

La activación de la proteincinasa C durante la reperfusión atenúa la rigidez diastólica de la disfunción ventricular postisquémica

VERÓNICA D'ANNUNZIO, MELINA SABÁN, MARTÍN DONATO[†]

RESUMEN

Evidencias experimentales sugieren que la activación intracelular de la proteincinasa C (CPK) antes de la isquemia media el fenómeno de protección en el preconditionamiento isquémico. Sin embargo, su participación durante la reperfusión es controversial. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la estimulación de la CPK durante la reperfusión protege el miocardio de la disfunción ventricular postisquémica. Se utilizaron corazones aislados e isovolúmicos de conejo. Se realizaron dos protocolos experimentales: en el grupo 1 (G1, n = 8) los corazones fueron sometidos a 15 minutos de isquemia global seguida por 30 minutos de reperfusión, en el grupo 2 (G2, n = 8) se repitió el protocolo de G1, pero se administró un agonista selectivo de la CPK (PMA, 0,2 nM) desde el inicio de la reperfusión. Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, mm Hg) y la presión diastólica final (PDFVI, mm Hg) (rigidez diastólica). No se observaron diferencias significativas en la PDVI entre el G1 y el G2 (NS). La PDFVI fue de $39,0 \pm 3,2$ mm Hg en el G1 mientras que en el G2 fue de $20,9 \pm 2,6$ ($p < 0,05$ versus G1) a los 30 minutos de la reperfusión. El tamaño del infarto en el G1 fue del $2,7 \pm 0,8\%$ y en el G2 del $5,0 \pm 1,4\%$ (NS).

Estos datos sugieren que la activación de la CPK durante la reperfusión atenúa el aumento de la rigidez diastólica sin modificar la alteración del estado contráctil. Esta protección no involucra modificaciones en el tamaño del infarto.

REV ARGENT CARDIOL 2003;71: 265-269

Recibido: 12/2002

Aceptado: 6/2003

Dirección para separatas: Martín Donato - Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires - Uriburu 950 - Piso 2 (C1114AAD), Buenos Aires - Argentina - Tel/Fax: (54) (11) 4962-4945 - e-mail: mdonato@fmed.uba.ar

Palabras clave

> Isquemia - Disfunción postisquémica - Proteincinasa C

INTRODUCCIÓN

El preconditionamiento isquémico es un fenómeno que fue descrito en 1986 por Murry y colaboradores. (1) Estos investigadores observaron que el tamaño del infarto resultante de una isquemia prolongada (40 minutos), provocada mediante la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior en perros, podía reducirse si el corazón se sometía a cuatro episodios breves de 5 minutos de isquemia seguidos por 5 minutos de reperfusión previos a la isquemia prolongada. Este fenómeno tiene gran trascendencia, ya que es conocido que en diferentes situaciones clínico-quirúrgicas (cirugía de revascularización, angioplastia, tratamiento con trombolíticos) el corazón se ve sometido a episodios de isquemia-reperfusión.

En 1991, Liu y colaboradores (2) demostraron que la adenosina participa en el preconditionamiento a través de la activación de los receptores A_1 . Trabajos posteriores describieron con detalle el mecanismo intracelular responsable del preconditionamiento isquémico. Así, en la actualidad conocemos que este fenómeno de protección involucra la activación y la

translocación hacia el sarcolema de la proteincinasa C (CPK), (3) la activación de una serie de MAPquinasas (4) y por último la apertura de canales de K^+ ATP dependientes, probablemente mitocondriales. (5)

En los últimos años se ha hecho hincapié en el estudio de la acción de la proteincinasa C, como paso clave en el mecanismo de preconditionamiento. Así, Ytrehus y colaboradores (6) han demostrado que la inhibición específica de la CPK con staurosporina bloquea el desarrollo del preconditionamiento. Por el contrario, la estimulación de la CPK con ésteres de forbol o diacilglicerol (DAG) puede mimetizar la protección brindada por el preconditionamiento. (7)

Si bien los efectos del preconditionamiento isquémico sobre el tamaño de infarto son indiscutidos, su efecto sobre el atontamiento cardíaco es controversial. Además, el preconditionamiento es una intervención fisiológica que debe realizarse antes del período de isquemia, por lo que sería más relevante, considerando una posible aplicación terapéutica, lograr la protección del corazón del daño por isquemia y reperfusión mediante alguna intervención durante la reperfusión.

Ya se mencionó que la CPK es uno de los pasos clave en el mecanismo de preconditionamiento isquémico. Sin embargo, su participación durante la reperfusión no se ha estudiado en forma extensa. En nuestro conocimiento, un solo trabajo (8) ha demostrado que la inhibición de la CPK durante la reperfusión altera la función diastólica en corazones aislados de conejo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la activación de la CPK durante la reperfusión protege el miocardio de las alteraciones sistólicas y diastólicas de la disfunción ventricular postisquémica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos con un peso de 1,8 a 2 kg, que se anestesiaron con una mezcla de ketamina (75 mg/kg) y xylazina (0,75 mg/kg) y luego se sacrificaron con tiopental sódico (35 mg/kg). Inmediatamente después del sacrificio se abrió el tórax y se identificó y aisló la arteria aorta, para luego colocar y ligar con hilo de lino una cánula en la mencionada arteria. Una vez realizada la exéresis del corazón, éste se colocó en un sistema de perfusión según la técnica modificada de Langendorff. Se perfundió con solución de Krebs Henseleit, compuesta de la siguiente manera: NaCl 118,5 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 24,8 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl 2,5 mM y glucosa 10 mM; esta solución se mantuvo a temperatura constante de 37°C y se equilibró con una mezcla de 95% de O₂ - 5% de CO₂, para oxigenarla y mantener su pH dentro del rango fisiológico. Se suturaron a la aurícula derecha dos electrodos para estimular el corazón y así poder mantener una frecuencia cardíaca constante en 175 lat/min.

Posteriormente, en el ventrículo izquierdo se colocó un balón de látex atado a uno de los extremos de un tubo rígido de polietileno, que se pasó por el anillo mitral a través de un ojal practicado en la orejuela izquierda. El otro extremo del tubo se conectó a un transductor de presión Deltram II (Utah Medical System), el cual permitió medir la presión en el interior del ventrículo izquierdo. El globo de látex se llenó con solución acuosa hasta lograr una presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) de 8-12 mm Hg; este volumen se mantuvo constante durante todo el experimento. Considerando que la rigidez ventricular diastólica se expresa a través de la relación dP/dV, entonces, en el corazón isovolumico la presión diastólica final es índice de rigidez ventricular.

El flujo coronario controlado con una bomba peristáltica se reguló para conseguir una presión de perfusión coronaria (PPC) de aproximadamente 74,2 ± 1,8 mm Hg. Debido a que la resistencia vascular está definida por la relación entre la presión y el flujo, en un corazón perfundido a flujo coronario constante la presión de perfusión coronaria indica la resistencia vascular coronaria.

La presión intraventricular izquierda (PVI) y la PPC se registraron en una computadora PC 486 con plaqueta conversora analógica-digital que da registros en tiempo real. Se calculó la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), que se obtiene con la resta de la PDFVI a la presión ventricular sistólica pico.

Medición del tamaño de infarto

Finalizada la evaluación de la función ventricular, los corazones se cortaron en secciones de 2 mm de espesor desde la punta hasta la base. Se incubaron en una solución al 1% de cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio, a pH 7,8 y a 37°C durante 10 minutos. Con esta técnica el tejido viable se tiñe de

ABREVIATURAS

CPK	Proteincinasa C
DAG	Diacilglicerol
EE	Error estándar
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
PDFVI	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
PDVI	Presión diastólica del ventrículo izquierdo
PPC	Presión de perfusión coronaria
PVI	Presión intraventricular izquierda

color rojo, mientras que la zona no teñida corresponde al área de infarto. Luego, las secciones se calcaron en hojas de acetato. El área de la pared ventricular y las áreas infartadas se midieron utilizando planimetría computarizada (anализador de imágenes: Image Pro Plus®, versión 3.0) el tamaño del infarto se expresa como porcentaje del área del ventrículo izquierdo.

Protocolo experimental (Figura 1)

Se realizaron dos protocolos experimentales:

Grupo 1 (n = 8): para producir una disfunción ventricular postisquémica sistólica y diastólica ("miocardio atontado") se realizó un ciclo de 15 minutos de isquemia seguidos por 30 minutos de reperfusión. Se utilizaron isquemia global, la cual se produjo mediante la disminución brusca del flujo coronario total aportado por la bomba de perfusión.

Grupo 2 (n = 8): se repitió el protocolo del G1, pero se administró un agonista selectivo de la CPK, forbol 12 miristato 13 acetato (PMA, 0,2 nM) desde el inicio de la reperfusión.

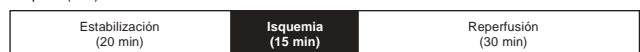
Análisis de datos

Los resultados se expresan como la media ± error estándar (EE). Los datos se analizaron por análisis de 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 la Figura 2 puede observarse el comportamiento de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) en los dos grupos estudiados. En el grupo control, la PDVI presenta un valor preisquémico de 102,8 ± 2,8 mm Hg y alcanzó un valor de 57,5 ± 2,2 mm Hg a los 30 minutos de reperfusión. En el grupo al que se le administró el agonista selectivo de la CPK (PMA) el comportamiento de la presión fue similar al del grupo control, presentó un valor de 83,3 ± 5,4 previo a la isquemia y alcanzó un valor de 56,2 ± 6,2 mm Hg a los 30 minutos de la reperfusión (NS).

Grupo 1 (n=8) Miocardio atontado



Grupo 2 (n=8) Miocardio atontado + PMA postisquemia (0,2 nM)

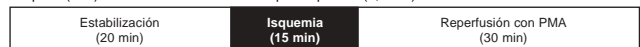


Fig. 1. Esquema de los protocolos experimentales utilizados en el presente estudio.

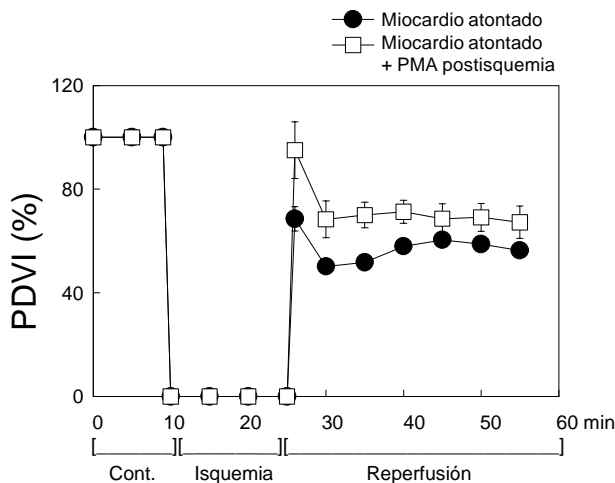


Fig. 2. Representación de los cambios en la PDVI, expresados en porcentaje, en los dos grupos estudiados. No se observan diferencias significativas durante todo el período de reperusión.

En la Figura 3 puede observarse el comportamiento de la presión diastólica final en los dos grupos estudiados. Esta variable aumentó desde un valor de $8,5 \pm 0,7$ mm Hg previo a la isquemia, hasta alcanzar un valor de $39,0 \pm 3,2$ mm Hg a los 30 minutos de la reperusión. Con la administración del agonista selectivo de la CPK (PMA), desde el comienzo de la reperusión, la presión diastólica aumentó desde $9,9 \pm 6,2$ mm Hg en situación basal hasta alcanzar un valor de $20,9 \pm 2,6$ mm Hg, valor éste diferente significativamente con respecto al grupo control ($p < 0,05$), lo cual demuestra una atenuación de la rigidez diastólica con la administración del PMA.

En la Figura 4 se observa el tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área del ventrículo izquierdo, en los dos grupos estudiados. No existieron diferencias significativas entre el grupo control, donde 15 minutos de isquemia global provocaron el $2,7 \pm$

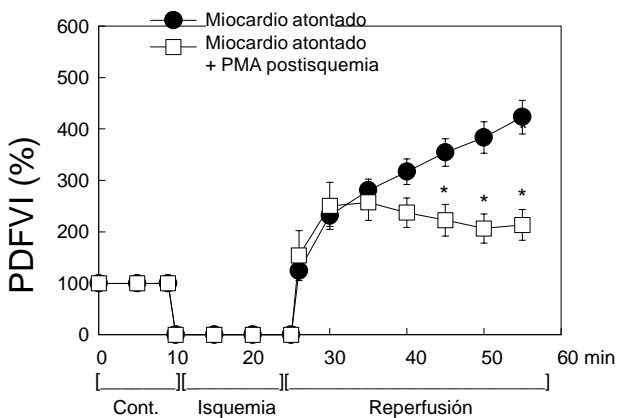


Fig. 3. Representación de los cambios en la PDFVI, expresados en porcentaje, en los dos grupos estudiados. La administración de PMA durante la reperusión atenuó significativamente el aumento de la rigidez miocárdica (*: $p < 0,05$).

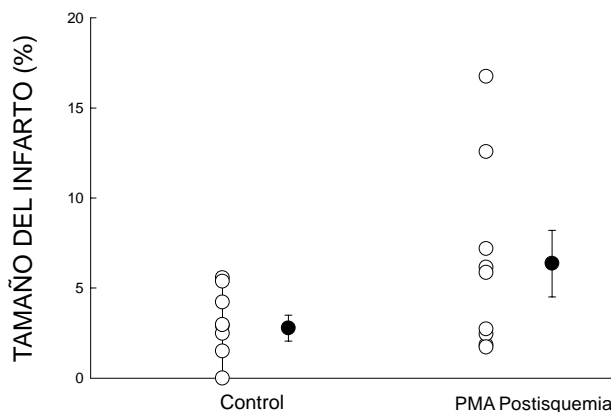


Fig. 4. Representación del tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área del ventrículo izquierdo, en los dos grupos estudiados. Los círculos blancos representan los experimentos individuales, mientras que los círculos negros representan la media aritmética. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

$0,8\%$ de infarto, mientras que en el grupo tratado con PMA el infarto alcanzó el $5,0 \pm 1,4\%$.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos mostrado que la administración de un agonista de la CPK desde el inicio de la reperusión en un modelo de corazón aislado sometido a isquemia global protege el miocardio del aumento de la rigidez diastólica sin modificar en forma significativa las alteraciones sistólicas presentes en la disfunción postisquémica. Este efecto protector no involucró modificaciones significativas en el tamaño del infarto.

El mecanismo de activación de la CPK se ha establecido bien para el preconditionamiento isquémico e involucra la activación de un receptor de membrana (A_1) y la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato. (9) Por otro lado, la activación de la CPK produce la translocación de esta enzima desde el citosol hacia el sarcolema y la fosforilación por parte de la misma de un efector final que sería el responsable de la aparición de protección, particularmente en el preconditionamiento isquémico existe fuerte evidencia experimental que involucra a los canales de K^+ de la mitocondria. (10)

Por otro lado, no se ha estudiado en detalle si es posible activar la CPK durante la reperusión y si esta intervención puede tener efectos protectores. Stamm y colaboradores (8) en su estudio con corazones aislados de conejo demostraron que la supresión de la actividad de la CPK durante la reperusión empeora las alteraciones sistólicas y diastólicas características del atontamiento cardíaco. Esto se asoció con niveles elevados de Ca^{++} libre intracelular y disminución de la velocidad de recaptación de este ion por parte del retículo sarcoplasmático. Sin embargo, el estudio de Stamm y colaboradores (8) tiene la limitación de ha-

ber utilizado un inhibidor de la CPK, por lo que no se puede descartar que este compuesto haya bloqueado otras vías intracelulares además de la CPK. Nosotros utilizamos un agonista selectivo de la CPK en una dosis suficiente como para activar la enzima (11) y analizamos en detalle la función ventricular sistólica y diastólica. Así, los hallazgos del presente estudio demuestran que la activación de la CPK durante la reperfusión produce una atenuación del aumento de la rigidez diastólica, sin modificar significativamente el tamaño del infarto. Al analizar en detalle las modificaciones en el tamaño del infarto, se observa que en el grupo tratado con PMA existe una tendencia a presentar mayor tamaño de infarto. De todas maneras, la diferencia entre grupos no resultó estadísticamente significativa y además está de acuerdo con trabajos previos (8, 13) que no encontraron modificaciones en el tamaño del infarto luego de 15 minutos de isquemia global.

Si bien nuestro protocolo experimental no fue diseñado para estudiar los mecanismos intracelulares involucrados en la protección miocárdica, nuestros datos permiten realizar algunas especulaciones.

Como ya mencionamos, el preconditionamiento isquémico involucra una serie de acontecimientos intracelulares que se inician con la activación del receptor A_1 y que tienen como uno de sus efectores finales a los canales de K^+_{ATP} sensibles de la mitocondria; la fosforilación y apertura de estos canales provocaría la aparición del efecto protector. Un paso clave para la aparición del preconditionamiento isquémico es la activación de la CPK.

Trabajos realizados *in vitro* han demostrado que la activación de la CPK durante la isquemia disminuye la entrada de Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} tipo L y aumenta la recaptación de este ion por parte del retículo sarcoplasmático al fosforilar la fosfolamban; de esta manera disminuiría la sobrecarga de Ca^{++} durante la reperfusión. Sin embargo, la posibilidad de lograr protección activando este complejo mecanismo de protección durante la reperfusión no se ha mencionado hasta el momento en ningún trabajo. Los datos de trabajos previos (13, 14) y los del presente involucran una serie de pasos intracelulares (activación del receptor A_1 , apertura de canales de K^+ y activación de la CPK) que avalarían que parte de este mecanismo puede ser activado durante la reperfusión.

En resumen, en un modelo experimental con estricto control de variables e isquemia global hemos mostrado que la administración de un agonista de la CPK durante la reperfusión protege el miocardio del aumento de la rigidez diastólica pero no de las alteraciones sistólicas. Esta protección no se involucra con modificaciones en el tamaño de infarto. Si bien la extrapolación de datos obtenidos en animales de experimentación a pacientes debe realizarse con extrema cautela, el hecho de que la administración de este compuesto posterior al período de isquemia ten-

ga un efecto protector podría representar una interesante propuesta terapéutica.

SUMMARY

Protein kinase C activation during reperfusion decreases the diastolic stiffness seen in post-ischemic ventricular dysfunction

Experimental evidence suggests that pre-ischemic intracellular activation of protein kinase C (PKC) achieves a protective function in ischemic preconditioning. However, the role of PKC during reperfusion remains controversial. Our aim was to assess whether PKC stimulation during reperfusion would protect the myocardium from post-ischemic dysfunction. We experimentally grouped isolated and isovolumic rabbit hearts by means of 2 different protocols. In the first group (G1, n = 8) hearts were exposed to 15 minutes of global ischemia followed by 30 minutes of reperfusion. The second protocol (G2, n = 8) was similar to G1 but for the administration of a selective PKC agonist (PMA, 0.2 nM) during the reperfusion phase. Left ventricular developed pressure (LVDP, mm Hg) and end diastolic pressure (LVEDP, mm Hg) (diastolic stiffness) were measured. We found no difference in LVDP between both groups. LVEDP was 39.0 ± 3.2 mm Hg in G1 and 20.9 ± 2.6 in G2 ($p < 0.05$) after 30 minutes of reperfusion. The infarction size was $2.7 \pm 0.8\%$ in G1 and $5.0 \pm 1.4\%$ in G2 (NS). These findings suggest that PKC stimulation during reperfusion attenuates the increased post-ischemic diastolic stiffness of the ventricle although abnormal contractility and infarction size remain unchanged.

Keywords: ischemia - post-ischemic dysfunction - protein kinase C

BIBLIOGRAFÍA

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A_1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991;84:350-6.
- Downey J, Cohen M, Ytrehus K, et al. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: The role of adenosine and protein kinase C. En: Das DK, editor. Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury. New York, USA: Annals of the New York Academy of Sciences; 1994. p. 82-98.
- Baines CP, Cohen MV, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: The role of kinases and mitochondrial K^+_{ATP} channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10:741-54.
- Grover GJ, Garlid KD. ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:677-95.
- Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit hearts by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266:H1145-52.
- Liang BT. Protein kinase C-mediated preconditioning of cardiac myocytes: role of adenosine receptor and K^+_{ATP} channel. *Am J Physiol* 1997;273:H847-53.
- Stamm C, Friehs I, Cowan DB, Cao-Danh H, Noria S, Munakata M, et al. Post-ischemic CPK inhibition impairs myocardial calcium handling and increase contractile protein calcium sensitivity. *Cardiovasc Res* 2001;51:108-21.

9. 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;26:661-8
10. Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol* 1994;267:H1341-52.
11. Kitakaze M, Node K, Asanuma H, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, et al. Protein tyrosine kinase is not involved in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning in canine hearts. *Circ Res* 2000;87:303-8.
12. Donato M, Morales C, Bagnarelli A, Scapín O, Gelpi RJ. Exogenous adenosine and postischemic dysfunction in isolated rabbit heart. *Medicina (Buenos Aires)* 1999;59:339-47.
13. Donato M, Morales C, D'Annunzio V, Scapín O, Gelpi RJ. The activation of A1 adenosine receptor attenuates myocardial stunning in rabbit. *Medicina (Buenos Aires)* 2001;61:424-30.

PÁGINA WEB DE LA SOCIEDAD

Visite la página web de la Sociedad Argentina de Cardiología www.sac.org.ar

Información Institucional. Congresos. Actividades Científicas. Consejos y Distritos Regionales. Actualizaciones. Cursos a distancia. Revista Argentina de Cardiología (formato .pdf)

La SAC emite quincenalmente un boletín de novedades por correo electrónico, con resúmenes y comentarios bibliográficos y noticias institucionales.

En esta edición:

- **WOMEN'S HEALTH INITIATIVE:** Resultados finales. El tratamiento combinado de reemplazo hormonal no reduce el riesgo coronario en mujeres sanas.
- Los niveles de proteína C reactiva se correlacionan con el riesgo de enfermedad coronaria calculado mediante el score de Framingham aportando información suplementaria.
- Subestudio del GUSTO-IV: el pro-BNP amino-terminal fue el más potente predictor independiente de mortalidad al año.
- ¿Son iguales todos los betabloqueantes en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca? Resultados del estudio COMET.

Para recibir este servicio Ud. puede actualizar su dirección de e-mail enviando un mensaje al Área de Recursos Instruccionales ari@sac.org.ar

El reglamento de la Revista Argentina de Cardiología está disponible en www.sac.org.ar