corazón/pulmón, sin embargo, ya hay una poderosa protección disponible, con soluciones cardiopléjicas, y desafortunadamente no se logra una protección adicional combinando la cardioplejia con el preconditionamiento. (134) El reciente interés en procedimientos de acceso limitado (135) para la cirugía de *bypass* coronario, en la cual no se emplea una máquina corazón/pulmón, puede ser una aplicación ideal de preconditionamiento farmacológico.

También se ha considerado el tratamiento profiláctico. Los agonistas del receptor no son adecuados para este tipo de tratamiento, dado que inducen tolerancia. Encontramos que la infusión continuada de un agonista  $A_1$  selectivo por adenosina induce tolerancia en el lapso de 3 días, (30) si bien las inyecciones intravenosas reiteradas cada dos días parecen mantener la protección de tipo segunda ventana, menos potente. (136) Un enfoque más efectivo para proteger los corazones humanos por el mecanismo de preconditionamiento clásico consiste en bajar el umbral para el preconditionamiento. Por ejemplo, el agente regulador de la adenosina acadesina promovió la liberación de adenosina durante la isquemia y bajó el umbral para el preconditionamiento (137) del mismo modo que el inhibidor del transporte de adenosina dipiridamol. (138) Puede verse un resultado similar con los inhibidores de la ECA. La ECA no solo cataliza la formación de angiotensina II, sino que es responsable de la degradación de la bradiquinina. Como resultado de la inhibición de la ECA con captopril se redujo el umbral del preconditionamiento a través de un mecanismo dependiente de la bradiquinina. (139) Un inhibidor neutro de la endopeptidasa también es capaz de potenciar la cardioprotección del PC en corazones de conejo *in situ*. (140) Nuevamente, el efecto se relaciona con el aumento de bradiquinina tisular. La esperanza futura es lograr la comprensión del mecanismo definitivo del preconditionamiento isquémico. En ese momento será posible mantener el corazón en estado preconditionado en pacientes de alto riesgo e incluso iniciar su protección después de que ha comenzado la isquemia.

#### CONCLUSION

El preconditionamiento isquémico y farmacológico podría, algún día, proporcionar un enfoque terapéutico que pueda proteger en forma confiable a los corazones isquémicos y salvar al miocardio en las unidades coronarias, los quirofanos e incluso en

las clínicas de pacientes externos. Hasta ahora se han identificado solo unos pocos pasos en la cascada de transducción de la señal. Sin embargo, un buen número de laboratorios de investigación están buscando en forma activa al efector final. El papel de la adenosina y de otros receptores en el preconditionamiento está bien establecido en este momento. La PKC se está aceptando cada vez más como un participante importante de esta protección. El debate actual se centra en los pasos distales a la PKC y en este efector final, que a su vez puede ser el canal de  $K_{ATP}$  mitocondrial. El desafío para el futuro es la identificación de los pasos finales y el desarrollo de un protocolo seguro y factible para su aplicación clínica.

## SUMMARY

### ISCHEMIC PRECONDITIONING: FROM BASIC MECHANISMS TO CLINICAL APPLICATIONS

When the heart is subjected to a transient non-lethal period of ischemia, it quickly adapts itself to become resistant to infarction from a subsequent ischemic insult. This adaptation is called preconditioning (PC). This cardioprotection has been shown to be mediated by stimulation of receptors linked to PKC (adenosine, bradykinin, opioids, etc.) and these receptors protect by activating protein kinase C (PKC). PKC appears to be the first element of a complex kinase cascade that is activated during the prolonged ischemia in the preconditioned heart. Recent studies imply that p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) carries the signal from PKC to the mitochondrial  $K_{ATP}$  channels causing them to open and thus protect the heart. The cardioprotection of PC occurs in all species tested to date, and possibly also man. It is expected that as the mechanism of preconditioning is more thoroughly understood pharmacological preconditioning will become practical for clinical use.

*Key words* Adenosine  $K_{ATP}$  channels - MAPKAPK2 - p38 MAPK - Protein kinase C - Tyrosine kinase

## BIBLIOGRAFIA

- Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE y col. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* 1971; 43: 67-82.
- Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker R Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion: Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989; 80: 1115-1127.
- Reimer KA, Murry CE, Richard VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: Why the confusion and controversy? *J Mot Cell Cardiol* 1989; 21: 1225-1239.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
- Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263: H1107-H1112.
- Armstrong SC, Hoover DB, Delacey MH y col. Translocation of PKC, protein phosphatase inhibition and preconditioning of rabbit cardiomyocytes. *J Mot Cell Cardiol* 1996; 28: 1479-1492.
- Liu GS, Thornton J, Van Kinkle DM y col. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A<sub>1</sub> adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84: 350-356.
- Vahlhaus C, Schulz R, Post 1-1 y col. Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrosine kinase in pigs. *J Mot Cell Cardiol* 1998; 30:197-209.
- Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: Future horizons for myocardial protection? *J Mot Cell Cardiol* 1995; 27: 1023-1034.
- Bolli R, Dawn B, Tang X-L y col. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 325-338.
- Speechly-Dyck ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ Res* 1995; 77: 1030-1035.
- Ikonomidis JS, Shirai T, Weisel RD y col. Preconditioning cultured human pediatric myocytes requires adenosine and protein kinase C. *Am J Physiol* 1997; 272: H1220-H1230.
- Vegh A, Papp JG, Szekeres L y col. The local intracoronary administration of methylene blue prevents the pronounced antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol* 1992; 107:910-911.
- Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: Reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol* 1987; 253: H1470-1-11476.
- Turrens JF, Thornton J, Barnard ML y col. Protection from reperfusion injury by preconditioning hearts does not involve increased antioxidant defenses. *Am J Physiol* 1992; 262:1-1585-1-1589.
- Thornton J, Striplin S, Liu GS y col. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol* 1990; 259: H1822-I-11825.
- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1383-1395.
- Tsuchida A, Miura T, Miki T y col. Role of adenosine receptor activation in myocardial infarct size limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 456-461.
- Tsuchida A, Thompson R, Olsson RA y col. The anti-infarct effect of an adenosine A<sub>1</sub>-selective agonist is diminished after prolonged infusion as is the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in rabbit heart. *J Mot Cell Cardiol* 1994; 26: 303-311.
- Schultz JEJ, Rose E, Yao Z y col. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268: H2157-H2161.
- Schulz R, Rose J, Post H y col. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflügers Arch* 1995; 430: 273-282.
- Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A<sub>1</sub> receptors,  $K_{ATP}$  channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264: H1327-H1336.
- Walker DM, Walker JM, Pugsley WB y col. Preconditioning in isolated superfused human muscle. *J Mot Cell Cardiol* 1995; 27:1349-1357.
- Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Local intracoronary infusions of bradykinin profoundly reduce the severity of is-

- chaemia-induced arrhythmias in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 294-295.
23. Goto M, Liu Y, Yang X-M y col. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77: 611-621.
  24. Mitchell MB, Meng X, Ao L y col. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 1995; 76: 73-81.
  25. Miyawaki H, Ashraf M. Cat as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997; 80: 790-799.
  26. Headrick JP Ischemic preconditioning: Bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1227-1240.
  27. Mili T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 3-12.
  28. Ambrosio G, Tritto I, Chiariello M. The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1035-1039.
  29. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 207-216.
  30. Tsuchida A, Liu Y, Liu GS y col.  $\alpha_1$ -Adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res* 1994a; 75: 576-585.
  31. Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV y col. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 883-892.
  32. Wang P, Gallagher KP, Downey JM y col. Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 579-588.
  33. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266: H1145-H1152.
  34. Armstrong S, Ganote CE. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: Effects of glycolytic blockade, phorbol esters, and ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1700-1706.
  35. Brooks G, Hearse DJ. Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: Player or spectator? *Circ Res* 1996; 79:627-630.
  36. Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ y col. Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? *Circulation* 1995; 92: 1546-1557.
  37. Kitakaze M, Node K, Minamino T y col. Role of activation of protein kinase C in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through activation of ecto-5'-nucleotidase. *Circulation* 1996; 93: 781-791.
  38. Vahlhaus C, Schulz R, Post H y col. No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ Res* 1996; 79: 407-414.
  39. Yang X-M, Sato H, Downey JM y col. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 991-999.
  40. Gray MO, Karlinger JS, Mochly-Rosen D. A selective  $\epsilon$ -protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* 1997; 272: 30945-30951.
  41. Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 661-668.
  42. Thornton JD, Thornton CS, Downey JM. Effect of adenosine receptor blockade: Preventing protective preconditioning depends on time of initiation. *Am J Physiol* 1993; 265: H504-H508.
  43. Ping P, Zhang J, Qiu Y y col. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms  $\epsilon$  and  $\delta$  in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997; 81: 404-414.
  44. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996; 79: 137-146.
  45. Yoshida KI, Kawamura S, Mizukami Y y col. Implication of protein kinase C- $\alpha$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$  isoforms in ischemic preconditioning in perfused rat hearts. *J Biochem* 1997; 122: 506-511.
  46. Kawamura S, Yoshida K-I, Miura T y col. Ischemic preconditioning translocates PKC- $\delta$  and  $\epsilon$ , which mediate functional protection in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1998; 275: H2266-H2271.
  47. Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoform in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997; 99: 55-61.
  48. Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart: Protein kinase C- $\epsilon$  is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ Res* 1993; 72: 757-767.
  49. Albert CJ, Ford DA. Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1999; 276: H642-H650.
  50. Wilson S, Song W, Karoly K y col. Delayed cardioprotection is associated with the sub-cellular relocalisation of ventricular protein kinase C $\epsilon$ , but not p42/44MAPK. *Mol Cell Biochem* 1996; 160/161: 225-230.
  51. Liu GS, Cohen MV, Mochly-Rosen D y col. Protein kinase C- $\delta$  is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999b; 31:1937-1948.
  52. Kitakaze M, Hori M, Morioka T y col.  $\alpha_1$  adrenoceptor activation mediates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through augmentation of 5'-nucleotidase activity. *J Clin Invest* 1994; 93: 2197-2205.
  53. Van Wylen DGL. Effect of ischemic preconditioning on interstitial purine metabolite and lactate accumulation during myocardial ischemia. *Circulation* 1994; 89: 2283-2289.
  54. Silva PH, Dillon D, Van Wylen DGL. Adenosine deaminase inhibition augments interstitial adenosine but does not attenuate myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1995; 29:616-623.
  55. Iliodromitis EK, Mike T, Liu GS y col. The PKC activator PMA preconditions rabbit heart in the presence of adenosine receptor blockade: Is 5'-nucleotidase important? *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2201-2211.
  56. Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G y col. Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263: H887-H894.
  57. Decking UKM, Schlieper G, Kroll K y col. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 1997; 81: 154-164.
  58. Parra tt JR. Protection of the heart by ischemic preconditioning: Mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 19-25.
  59. Kis A, Vegh A, Papp J y col. Pacing-induced delayed protection against arrhythmias is attenuated by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1545-1550.
  60. Yoshida KI, Mizukami Y-1, Kitakaze M. Nitric oxide mediates protein kinase C isoform translocation in rat heart during postischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 230-238.
  61. Liu Y, Sato T, O'Rourke B y col. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: Novel effectors of cardioprotection?

- Circulation 1998; 97: 2463-2469.
62. Patel VC, Yellon DM, Singh KJ y col. Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194: 234-238.
  63. Maulik N, Watanabe M, Zu YL y col. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett* 1996; 396: 233-237.
  64. Baines CP, Wang L, Cohen MV y col. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J Mot Cell Cardiol* 1998; 30: 382-392.
  65. Seger R, Biener Y, Feinstein R y col. Differential activation of mitogen-activated protein kinase and S6 kinase signaling pathways by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and insulin: Evidence for involvement of a TPA-stimulated protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1995; 270:28325-28330.
  66. Tano M, Tsuchida A, Hasegawa T y col. Both protein kinase C (PKC) and tyrosine kinase contribute to cardioprotection by repetitive preconditioning in rats. *J Mot Cell Cardiol* 1998; 30: A312 (abstract).
  67. Fryer RM, Schultz JEJ, Hsu AK y col. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1999; 276: H1229-H1235.
  68. Sandhu R, Diaz RJ, Mao GD y col. Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia. *Circulation* 1997; 96: 984-995.
  69. Miura T, Kawamura S, Goto M y col. Effect of protein kinase C inhibitors on cardioprotection by ischemic preconditioning depends on the number of preconditioning episodes. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 700-709.
  70. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS y col. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-7426.
  71. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:180-186.
  72. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 1998; 83: 345-352.
  73. Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV y col. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mot Cell Cardiol* 1997; 29: 2383-2391.
  74. Sugden PH, Bogoyevith MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 478-492.
  75. Rouse J, Cohen P, Trigon S y col. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78: 1027-1037.
  76. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F y col. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp27. *Cell* 1994; 78:1039-1049.
  77. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G y col. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Science* 1997; 110:357-368.
  78. Kim SO, Salh B, Pelech SL y col. Activation of MAPKAP kinase-2 by adenosine in rat heart. *J NIH Res* 1997; 9 (1):54.
  79. Haq SEA, Clerk A, Sugden PH. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by adenosine in the perfused rat heart. *FEBS Lett* 1998; 434: 305-308.
  80. Nakano A, Kim SO, Pelech SL y col. Activation of MAPKAPK2 is involved in preconditioned rabbit heart. *J Mot Cell Cardiol* 1999; 31: A43 (abstract).
  81. Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: A role in cardiac myocyte-hypertrophy. *J Cell Biol* 1998; 142: 523-535.
  82. Nagao M, Yamauchi J, Kaziro Y y col. Involvement of protein kinase C and Src family tyrosine in G<sub>βγ</sub>-induced activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 22892-22898.
  83. Ping P, Cao X, Kong D y col. PKC<sub>ε</sub> isoform induces activation of the p42/p44 MAPKs and the p46/p54 JNKs in adult rabbit cardiac myocytes. *J Mot Cell Cardiol* 1998a; 30: A263 (abstract).
  84. Ping P, Zhang J, Cao X y col. Activation of the p38 MAPK and the p46/p54 JNKs after brief episodes of ischemia/reperfusion in the heart of conscious rabbit. *J Mot Cell Cardiol* 1998b; 30: A263 (abstract).
  85. Maulik N, Yoshida T, Zu Y-L y col. Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: A potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol* 1998b; 275: H1857-H1864.
  86. Cuenda A, Rouse J, Doza YN y col. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995; 364: 229-233.
  87. Armstrong SC, Delacey M, Ganote CE. Phosphorylation state of hsp27 and p38 MAPK during preconditioning and protein phosphatase inhibitor protection of rabbit cardiomyocytes. *J Mot Cell Cardiol* 1999; 31: 555-567.
  88. Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mot Cell Cardiol* 1998; 30:1651-1664.
  89. Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem* 1999; 274: 6272-6279.
  90. Barancik M, Htun P, Maeno Y y col. Differential regulation of distinct protein kinase cascades by ischemia and ischemia/reperfusion in porcine myocardium. *Circulation* 1997; 96 (Suppl I): 1-252 (abstract).
  91. Htun P, Barancik M, Maeno Y y col. Stimulation of stress activated protein kinases by anisomycin protects ischemic myocardium. *Circulation* 1997; 96 (Suppl I):1-252 (abstract).
  92. Maulik N, Yoshida T, Das DK. p38 MAP kinase and not MEK1 kinase is involved in ischemic preconditioning. *J Mot Cell Cardiol* 1998a; 30: A264 (abstract).
  93. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992; 70: 223-233.
  94. Trapp S, Ashcroft FM. A metabolic sensor in action: News from the ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel. *News Physiol Sci* 1997; 12: 255-263.
  95. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 1992; 26:1054-1062.
  96. Toombs CF, Moore TL, Shebuski RJ. Limitation of infarct size in the rabbit by ischaemic preconditioning is reversible with glibenclamide. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 617-622.
  97. Walsh RS, Tsuchida A, Daly JJF y col. Ketamine-xylazine anaesthesia permits a K<sub>ATP</sub> channel antagonist to attenuate preconditioning in rabbit myocardium. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1337-1341.
  98. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Hess T y col. Glyburide-reversible cardioprotective effect of BMS-180448 is independent of action potential shortening. *Cardiovasc Res* 1995a; 30: 731-738.
  99. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS y col. Cardioprotection with the K<sub>ATP</sub> opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995b; 26: 145-152.
  100. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Dzwonczyk S y col. Preconditioning is not abolished by the delayed rectifier K<sup>+</sup> blocker dofetilide. *Am J Physiol* 1996; 271: H1207-H1214.
  101. McCullough JR, Normandin DE, Condor ML y col. Specific

- block of anti-ischemic actions of cromakalim by sodium 5-hydroxydecanoate. *Circ Res* 1991; 69: 949-958.
102. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V y col. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997; 81: 1072-1082.
  103. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M y col. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1999; 276: H1361-I 11368.
  104. Gdgelin H, Hartung J, Englert HC y col. HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part I: Effects on cardiomyocytes, coronary flow and pancreatic  $\Pi$ -cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:1453-1464.
  105. Pain TS, Cohen MV, Downey JM. The mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel may be a trigger rather than the end-effector of preconditioning's anti-infarct effect. *Circulation* 1999; 100 (Suppl I): 1-342 (abstract).
  106. Wang Y, Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel-mediated protection against Ca<sup>2+</sup> overload injury in rat myocardium. *Circ Res* 1999; 84:1156-1165.
  107. Diaz RJ, Losito VA, Mao GD y col. Chloride channel inhibition blocks the protection of ischemic preconditioning and hypo-osmotic stress in rabbit ventricular myocardium. *Circ Res* 1999; 84: 763-775.
  108. Tomai F, Crea F, Chiariello L y col. Ischemic preconditioning in humans: Models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* 1999;100: 559-563.
  109. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 342: 276-277.
  110. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM y col. Ischaemic preconditioning reduce troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997; 77: 314-318.
  111. Perrault LP, Menasche P, But A y col. Ischemic preconditioning in cardiac surgery: A word of caution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 1378-1386.
  112. Hirai T, Fujita M, Yamanishi K y col. Significance of preinfarction angina for preservation of left ventricular function in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1992; 124: 19-24.
  113. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K y col. The TIMI 4 Investigators. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4: A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995; 91: 37-45.
  114. Nakagawa Y, Ito H, Kitakaze M y col. Effect of angina pectoris on myocardial protection in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction: Retrospective clinical evidence of "preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1076-1083.
  115. Ottani F, Galvani M, Ferrini D y col. Prodromal angina limits infarct size: A role for ischemic preconditioning. *Circulation* 1995; 91: 291-297.
  116. Kloner RA, Shook T, Antman EM y col. and the TIMI-9B Investigators. Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome: An ancillary study in TIMI-9B. *Circulation* 1998; 97:1042-1045.
  117. Hirai T, Fujita M, Yoshida N y col. Importance of ischemic preconditioning and collateral circulation for left ventricular functional recovery in patients with successful intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction- *Am Heart J* 1993; 126: 827-831.
  118. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR y col. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *New Engl J Med* 1996; 334: 7-12.
  119. Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: State of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res* 1993; 27:542-550.
  120. Ahete I, Ferrara N, Cacciatori F y col. Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: A loss of preconditioning mechanism in the aging heart? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 947-954.
  121. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG y col. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty: Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990; 82: 2044-2051.
  122. Cribier A, Korsatz L, Koning R y col. Improved myocardial ischemic response and enhanced collateral circulation with long repetitive coronary occlusion during angioplasty: A prospective study. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 578-586.
  123. Tomai F, Crea F, Gaspardone A y col. Effects of A<sub>2</sub> adenosine receptor blockade by bamiphylline on ischaemic preconditioning during coronary angioplasty. *Eur Heart J* 1996; 17: 846-853.
  124. Tomai F, Crea F, Gaspardone A y col. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker. *Circulation* 1994; 90: 700-705.
  125. Shattock MJ, Lawson CS, Hearse DJ y col. Electrophysiological characteristics of repetitive ischemic preconditioning in the pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1339-1347.
  126. Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. Attenuation of S-T segment elevation during repetitive coronary occlusions truly reflects the protection of ischemic preconditioning and is not an epiphenomenon. *Basic Res Cardiol* 1997b; 92: 426-434.
  127. Birincioglu M, Yang X-M, Critz SD y col. S-T segment voltage during sequential coronary occlusions is an unreliable marker of preconditioning. *Am J Physiol* 1999; 277: H2435-112441.
  128. Billinger M, Fleisch M, Eberli FR y col. Is the development of myocardial tolerance to repeated ischemia in humans due to preconditioning or to collateral recruitment? *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 1027-1035.
  129. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* 1996; 78:1100-1104.
  130. Auchampach JA, Rizvi A, Qiu Y y col. Selective activation of A<sub>3</sub> adenosine receptors with N<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl) adenosine -5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ Res* 1997; 80: 800-809.
  131. Cohen MV, Thornton JD, Thornton CS y col. Intravenous co-infusion of adenosine and norepinephrine preconditions the heart without adverse hemodynamic effects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997a; 114: 236-242.
  132. Weinbrenner C, Baines CF, Liu CS y col. Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 1998a; 98: 899-905.
  133. Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM y col. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res* 1998b; 38: 676-684.
  134. Kolocassides KG, Galizanes M, Hearse DJ. Ischemic preconditioning, cardioplegia or both? Differing approaches to myocardial and vascular protection. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 623-634.
  135. Cooley DA. Limited access myocardial revascularization: A preliminary report. *Tex Heart Inst* 1996; 23: 81-84.
  136. Dana A, Baxter GF, Walker JM y col. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: Repetitive adenosine A<sub>2</sub> receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1142-1149.
  137. Tsuchida A, Liu CS, Mullane K y col. Adenosine lowers temporal threshold for the myocardial infarct size limiting effect of preconditioning. *Cardiovasc Res* 1993; 27:116-120.
  138. Miura T, Ogawa T, Iwamoto T y col. Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning. *Circulation* 1992; 86: 979-985.

139. Miki T, Miura T, Ura N y col. Captopril potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through bradykinin B<sub>2</sub> receptor activation. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1616-1622.
140. Nakano A, Miura T, Ura N y col. Inhibition of neutral endopeptidase 24.11 lowers the threshold of preconditioning by augmenting bradykinin B<sub>2</sub> receptor activation. *Circulation* 1998; 98 (Suppl 1): 1-486 (abstract).