

# El poscondicionamiento isquémico reduce el tamaño del infarto por activación de los receptores de adenosina en animales normales e hipercolesterolémicos



VERÓNICA D'ANNUNZIO<sup>1,†</sup>, CRISTINA LORENZO CARRIÓN<sup>1</sup>, JIMENA MEDEL<sup>1</sup>, MIRZA RIVERO<sup>1</sup>, GABRIEL DEL POZZI<sup>1</sup>, GABRIELA BERG<sup>2</sup>, MARTÍN DONATO<sup>MTSAC, 1</sup>, LAURA SCHREIER<sup>2</sup>, REGINA WIKINSKI<sup>2</sup>, RICARDO J. GELPI<sup>MTSAC, 1, 3</sup>

Recibido: 26/04/2006  
Aceptado: 15/05/2006

**Dirección para separatas:**  
Verónica D'Annunzio  
Instituto de Fisiopatología  
Cardiovascular, Facultad  
de Medicina, Universidad  
de Buenos Aires  
J. E. Uriburu 950 - Piso 2  
(1114) Buenos Aires, Argentina  
Tel. 4508-3606  
e-mail: infica@fmed.uba.ar

## RESUMEN

El poscondicionamiento isquémico (Poscon) reduce el tamaño del infarto en animales normales. Sin embargo, el efecto de este mecanismo de protección en animales hipercolesterolémicos se desconoce. El objetivo del presente estudio fue determinar si el Poscon reduce el tamaño del infarto en animales hipercolesterolémicos. Un segundo objetivo fue evaluar si los receptores  $A_1$  participan en el mecanismo de protección del Poscon. Se perfundieron corazones aislados e isovolúmicos de conejos normales e hipercolesterolémicos según técnica de Langendorff y se sometieron a 30 min de isquemia global y 30 min de reperusión (grupo 1 [G1]). En el grupo 2 (G2) se provocaron dos episodios de reperusión/isquemia (30 seg cada uno, Poscon) luego de 30 min de isquemia. En el grupo 3 (G3) se repitió el protocolo del G2, pero se administró un bloqueante  $A_1$  (DPCPX, 200 nM). En los grupos 4, 5 y 6 (G4, G5 y G6), constituidos por animales que fueron alimentados con una dieta rica en colesterol (1%) durante 4 semanas, se repitieron todos estos protocolos experimentales. Se midieron la presión desarrollada del VI (PDVI), la presión diastólica final del VI (PDFVI) y el tamaño del infarto utilizando TTC. El tamaño del infarto en el G1 y el G4 fue del  $15,7\% \pm 1,5\%$  y del  $24,4\% \pm 3,1\%$ , respectivamente. El Poscon redujo el área de infarto hasta alcanzar el  $5,5\% \pm 0,9\%$  en animales normales y el  $5,6\% \pm 1,6\%$  en los hipercolesterolémicos ( $p < 0,05$  versus G1 y G4). La administración de DPCPX abolió el efecto protector del Poscon en ambos grupos de animales (G3:  $15,1 \pm 1,7$  y G6:  $21,2 \pm 1,9$ ). El Poscon reduce el tamaño del infarto en animales normales e hipercolesterolémicos a través de la activación de los receptores  $A_1$ .

REV ARGENT CARDIOL 2006;74:224-228.

**Palabras clave** > Infarto de miocardio - Poscondicionamiento isquémico - Hipercolesterolemia

**Abreviaturas** >

DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina	PDVI	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
PDFVI	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo	Poscon	Poscondicionamiento isquémico

## INTRODUCCIÓN

El poscondicionamiento isquémico (Poscon) es un fenómeno de protección endógena, por el cual ciclos breves de reperusión/isquemia aplicados luego de un evento isquémico prolongado reducen el tamaño del infarto. (1) Este "nuevo" mecanismo de protección fue demostrado en perros, ratas y conejos. (1-3) Sin embargo, su mecanismo intracelular no se conoce por completo. Algunos autores demostraron que existe una atenuación de la producción de radicales libres durante la reperusión (1, 2) y la activación de señales intracelulares, a nivel del miocito, algunas de las cuales son similares a las descriptas para el precon-

dicionamiento isquémico. (3, 4) En este sentido, Tsang y colaboradores (4) describieron que se produce la fosforilación de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), de la Akt y de la óxido nítrico sintetasa en corazones sometidos a un protocolo de poscondicionamiento isquémico. Sin embargo, todos estos estudios (1-4) fueron realizados en modelos en animales normales y, al menos en nuestro conocimiento, existe sólo un trabajo que evaluó el efecto del poscondicionamiento isquémico en animales hipercolesterolémicos. (5) No obstante, en este estudio se consideró un estadio avanzado del proceso de aterosclerosis.

La evaluación de los mecanismos de protección miocárdica en modelos en animales con niveles de

<sup>MTSAC</sup> Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

<sup>†</sup> Para optar a Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

<sup>1</sup> Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup> Investigador Independiente Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

colesterol elevados en sangre es importante por dos motivos: en primer lugar, la hipercolesterolemia es un factor de riesgo que está presente en el 30-40% de los pacientes con enfermedad coronaria y, en segundo lugar, se ha demostrado, en modelos en animales, (6, 7) que la hipercolesterolemia *per se* puede incrementar el tamaño del infarto.

El objetivo del presente estudio fue determinar si el poscondicionamiento isquémico reduce el tamaño del infarto en corazones de animales hipercolesterolémicos. Un segundo objetivo fue evaluar si en el mecanismo de protección participan los receptores  $A_1$  de adenosina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos Neozelandeses machos (1,8-2,0 kg), los cuales fueron asignados en forma aleatoria a dos tipos de dietas: 28 animales fueron alimentados con dieta estándar y otros 19 recibieron una dieta enriquecida con colesterol (1% colesterol) por 4 semanas. Luego de finalizada la dieta, los animales se sacrificaron, se extrajo el corazón y se colocó en un sistema de perfusión para órgano aislado, según la técnica de Langendorff. El corazón se perfundió con solución de Krebs-Henseleit compuesta de NaCl 118,5 mM, KCl 4,7 mM,  $\text{NaHCO}_3$  24,8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{Mg SO}_4$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM y glucosa 10 mM, que se mantuvo a temperatura constante (37° C) y equilibrada con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ , para obtener un pH de  $7,45 \pm 0,02$ .

En el ventrículo izquierdo se colocó un balón de látex conectado a través de un tubo rígido de polietileno a un transductor de presión Deltram II (Utah Medical System); esto permite medir la presión intraventricular (PVI). El balón de látex se llenó con solución acuosa hasta lograr una presión diastólica final (PDFVI) de 8-12 mm Hg y este volumen se mantuvo constante durante todo el experimento. Se evaluaron los cambios en la PDFVI como un índice de rigidez miocárdica. En este sentido, si se considera que la rigidez ventricular se expresa a través de la relación  $dp/dV$ , en un modelo de corazón isovolumico, la PDFVI es índice de rigidez ventricular. También se evaluó el estado contráctil a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la cual se calculó restando la PDFVI a la presión ventricular sistólica pico. El flujo coronario y la frecuencia cardíaca se mantuvieron constantes durante todo el experimento mediante una bomba de perfusión y un marcapasos, respectivamente.

**Medición del tamaño del infarto:** al finalizar la evaluación de la función ventricular, los corazones se perfundieron durante 2 horas y posteriormente se congelaron. Luego se cortaron de punta a base y se incubaron en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (1%). Las áreas de infarto se midieron por planimetría computarizada (analizador de imágenes Image Pro Plus®, versión 4.5). El tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área del ventrículo izquierdo.

**Análisis bioquímico:** se obtuvieron muestras sanguíneas antes del inicio de la dieta y después de finalizada. Se midieron las concentraciones de colesterol total, LDL colesterol y HDL colesterol por método enzimático colorimétrico comercial (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) en un autoanalizador Hitachi 917. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo para colesterol fueron 1,1% y 2,2%, respectivamente. El HDL y el LDL colesterol se determinaron por precipitación selectiva. (8, 9)

### Protocolos experimentales en animales normales:

Grupo 1 (n = 9): en corazones de animales normales se provocó una isquemia global de 30 minutos seguido de un período de reperfusión de 30 minutos.

Grupo 2 (n = 10): en corazones de animales normales se aplicó un protocolo de poscondicionamiento isquémico, que consistió en dos ciclos de 30 segundos de reperfusión/isquemia inmediatamente después de 30 minutos de isquemia global.

Grupo 3 (n = 9): se repitió el protocolo de G2, pero durante los ciclos de reperfusión/isquemia se administró un bloqueante de los receptores  $A_1$  (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina, DPCPX; 200 nM).

Los protocolos experimentales de los grupos 1, 2 y 3 se repitieron en animales alimentados con una dieta enriquecida con colesterol al 1% durante 4 semanas: grupo 4 (n = 7), grupo 5 (n = 6) y grupo 6 (n = 6), respectivamente.

**Análisis estadístico:** los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (EE) y los datos se analizaron por análisis de la varianza seguido por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de 0,05.

## RESULTADOS

En los animales alimentados con una dieta enriquecida con colesterol se observó un incremento significativo de los niveles de colesterol total desde  $61,6 \pm 9,3$  mg/dl antes de comenzar la dieta hasta  $284,4 \pm 45,4$  mg/dl a las 4 semanas ( $p < 0,05$ ). El LDL colesterol aumentó desde  $21,5 \pm 2,3$  mg/dl hasta  $158,5 \pm 37,2$  mg/dl ( $p < 0,05$ ). Por último, el HDL colesterol no se modificó en forma significativa.

En la Tabla 1 se detallan los valores de presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y de presión diastólica final (PDFVI), en situación basal y durante diferentes tiempos de la reperfusión. En todos los grupos, la PDVI disminuyó durante la reperfusión, pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. La PDFVI (rigidez miocárdica) se incrementó durante la reperfusión en todos los grupos, pero sin que se observaran diferencias significativas entre ellos.

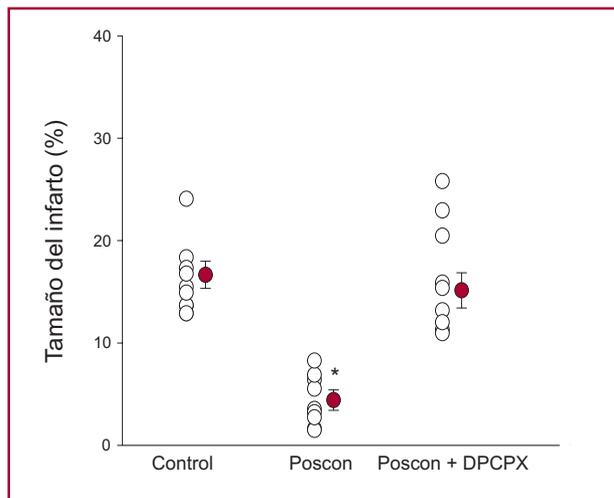
En la Figura 1 se representa el tamaño del infarto en los diferentes grupos de animales normocolesterolémicos. El tamaño del infarto producto de 30 minutos de isquemia global fue del  $15,7\% \pm 1,5\%$  (G1). Tras la aplicación del protocolo de poscondicionamiento isquémico (G2), el área de infarto se redujo hasta alcanzar un valor de  $5,5\% \pm 0,9\%$ . En el grupo 3, cuando se administró el DPCPX (bloqueante del receptor  $A_1$ ), éste abolió el efecto protector del poscondicionamiento isquémico, incrementando el tamaño del infarto hasta un valor de  $15,1\% \pm 1,7\%$  ( $p < 0,05$  *versus* Poscon).

En la Figura 2 se muestra el comportamiento del tamaño del infarto en el grupo de animales hipercolesterolémicos. El tamaño del infarto en el grupo control (G4) fue de  $24,4\% \pm 3,1\%$  ( $p < 0,05$  *versus* normales G1). A pesar de que el área de infarto fue significativamente mayor en comparación con el grupo control de los animales normales, el poscondicionamiento isquémico (G5) redujo el tamaño del infarto,

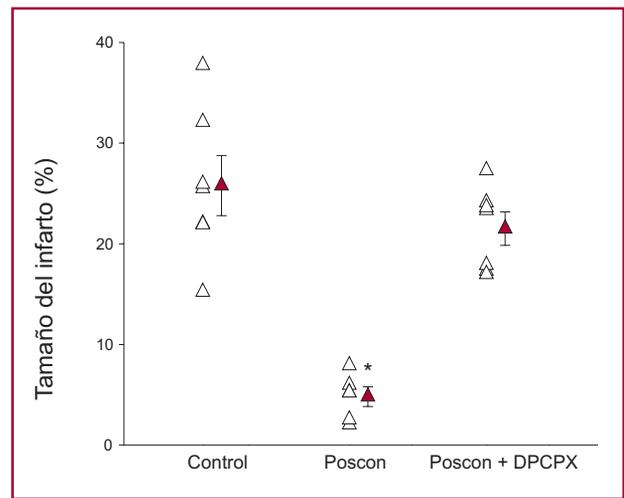
**Tabla 1.** Valores relativos (%) de presión desarrollada del ventrículo izquierdo y presión diastólica final en situación basal y durante la reperfusión

		Basal	10 min R	20 min R	30 min R
Control N (n = 9)	PDVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	30,1 ± 4,1	37,8 ± 4,8	45,1 ± 4,5
	PDFVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	578,7 ± 56,2	533,3 ± 46,8	503,7 ± 48,5
Poscon N (n = 10)	PDVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	32,4 ± 5,1	41,6 ± 5,8	41,5 ± 5,6
	PDFVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	687,7 ± 86,5	699,9 ± 91,2	666,9 ± 90,5
DPCPX N (n = 9)	PDVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	27,8 ± 5,9	35,6 ± 6,2	43,1 ± 7,3
	PDFVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	635,1 ± 75,5	612,4 ± 62,2	630,9 ± 74,9
Control H (n = 7)	PDVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	26,9 ± 4,1	37,8 ± 4,7	44,6 ± 5,5
	PDFVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	636,6 ± 73,7	574,2 ± 61,3	580,2 ± 72,4
Poscon H (n = 6)	PDVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	26,6 ± 9,5	39,1 ± 10,1	41,4 ± 10,3
	PDFVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	682,3 ± 178,4	674,8 ± 152,1	572,8 ± 8,8
DPCPX H (n = 6)	PDVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	12,8 ± 3,3	23,1 ± 4,1	28,8 ± 3,5
	PDFVI (mm Hg)	100,0 ± 0,0	611,5 ± 194,2	610,6 ± 66,8	653,6 ± 68,8

PDVI: Presión desarrollada del ventrículo izquierdo. PDFVI: Presión diastólica final del VI. R: Reperfusión. N: Normocolesterolémicos. H: Hipercolesterolémicos. Poscon: Poscondicionamiento isquémico. DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina. Media ± EEM.



**Fig. 1.** Tamaño del infarto (expresado en porcentaje del área del VI) en el grupo de animales normales sometidos a poscondicionamiento isquémico (grupo 2). El mencionado efecto protector quedó abolido tras la administración del bloqueante de los receptores A<sub>1</sub> (grupo 3). O: Experimentos individuales. ●: Media ± error estándar. \*: p < 0,05 versus control.



**Fig. 2.** Tamaño del infarto (expresado en porcentaje del área del VI) en el grupo de animales hipercolesterolémicos (grupo 4). El poscondicionamiento isquémico redujo el tamaño del infarto, mientras que la administración del bloqueante de los receptores A<sub>1</sub> abolió el mencionado efecto protector. Δ: Experimentos individuales. ▲: Media ± error estándar. \*: p < 0,05 versus control.

que alcanzó un valor del 5,6% ± 1,6% (p < 0,05 versus control hipercolesterolémico). En el G6 se observa la abolición del efecto protector del Poscon tras la administración del bloqueante de los receptores A<sub>1</sub> (21,2% ± 1,9%, p < 0,05 versus Poscon).

**DISCUSIÓN**

En el presente estudio se demuestra que, en animales hipercolesterolémicos, el poscondicionamiento

isquémico disminuye significativamente el tamaño del infarto hasta un porcentaje similar al alcanzado en corazones normales. Este efecto protector es mediado por la activación de los receptores A<sub>1</sub>, tanto en animales normocolesterolémicos como hipercolesterolémicos. Es importante mencionar que a pesar de que el tamaño del infarto en los animales hipercolesterolémicos fue mayor con respecto a los normales, el poscondicionamiento redujo el área de infarto hasta alcanzar valores similares. Por lo tanto, el porcentaje

de reducción del tamaño del infarto es mayor en los corazones de animales hipercolesterolémicos en comparación con los normales.

El efecto beneficioso del poscondicionamiento isquémico sobre el tamaño del infarto fue demostrado por varios autores, (1-4) algunos de los cuales describieron parte de su mecanismo. Si bien los trabajos realizados en animales normales permitieron incrementar el conocimiento acerca de este importante fenómeno, debemos reconocer que no son representativos del 30-40% de los pacientes con cardiopatía isquémica que presentan diferentes grados de hipercolesterolemia. Al menos en nuestro conocimiento, existe un solo trabajo que evaluó el efecto del poscondicionamiento en animales hipercolesterolémicos. (5) En este estudio, Iliodromitis y colaboradores (5) demostraron, en un modelo de aterosclerosis e hipercolesterolemia en conejos, que el poscondicionamiento no reduce el tamaño del infarto, probablemente debido a la presencia de lesiones ateroscleróticas. A diferencia de nuestro trabajo, estos autores utilizaron una dieta compuesta por colesterol y aceite de maíz; por lo tanto, los animales presentan aterosclerosis avanzada, con alteraciones histopatológicas en las arterias coronarias. En nuestro modelo experimental detectamos un incremento significativo de los niveles de colesterol LDL, sin cambios en la concentración de HDL. Además, en nuestro modelo existe una vasoconstricción en respuesta a la administración de acetilcolina (datos no mostrados), que pone en evidencia cierto grado de disfunción endotelial. Por otro lado, sólo hemos encontrado depósitos de lípidos a nivel de la subíntima de la arteria aorta, mientras que no se observaron alteraciones histológicas en las arterias coronarias. Por lo tanto, estos hallazgos representan un estadio inicial del proceso de aterosclerosis, el cual no es comparable con el modelo utilizado por Iliodromitis y colaboradores; (5) éste podría ser uno de los motivos por los cuales encontramos protección en los protocolos de poscondicionamiento en animales hipercolesterolémicos, mientras que estos autores describen que el efecto protector se pierde.

En segundo lugar, hemos presentado evidencia experimental que demuestra la participación de los receptores  $A_1$  en el mecanismo del poscondicionamiento isquémico. En relación con esto, Yang y colaboradores (10) demostraron que los receptores de adenosina participan en el mecanismo del poscondicionamiento isquémico. Nuestro estudio extiende estos hallazgos al demostrar que el subtipo de receptor involucrado es el  $A_1$ , ya que al administrar un bloqueante selectivo de estos receptores se produce la abolición del efecto protector en corazones de conejos hipercolesterolémicos.

Recientemente, Philipp y colaboradores (11) mostraron, en un modelo en conejos sometidos a isquemia/reperfusión, que el poscondicionamiento isquémico puede activar los receptores  $A_{2A}$  pero no los  $A_1$ . Estos autores, al igual que nosotros, utilizaron DPCPX con el ob-

jeto de estudiar la participación de los receptores  $A_1$ . Sin embargo, Kilpatrick y colaboradores (12) demostraron que el DPCPX también podría bloquear los receptores  $A_3$ . Por lo tanto, no podemos descartar una posible participación de estos receptores en el mecanismo de protección del poscondicionamiento isquémico.

De esta manera, en la rata, los receptores  $A_{2A}$  podrían ejercer su efecto protector por inhibición de la respuesta inflamatoria, mientras que en los conejos la protección estaría mediada por los receptores  $A_1$  y probablemente los  $A_3$ .

## CONCLUSIONES

En conclusión, períodos breves de reperfusión/isquemia luego de una isquemia prolongada (poscondicionamiento isquémico) disminuyen significativamente el tamaño del infarto en animales normales e hipercolesterolémicos. Dado que el tamaño del infarto es mayor en los animales hipercolesterolémicos, el porcentaje de reducción del área infartada fue mayor que el alcanzado en los animales normales. Este efecto protector es mediado por la activación de los receptores de adenosina  $A_1$  o  $A_3$ .

Este mecanismo fisiológico de protección tiene una potencial aplicación en el ámbito clínico, particularmente en aquellos pacientes sometidos a angioplastia primaria. En este sentido, Staat y colaboradores (13) evaluaron en forma prospectiva el efecto del poscondicionamiento isquémico en pacientes sometidos a angioplastia primaria. Estos autores mostraron que el poscondicionamiento reduce el área bajo la curva de CPK e incrementa el grado Blush, respecto de los pacientes sometidos al procedimiento convencional. Si bien estos datos están influidos por muchas variables imposibles, los resultados son importantes. En consecuencia, se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo intracelular del poscondicionamiento isquémico, dada su potencial aplicación clínica.

## SUMMARY

### Ischemic Postconditioning Reduces Infarct by Activating Adenosine Receptors in Animals with Normal and High Cholesterol Levels

Ischemic postconditioning (Postcon) reduces infarct size in normal animals. However, since the effect of Postcon in hypercholesterolemic animals is unknown, our objective was to determine whether Postcon reduces infarct size in hypercholesterolemic animals. The second objective was to assess if  $A_1$  receptors are involved in protective Postcon mechanisms. Isolated isovolumic hearts of normal and hypercholesterolemic rabbits were perfused according to Langendorff's technique and subjected to 30 minutes of global ischemia and 30 min of reperfusion (G1). During G2, Postcon was elicited (two 30 second-cycles of reperfusion/ischemia) after 30 min of ischemia. During G3, we repeated G2, but an  $A_1$  receptor blocker (DPCPX, 200 nM) was administered. During G4, G5 and G6, all these experimental

protocols were repeated in animals fed with a cholesterol-rich diet (1%) for 4 weeks.

The following parameters were measured: pressure developed in the left ventricle (LVP), end-diastolic LV pressure (LVEDP), and infarct size assessed by triphenyl tetrazolium (TTC). The infarct size was  $15.7 \pm 1.5\%$  in G1 and  $24.4 \pm 3.1\%$  in G4. Postcon reduced the infarct area to  $5.5 \pm 0.9\%$  in normal animals and to  $5.6 \pm 1.6\%$  in hypercholesterolemic animals ( $p < 0.05$  vs. G1 and G4). When DPCPX was administered, the protective effect of Postcon was abolished in both groups of animals (G3,  $15.1 \pm 1.7$  and G6,  $21.2 \pm 1.9$ ). Hence, Postcon reduces infarct size in normal and hypercholesterolemic animals, through the activation of A<sub>1</sub> receptors.

**Key words >** Myocardial infarction - Ischemic postconditioning - Hypercholesterolemia

## BIBLIOGRAFÍA

1. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
2. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74-85.
3. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1103-10.
4. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004;95:230-2.
5. Iliodromitis EK, Zoga A, Vrettou A, Andreadou I, Paraskevidis IA, Kaklamanis L, et al. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis* 2006 (in press).
6. Tilton RG, Cole PA, Zions JD, Daugherty A, Larson KB, Sutera SP, et al. Increased ischemia / reperfusion injury to the heart associated with short-term, diet-induced hypercholesterolemia in rabbits. *Circ Res* 1987;60:551-9.
7. Golino P, Maroko PR, Carew TE. Efficacy of platelet depletion in counteracting the detrimental effect of acute hypercholesterolemia on infarct size and the no-reflow phenomenon in rabbits undergoing coronary artery occlusion-reperfusion. *Circulation* 1987;76:173-80.
8. Assmann G, Jabs HU, Kohnert U, Nolte W, Schriewer H. LDL-cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. *Clin Chim Acta* 1984;140:77-83.
9. Assman G, Schriewer H, Schmitz G, Hagele EO. Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid-MgCl<sub>2</sub>. *Clin Chem* 1983;29:2026-30.
10. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* 2005;100:57-63.
11. Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A(2b) receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006 (in press).
12. Kilpatrick EL, Narayan P, Mentzer RM Jr, Lasley RD. Adenosine A3 agonist cardioprotection in isolated rat and rabbit hearts is blocked by the A1 antagonist DPCPX. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H847-53.
13. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143-8.