

Papel de los receptores A₁ de adenosina en el efecto protector del preconditionamiento isquémico remoto

Role of A₁ adenosine receptors on remote ischemic preconditioning

DIAMELA T. PAEZ¹, ELIANA P. BIN¹, VERÓNICA CASANOVA², ELIANA CICALÉ², RICARDO J. GELPI^{1*}, MARTÍN DONATO^{1**}

RESUMEN

Introducción: Es conocido que la adenosina está involucrada en el mecanismo de preconditionamiento isquémico clásico, actuando a través de los receptores A₁ y A₃.

Objetivo: El objetivo de nuestro estudio fue evaluar si el preconditionamiento isquémico remoto (rIPC) activa los receptores de adenosina A₁ antes de la isquemia o en la reperfusión y, de ese modo, reduce el tamaño del infarto de miocardio. Corazones aislados de rata fueron sometidos a 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión (I/R). En otro grupo de ratas, se realizó un protocolo de rIPC. El tamaño del infarto se midió con trifetil de tetrazolio.

Resultados: El rIPC disminuyó significativamente el tamaño del infarto. Este efecto fue abolido cuando se administró DPCPX (bloqueante del receptor A₁) o L-NAME (inhibidor de la síntesis de óxido nítrico) durante la reperfusión.

Conclusión: Empleando un modelo de corazón aislado de rata demostramos que el rIPC reduce el tamaño del infarto de miocardio mediante la activación del receptor A₁ de adenosina al inicio de la reperfusión miocárdica. Este efecto protector también estaría mediado por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa durante la reperfusión.

Palabras claves: Infarto de miocardio - Preconditionamiento isquémico miocárdico/métodos - Receptor de adenosina A₁ - Receptor de adenosina A₃

ABSTRACT

Background: Adenosine is involved in classic preconditioning acting especially through adenosine A₁ and A₃ receptors.

Objective: The objective of our study was to evaluate whether remote ischemic preconditioning (rIPC) activates the A₁ adenosine receptors before ischemia or at reperfusion in order to reduced myocardial infarct size.

Methods: Isolated rat hearts were subjected to 30 min of ischemia and 60 min of reperfusion (I/R). In a second group, a rIPC protocol (3 cycles of hindlimb ischemia/reperfusion) was performed.

Results: The infarct size was measured with tetrazolium staining. rIPC significantly decreased the infarct size. This effect was abolished when DPCPX (A₁ receptor blocker) and L-NAME (NO synthesis inhibitor) were administered during the reperfusion.

Conclusion: We demonstrated in the isolated rat heart that rIPC reduces myocardial infarction by activation of A₁ adenosine receptor at reperfusion. Interestingly, rIPC appears to reduce infarct size increasing eNOS activity during myocardial reperfusion.

Key words: Myocardial Infarction - Ischemic Preconditioning, Myocardial/methods - Receptor, Adenosine A₁ - Receptor, Adenosine A₃

Abreviaturas

rIPC	preconditionamiento isquémico remoto	L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
I/R	isquemia/reperfusión	ON	óxido nítrico
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina	ONS	óxido nítrico sintasa

INTRODUCCIÓN

El preconditionamiento isquémico remoto (rIPC) es un fenómeno cardioprotector mediante el cual breves episodios de isquemia/reperfusión de un órgano o tejido confieren al corazón resistencia a un episodio isquémico posterior y prolongado. (1)

El fenómeno rIPC ha sido ampliamente estudiado en los últimos 25 años. Sin embargo, ciertos aspectos de su mecanismo siguen siendo desconocidos. Algunos autores han demostrado que la transferencia de la señal

cardioprotectora desde el órgano periférico al órgano diana involucra factores humorales, (2) vías neuronales, (3,4) o una interacción neurohumoral. (1). En un estudio previo, hemos demostrado que el rIPC activa señales de protección cardíacas antes de la isquemia miocárdica. (5) Sin embargo, en ese estudio no se evaluaron los cambios celulares o moleculares que ocurren durante la reperfusión miocárdica.

La adenosina podría activar el mecanismo del rIPC en tejidos alejados al corazón. (6,7,8) No obstante, se desconoce si el rIPC aumenta la concentración de

REV ARGENT CARDIOL 2018;86:86-89. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v86.i2.12901>

Recibido: 18/02/2017 - Aceptado: 14/03/2018

Dirección para separatas: Martín Donato; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. J. E. Uriburu 950, 2^{do} piso, Buenos Aires, Argentina, C1114AAD; Tel/Fax. 54-11-4962-4945; E-mail: mdonato@fmed.uba.ar

¹Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

² Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

*Miembros del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

adenosina local en el tejido/órgano remoto y estimula la vía neurogénica, (9) o si participa directamente en el corazón. Diferentes autores han corroborado la participación de la adenosina antes de la isquemia miocárdica (9,10), pero aún no se ha estudiado el papel de este nucleósido durante la reperfusión miocárdica en corazones sometidos a rIPC.

Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de los receptores de adenosina (A_1) sobre los efectos cardioprotectores del rIPC, considerando su activación antes de la isquemia miocárdica o al inicio de la reperfusión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Sprague Dawley (300-350 g). Los procedimientos utilizados en estos estudios fueron aprobados por el Comité de Investigación y Cuidado Animal de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo #2948/10), en acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el National Institute of Health (NIH) de los EE.UU.

Procedimiento quirúrgico

Las ratas fueron anestesiadas con uretano (1,5 g/kg) e intubadas para ventilarlas con una mezcla de aire ambiental y oxígeno, utilizando un respirador Harvard (Modelo 683). A continuación, los animales fueron asignados de manera aleatoria a los diferentes grupos experimentales (Figura 1). Luego se procedió a diseccionar y exponer la arteria femoral izquierda con el fin de realizar sobre ella el protocolo de rIPC. Tras completar los protocolos *in vivo* (ver más adelante), los animales fueron eutanasiados con una sobredosis de uretano. Se extrajo el corazón, que fue montado por la raíz de la aorta en un sistema de perfusión para órgano aislado, según la técnica de Langendorff, allí se los dejó estabilizar durante 20 minutos.

Grupos experimentales (Figura 1)

1. I/R (n = 8): Las ratas se anestesiaron y la arteria femoral izquierda fue diseccionada y expuesta. Luego de 30 minutos de monitoreo, los corazones fueron extraídos y perfundidos según la técnica de Langendorff. Después de 15 minutos de estabilización, se realizó una isquemia global de 30 minutos, seguida de 60 minutos de reperfusión.

2. rIPC (n = 8): después de que las ratas fueron anestesiadas y la arteria femoral izquierda diseccionada y expuesta,

los animales se preconditionaron mediante un protocolo de isquemia (5 min) y reperfusión (5 min) por oclusión de la arteria femoral izquierda. Posteriormente, los corazones se sometieron al mismo protocolo utilizado en el grupo I/R para inducir infarto de miocardio.

3. rIPC + DPCPX (n = 6): 5 minutos antes de proceder al protocolo de rIPC se administró 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX, 100 μ g/kg IP), un bloqueante selectivo de los receptores A_1 de adenosina. El infarto de miocardio se indujo usando el protocolo mencionado anteriormente.

4. rIPC + DPCPX (R) (n = 6): se utilizó el mismo protocolo que en el grupo rIPC, pero al comienzo de la reperfusión se administró 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX, 1 μ M); el fármaco se infundió durante los primeros 10 min de reperfusión.

5. rIPC + L-NAME (R) (n = 7): se utilizó el mismo protocolo del grupo rIPC, pero al comienzo de la reperfusión miocárdica se administró un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (NG-nitro-L-arginina metil éster; L-NAME, 100 mmol/l); el fármaco se infundió durante los primeros 10 min de reperfusión.

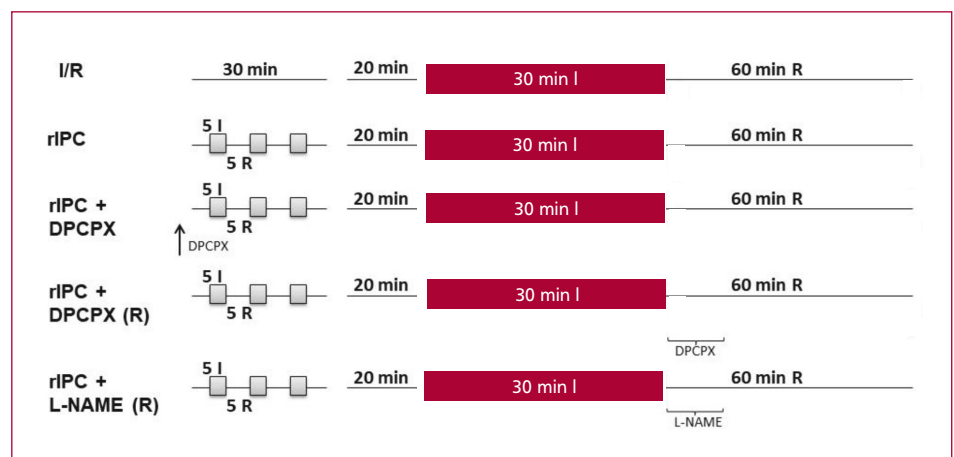
Tamaño del infarto

Después de 60 min de reperfusión en el sistema de Langendorff, los corazones se congelaron y se cortaron en cortes transversales de 2 mm de espesor desde el ápice hasta la base. Las secciones se incubaron durante 20 minutos en cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (pH 7,4; 37 ° C) y luego se sumergieron en formol al 10%. Al aplicar esta técnica, los sectores de miocardio viables se tiñen de rojo, mientras que las áreas de infarto permanecen sin teñir. Finalmente, se escanearon las secciones y se midieron las áreas viables e infartadas (Image Pro Plus, versión 4.5). El tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área ventricular izquierda.

RESULTADOS

La figura 2 muestra el tamaño del infarto inducido por 30 min de isquemia global seguido de 60 min de reperfusión. En el grupo I/R, el tamaño del infarto fue $44,6 \pm 2,2\%$, mientras que el rIPC lo disminuyó a $35,6 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$ vs. grupo I/R), lo que muestra la significativa cardioprotección del rIPC. La administración de DPCPX antes del protocolo de rIPC no influyó en los efectos de esta estrategia cardioprotectora sobre el tamaño de infarto. Sin embargo, al bloquear el recep-

Fig. 1. Esquema representativo de los protocolos experimentales. I: Isquemia; R: reperfusión. rIPC: preconditionamiento isquémico remoto; DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina; L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster; (R): fármacos aplicados al inicio de la reperfusión.



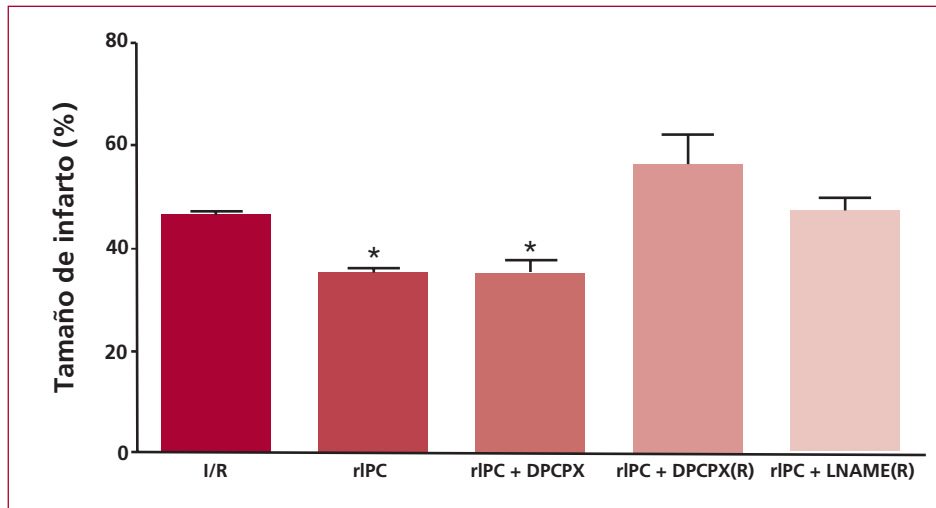


Fig. 2. Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área del ventrículo izquierdo. El rIPC redujo significativamente el tamaño del infarto y este efecto fue abolido por la administración de DPCPX y L-NAME al inicio de la reperfusión. I/R: isquemia/reperfusión; rIPC: preconditionamiento isquémico remoto; DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina; L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster; (R): fármacos aplicados al inicio de la reperfusión. *: $p < 0,05$ vs. I / R.

tor A_1 de adenosina al comienzo de la reperfusión, se eliminó por completo el efecto beneficioso del rIPC, lo que dio como resultado un tamaño de infarto de $46,4 \pm 3,3\%$ ($p < 0,05$ frente al grupo rIPC).

La administración de L-NAME al inicio de la reperfusión abolió completamente el efecto del rIPC; el tamaño del infarto fue de $46,4 \pm 2,8\%$ en este caso. Se demostró de esta manera la participación del óxido nítrico en el mecanismo del rIPC.

DISCUSIÓN

En este estudio investigamos el papel del receptor de adenosina en el mecanismo del rIPC considerando su activación antes de la isquemia miocárdica o en el momento de la reperfusión. Además, hemos demostrado que la activación de los receptores A_1 en la reperfusión temprana se asocia con la síntesis de óxido nítrico (ON), ya que la administración de L-NAME abolió el efecto beneficioso del rIPC.

Pell y cols. demostraron que un solo ciclo de preconditionamiento renal redujo el infarto de miocardio en un modelo de conejo *in vivo*. Estos efectos cardioprotectores fueron abolidos en presencia de 8-(p-sulfofenil)-teofilina (8-SPT), un bloqueante no selectivo de los receptores de adenosina, lo que sugiere la participación de estos en el mecanismo de preconditionamiento agudo de miocardio. (9) Takaoka y cols. también describieron que el rIPC renal reduce significativamente el tamaño del infarto y mejora el metabolismo energético del miocardio en corazones de conejo sometidos a I/R, a través de la activación de los receptores de adenosina. (10) Dong y cols. mostraron que el rIPC induce efectos protectores contra el daño por I/R y esto fue abolido después de la resección del nervio femoral y la administración de DPCPX, lo que sugiere la participación de la adenosina en el tejido remoto y la activación de la vía neural del preconditionamiento. (7) Sin embargo, ninguno de esos estudios evaluó la participación de los receptores de

adenosina antes de la isquemia miocárdica y al comienzo de la reperfusión. En esta investigación mostramos la importancia de la activación del receptor A_1 , solo durante la reperfusión, para lograr la cardioprotección.

El ON puede modular la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) en mitocondrias aisladas. (11) El mPTP es un canal no específico que induce la despolarización de la membrana interna mitocondrial, conduce al agotamiento del ATP y mejora la presión osmótica coloidal en la matriz mitocondrial, esto lleva a su hinchazón y a la ruptura de la membrana externa mitocondrial. (12) La concentración fisiológica de ON puede inhibir el mPTP por mecanismos relacionados con la S-nitrosilación. (11) Varios estudios han demostrado que la producción de ON puede proteger al corazón contra la lesión de I/R. (13) En el presente estudio observamos que la cardioprotección del rIPC fue abolida por el L-NAME, ello sugiere que el ON participa en el mecanismo de rIPC.

En resumen, mediante esta investigación demostramos que en el corazón aislado de rata, el preconditionamiento isquémico remoto limita el infarto de miocardio mediante la activación de los receptores A_1 de adenosina durante la reperfusión temprana. Los resultados de nuestro trabajo también ponen en evidencia la participación de la enzima NOS en el mecanismo del rIPC. Se requieren más estudios que investiguen las vías de transducción de señal miocárdica subyacentes al rIPC para explicar el efector final que lleva a la protección luego de la activación del receptor A_1 .

BIBLIOGRAFÍA

1. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008;79:377-86. <http://doi.org/cn8g>
2. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysenbergh A, et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* 1999;277:H2451-7. <http://doi.org/cn8g>
3. Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, Gilbey MP, Spyer KM, Tes-

- chemacher AG, et al. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal preganglionic neurones. *Cardiovasc Res* 2012;95:487-94. <http://doi.org/f243pj>
4. Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Inserte J, García-Dorado D, et al. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 2013;98:425-34. <http://doi.org/bcxv>
 5. Donato M, Goyeneche MA, Garces M, Marchini T, Pérez V, Del Mauro J, et al. Myocardial triggers involved in activation of remote ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 2016;101:708-16. <http://doi.org/f8s8tx>
 6. Ding YF, Zhang MM, He RR. Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao* 2001;53:7-12.
 7. Dong JH, Liu YX, Ji ES, He RR. [Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats]. *Sheng Li Xue Bao* 2004;56:41-6.
 8. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, Kazim S, Duncker DJ. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H29-37. <http://doi.org/cn8j>
 9. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*. 1998;275:H1542-7. <http://doi.org/cn8k>
 10. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1999;33:556-64. <http://doi.org/bpxbzb>
 11. Balakirev MYu, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem*. 1997;246:710-8. <http://doi.org/bxpqhp>
 12. Ohtani H, Katoh H, Tanaka T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, et al. Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes. *Nitric Oxide*. 2012;26:95-101. <http://doi.org/fzmrbh>
 13. Strasen J, Ritter O. Role of nNOS in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med* 2011;21:58-63. <http://doi.org/cn8m>