



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio del mecanismo del preconditionamiento del miocardio inducido por ejercicio en el perro. Participación del canal de potasio mitocondrial sensible a ATP, lón calcio y NADPH oxidasa

Víctor Manuel Parra Morales

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**ESTUDIO DEL MECANISMO DEL PRECONDICIONAMIENTO DEL
MIOCARDIO INDUCIDO POR EJERCICIO EN EL PERRO.
PARTICIPACIÓN DEL CANAL DE POTASIO MITOCONDRIAL
SENSIBLE A ATP, IÓN CALCIO Y NADPH OXIDASA.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina e Investigación Traslacional por la
Universitat de Barcelona.

Investigación realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de
Medicina, Universidad de Chile.

VÍCTOR MANUEL PARRA MORALES

Dr. José Luis Pomar.
Director de Tesis.

Profesor de Cirugía, Consultor Senior. Instituto del Tórax, Hospital Clinic
Universitat de Barcelona.

Dr. Raúl J Domenech.

Director de Tesis, responsable de la investigación experimental en Chile.

Profesor de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de
Medicina, Universidad de Chile.

Barcelona, marzo de 2016

A mi hija Emilia

AGRADECIMIENTOS

Con la dificultad de resumir muchas experiencias en estos últimos años, comienzo por agradecer muy sinceramente a todos a quienes me apoyaron durante mis años de Doctorado en Barcelona.

Al Dr. José Luis Pomar, director de esta tesis, por haber confiado en mí desde el inicio, por sus ideas y por su apoyo constante, aún cuando los caminos se hacían más difíciles, esencialmente, por permitir que esta tesis llegase a buen puerto, le estoy muy agradecido.

Al Dr. Raúl J. Domenech, también director y responsable directo de la investigación experimental, realizada en el Laboratorio Cardiovascular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Por sus valiosas enseñanzas y estímulo constante, por permitirme la investigación de esta tesis y, por sobre todo, por la amistad y confianza depositada en mi persona.

A la Dra. Pilar Macho, por sus valiosas sugerencias y por estar siempre dispuesta a colaborar sin olvidar detalle.

A mis profesores, colegas y amigos del Servicio de Anestesiología del Hospital Clinic de Barcelona, fue a quienes primero conocí en los quirófanos del hospital una vez llegados a esta ciudad, hace poco más de 10 años. Por el apoyo constante desde el inicio y por las enseñanzas, por la confianza que depositaron en mí y, sobre todo, por la amistad, lo que permite seguir creando y disfrutando de nuevos proyectos y desafíos. Les estoy muy agradecido.

A mis profesores de la Unidad de Imagen Cardíaca del Hospital Clinic de Barcelona, de todos ellos aprendí desde el primer día, y lo sigo haciendo, por el apoyo y enseñanzas, les estoy muy agradecido.

A todos los miembros del Laboratorio de Cardiología Experimental del Hospital Vall d'Hebrón, por delegarme desafíos, por la paciencia de explicarme muchas cosas, y por confiar en mi trabajo.

A todos los miembros del Programa de Fisiopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su colaboración y apoyo. A nuestros ayudantes técnicos, quienes hacen posible nuestros experimentos.

A mi familia, por su incondicional presencia.

A mi hija Emilia, por ser quién es.

Finalmente, a mis grandes amigos.

Quisiera agradecer a muchas otras personas, y a quienes me han ayudado sin darse cuenta, a todos muchas gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Resumen	11
Introducción	15
1. Mecanismos generales del preconditionamiento.....	17
1.1 Iniciadores del preconditionamiento.....	18
1.2 Mediadores del preconditionamiento.....	18
1.2.1 Transducción de señales. Papel de las proteínas cinasas.....	18
1.2.2 Proteínas mediadoras.....	19
1.3 Efectores del preconditionamiento.....	19
1.3.1 Canal de potasio mitocondrial sensible a ATP (mitoKATP)...	20
1.3.2 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).....	20
1.3.3 Hipercontractura y rotura del sarcolema.....	21
2. Participación del Ca ²⁺ , NADPH oxidasa y canal KATP en el preconditionamiento.....	21
2.1 Ión Ca ²⁺ como iniciador del preconditionamiento.....	21
2.2 NADPH oxidasa como mediador del preconditionamiento.....	22
2.3 Canales KATP como mediadores del preconditionamiento.....	23
2.3.1 Canal mitoKATP y función energética.....	24
2.3.2 Papel de los canales mitoKATP en la protección celular.....	25
3. Evidencia de preconditionamiento en humanos.....	26
3.1 Angina preinfarto.....	26
3.2 Fenómeno de <i>warm up</i>	27
3.3 Angioplastia percutánea.....	27
3.4 Cirugía de revascularización coronaria.....	28
4. Ejercicio como mecanismo preconditionante.....	28
4.1 Descripción de la cardioprotección por ejercicio.....	28
4.2 Mecanismos del preconditionamiento por taquicardia y ejercicio..	29
<i>Papel de la mitocondria en el preconditionamiento por ejercicio</i>	31
4.3 Interpretación de la evidencia actual.....	32
Hipótesis y objetivos	35
Hipótesis.....	36
Objetivos.....	37

Metodología	39
1. Aspectos éticos.....	40
1.1 Elección del modelo canino en el estudio del acondicionamiento por ejercicio.....	40
1.2 Manejo y cuidado de los animales.....	41
1.3 Aspectos metodológicos relacionados.....	42
2. Metodología experimental.....	43
<i>Bloqueo del canal mitoKATP sobre el acondicionamiento tardío por ejercicio</i>	43
<i>Participación del ión Ca²⁺ en el acondicionamiento por ejercicio</i>	51
Resultados	59
1. Análisis conjunto de ambos artículos.....	60
1.1 Efectos del ejercicio acondicionante.....	60
1.2 Maniobras de isquemia y reperfusión.....	60
2. Primera etapa del proyecto.....	61
3. Segunda etapa del proyecto.....	61
3.1 Ca ²⁺ como iniciador del acondicionamiento.....	61
3.2 Ca ²⁺ como iniciador de la activación de NADPH oxidasa.....	62
Discusión	63
1. Hallazgos de la 1era etapa de estudio.....	65
2. Hallazgos de la 2da etapa de estudio.....	67
2.1 El acondicionamiento por ejercicio es iniciado por Ca ²⁺	67
<i>Daño celular por sobrecarga de Ca²⁺</i>	69
2.2 Activación de NADPH oxidasa en el acondicionamiento por ejercicio.....	71
3. Interpretación de los resultados.....	72
<i>Beneficios del ejercicio como mecanismo acondicionante</i>	73
Conclusiones	75
Bibliografía	77

ABREVIATURAS:

ADP: Adenosín 5'-difosfato

ATP: Adenosín 5'-trifosfato

CaSR: Receptor sensor de Ca²⁺

IR: Isquemia y reperfusión

mitoKATP: (canal) de potasio mitocondrial sensible a ATP

mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

ON: Óxido nítrico

PI: Precondicionamiento Isquémico

PKC: Proteína cinasa C

PP: Precondicionamiento precoz

PT: Precondicionamiento tardío

KATP: (canal) de potasio sensible a ATP

RLO: Radicales libres de oxígeno

RS: Retículo sarcoplásmico

sarckATP: (canal) de potasio sarcolemal sensible a ATP

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

RESUMEN

Antecedentes. Recientemente se demostró que el ejercicio físico induce acondicionamiento precoz y tardío sobre el tamaño del infarto en perros, y que el precoz está mediado por activación de NADPH oxidasa y por canales de potasio mitocondriales sensibles a ATP (mitoKATP).

Hipótesis y objetivo. En una primera etapa estudiamos si estos canales mitoKATP participan también del acondicionamiento tardío por ejercicio. Posteriormente abordamos nuestro objetivo principal, si el aumento del ingreso de Ca^{2+} a la célula durante el ejercicio inicia el acondicionamiento precoz y tardío sobre el tamaño del infarto en el perro, independiente de sus efectos hemodinámicos, basado en que la administración intracoronaria de Ca^{2+} induce acondicionamiento, y que el ejercicio aumenta la entrada de Ca^{2+} a la célula. Paralelamente estudiamos si este aumento del ingreso de Ca^{2+} es también responsable de la activación de NADPH oxidasa durante el acondicionamiento precoz.

Metodología. Un total de 202 perros fueron instrumentados quirúrgicamente y entrenados a correr en una cinta 'sin fin', para luego asignarlos aleatoriamente a alguno de los tres protocolos experimentales: 1) efecto del bloqueo del canal mitoKATP con 5 hidroxidecanoato (5HD) en el acondicionamiento tardío por ejercicio; 2) efecto del bloqueo del canal de Ca^{2+} tipo-L del sarcolema con una dosis baja de verapamilo en el acondicionamiento precoz y tardío por ejercicio; 3) efecto de verapamilo en la activación de NADPH oxidasa en el acondicionamiento precoz por ejercicio.

Resultados. El ejercicio indujo protección precoz y tardía sobre el tamaño del infarto (reducción de 76% y 52-56% precoz y tardía respectivamente, $P < 0.05$ vs control), la protección tardía fue abolida por la administración de 5HD, y tanto la protección precoz como tardía fueron abolidas por la administración de una dosis única de verapamilo previo al ejercicio acondicionante. Además, verapamilo bloqueó la activación de NADPH oxidasa durante el

precondicionamiento precoz. El ejercicio no indujo isquemia miocárdica, no hubo diferencias hemodinámicas entre los grupos de estudio durante los períodos de isquemia y reperfusión, y los efectos fueron independientes del flujo colateral a la región isquémica.

Conclusiones. El preconditionamiento tardío es mediado por los canales mitoKATP, el preconditionamiento precoz y tardío es iniciado, al menos en parte, por el aumento del ingreso de Ca^{2+} a la célula durante el ejercicio, y la protección precoz es mediada a su vez por la activación de NADPH oxidasa.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica persiste como una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo industrializado (1). La investigación en este campo dirige sus esfuerzos a determinar los eventos fisiopatológicos de la injuria por isquemia y reperfusión (IR) que permitan el desarrollo de estrategias para disminuir su daño. En el año 1986, Murry, Jennings y Reimer describen en el modelo canino el fenómeno del **precondicionamiento isquémico** (PI), que consiste en aumentar la tolerancia del miocardio a la isquemia inducida por una oclusión coronaria prolongada mediante breves períodos de isquemia, llamados 'isquemia preconditionante', previos a la oclusión coronaria prolongada (2). Desde entonces se ha generado una enorme evidencia experimental sobre los mecanismos envueltos en este tipo de cardioprotección, que se traduce en disminución del tamaño del infarto (2), menor incidencia de arritmias (3) y menor disfunción contráctil (4). La isquemia preconditionante sólo disminuye la velocidad con que se produce el daño durante la isquemia prolongada, pero no lo impide. Así, si la oclusión coronaria se mantiene por muy largo tiempo (por ejemplo, más de 90 minutos), la necrosis será de igual magnitud que en el corazón no preconditionado. Se ha reportado PI en diversas especies de mamíferos, también en humanos (5-7), reflejando la capacidad del corazón para adaptarse al estrés, modificar su fenotipo y hacerse más resistente a la injuria.

El preconditionamiento sigue una evolución temporal bifásica (8), con una fase temprana de protección o preconditionamiento precoz (PP) (2,9), que se inicia pocos minutos después de la isquemia preconditionante y dura 2 a 3 horas, y una fase tardía o preconditionamiento tardío (PT), que se evidencia 12 a 24 horas más tarde y dura 3 a 4 días (10). Son las modificaciones proteicas post transduccionales, como fosforilaciones o cambios *redox*, las que median la protección del PP, y no la síntesis proteica *di novo*, lo que explica su rápida aparición temporal. El PT, en cambio, requiere de la inducción proteica con transcripción de diversas moléculas que ejerzan la

acción protectora, lo que explica la demora en su aparición, si bien otorga una ventana temporal más amplia de protección, con gran potencial terapéutico (8,10).

Además de la isquemia existen muchos otros estímulos que inician el preconditionamiento. Se ha logrado inducir preconditionamiento aumentando la demanda metabólica del miocardio en ausencia de isquemia, mediante episodios de taquicardia (11-15) o ejercicio físico (16,17), previos a la oclusión coronaria prolongada. Estos estímulos no isquémicos sugieren que es el estado metabólico miocárdico pre-isquémico el que modula o inicia el fenotipo protector, respondiendo de una manera específica ante situaciones de mayor demanda metabólica o de disminución del flujo coronario. Estímulos farmacológicos también pueden iniciar el preconditionamiento y su administración, en ausencia de otro estímulo preconditionante, reproduce el efecto del PI precoz y tardío en animales y en el hombre. Entre estos estímulos farmacológicos figuran agentes liberadores de óxido nítrico (18), agonistas de receptores de adenosina (11,19), agonistas de receptor opioide (20), anestésicos volátiles (21-23), y radicales libres de oxígeno (RLO) (16), entre otros.

Actualmente sabemos que no sólo es posible lograr cardioprotección con estímulos aplicados previo a la isquemia prolongada (estímulos preconditionantes) (8,9,24-28), sino que también con estímulos aplicados posterior a ella, en el momento de la reperusión, fenómeno conocido como **postcondicionamiento** (29-31). Más recientemente, se ha logrado inducir pre y post condicionamiento miocárdico mediante estímulos isquémicos 'remotos', esto es, mediante la inducción de isquemias transitorias en un órgano diferente del corazón, particularmente el territorio braquial (32). La presente tesis se centra en el fenómeno del 'precondicionamiento inducido por ejercicio en el modelo canino'.

1. Mecanismos generales del preconditionamiento.

El estímulo preconditionante genera un cambio en la bioquímica del miocardio, haciéndolo más resistente al infarto al disminuir la velocidad con

que se produce el daño durante la isquemia prolongada. Los procesos desencadenados con el estímulo y que ejercen su efecto antes de la isquemia prolongada son denominados **iniciadores**. Los procesos desencadenados con estos iniciadores y que continúan la protección son denominados **mediadores**. Comprenden una compleja cascada de vías de transducción de señales y modificaciones intracelulares que generan una memoria celular, y que ejercen su efecto durante la isquemia prolongada. Los procesos que finalmente ejercen la protección celular en forma directa son denominados **efectores** (8,26,33). En suma, el preconditionamiento no se debe a la apertura de vasos colaterales hacia la región isquémica ni a una expresión de atontamiento miocárdico, sino más bien a una adaptación metabólica del cardiomiocito a la isquemia. Estos mecanismos se han analizado en detalle en artículos de revisión (8-10,24-27), muy brevemente:

1.1 Iniciadores del preconditionamiento.

El estímulo preconditionante libera diferentes sustancias en el miocardio que actúan como iniciadores al activar receptores específicos acoplados a proteína G_i , sustancias como adenosina (8,19), agonistas alfa adrenérgicos (34,35), óxido nítrico (ON) (18), bradicininas (36), agonistas de receptores opioides (20) y, más recientemente, la activación del receptor 'sensor de Ca^{2+} ' acoplado a proteína G (CaSR) (37). Estos agonistas actuarían en paralelo generando redundancia, alcanzando el umbral protector más fácilmente frente a una determinada intensidad del estímulo (8,9,24). Existen además otras formas de iniciar el preconditionamiento, no acoplado a receptor, a través de un aumento transitorio del ión Ca^{2+} intracelular (38,39), RLO (16), períodos breves de hipertermia, estiramiento de fibras miocárdicas, entre otras (8).

1.2 Mediadores del preconditionamiento.

1.2.1 Transducción de señales. Papel de las proteínas cinasas.

Con la activación de la proteína G se inicia una cascada de señales intracelulares donde participan una variedad de familias de proteínas cinasas, principalmente proteína cinasa C (PKC) y proteína tirosina cinasa, las que

continúan la inducción del preconditionamiento mediante la fosforilación de proteínas mediadoras del PP y, al mismo tiempo, mediante la activación de factores de transcripción, con aumento transcripcional de genes cardioprotectores y síntesis *di novo* de los mediadores responsables del PT. El proceso funcionaría de manera gradual en forma de curva dosis-respuesta. Como hemos mencionado, el PP no precisa de nueva síntesis proteica, sino que es la activación de PKC la que fosforila sustratos que median el estado protector mientras éstos permanezcan fosforilados, dejando al corazón en un estado preconditionado que dura sólo algunas horas. En el PT, en cambio, la síntesis de nuevas proteínas mediadoras permite que el estado preconditionado dure 1 a 3 días (8-10,24-27).

1.2.2 Proteínas mediadoras.

Diversas proteínas se han propuesto como mediadoras de la cardioprotección, entre ellas enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa de Mn (MnSOD) (16), óxido nítrico sintetasa (24), canales de potasio sensibles a ATP (KATP) (40,41) y NADPH oxidasa (42,43). Estudios previos en nuestro laboratorio (44) han mostrado que la isquemia prolongada altera la cinética del ión Ca^{2+} por parte del retículo sarcoplásmico (RS), asociado a modificaciones del receptor de rianodina y fosfolambano, efecto revertido por la taquicardia preconditionante, lo que sugiere que las proteínas del RS actuarían también como mediadores de preconditionamiento, evitando la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, un posible mecanismo de protección.

1.3 Efectores del preconditionamiento.

La compleja cadena de eventos iniciados con el estímulo preconditionante convergen finalmente en moléculas que ejercen la protección contra la muerte celular en forma directa y definitiva durante la reperfusión del miocárdico isquémico (45).

Los procesos efectores no están del todo definidos, y existe además una sumatoria de eventos celulares interrelacionados. La identificación de estas moléculas efectoras, y de sus mecanismos de acción, permitiría iniciar la

modulación farmacológica desde antes del inicio de la reperfusión del miocardio isquémico, con enormes proyecciones terapéuticas.

1.3.1 Canal de potasio mitocondrial sensible a ATP (mitoKATP).

Uno de los posibles efectores del preconditionamiento es el canal mitoKATP, también considerado como mediador tardío (41). Se discutirá sobre ellos en forma independiente más adelante en la Introducción.

1.3.2 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).

El mPTP es un megacanal mitocondrial multiproteico de alta conductancia cuya identidad molecular aún no se conoce del todo, y que permite el paso no selectivo de solutos con un peso molecular de hasta 1500 Dalton. Su abertura es uno de los principales mecanismos de la muerte del cardiomiocito al momento de la reperfusión, y la evidencia actual muestra que las diferentes maniobras pre y postcondicionantes actúan previniendo o retardando su abertura, ya sea mediante estímulos preconditionantes o por inhibición farmacológica (46-48).

Una vez iniciada la reperfusión del miocardio isquémico se produce un aumento significativo de RLO y de la concentración de Ca^{2+} intracelular, aumento de fosfatos inorgánicos y reducción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), lo que favorece la abertura súbita del mPTP al inicio de la reperfusión. La abertura del mPTP produce edema y pérdida del $\Delta\Psi\text{m}$, desacoplamiento mitocondrial, pérdida de la homeostasis iónica, liberación de factores proapoptóticos y muerte celular por apoptosis y necrosis, siendo responsable de la muerte celular al momento de la reperfusión. La presencia de nucleótidos de adenina y la acidificación de la matriz previene su apertura, lo que explica que éste se mantenga cerrado durante la isquemia prolongada previo a la reperfusión (46,47).

En un reciente estudio clínico en pacientes sometidos a angioplastia primaria por infarto agudo del miocardio, se observó que la administración de ciclosporina A, un inhibidor del mPTP, fue capaz de reducir el tamaño del infarto (49). Los estudios sobre la participación del mPTP en el ejercicio preconditionante aún no arrojan resultados concluyentes.

1.3.3 Hipercontractura y rotura del sarcolema.

Se ha observado que con el inicio de la reperfusión el cardiomiocito sufre una activación contráctil excesiva y sostenida secundaria al aumento del Ca^{2+} citosólico, fenómeno conocido como **hipercontractura**. Es responsable de daño celular directo en los primeros minutos de la reperfusión, y la evidencia muestra que es atenuada con el preconditionamiento, por lo que se considera un efector importante de la muerte por IR (45,50). Asociado a la hipercontractura, el aumento de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión también provoca la fragilidad del sarcolema y su rotura, otro mecanismo efector de la muerte celular (45,51).

2. Participación del Ca^{2+} , NADPH oxidasa y canal KATP en el preconditionamiento.

2.1 Ión Ca^{2+} como iniciador del preconditionamiento.

Ashraf y cols reportaron en el año 1994 que períodos cortos de depleción y reperfusión de Ca^{2+} eran protectores del daño miocárdico en el corazón aislado de rata (52), corroborándose posteriormente el efecto protector de la administración de Ca^{2+} como iniciador del preconditionamiento en diferentes modelos animales, incluido el perro (38,39,53). Se puede inducir preconditionamiento con maniobras que aumenten la concentración de Ca^{2+} intracelular, como la administración intracoronaria de Ca^{2+} (54,55), y revertir dicha protección con maniobras que la disminuyan, como el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L del sarcolema (39,56).

El preconditionamiento por Ca^{2+} compartiría mecanismos con otros tipos de preconditionamiento, como el PI y el preconditionamiento por ejercicio y taquicardia. Se ha observado en el corazón de la rata que la administración del bloqueador de Ca^{2+} verapamilo es capaz de bloquear no sólo la protección del preconditionamiento por Ca^{2+} , sino también la del PI (39), hallazgo similar al obtenido con el bloqueador del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el modelo canino (55).

Se ha observado también que tanto la taquicardia como los breves períodos de isquemia preconditionantes aumentan transitoriamente los niveles de

Ca^{2+} intracelular (53,55,57,58), y que el preconditionamiento por Ca^{2+} , al igual que el PI y el PP por taquicardia y ejercicio, son mediados por PKC y por canales KATP (11,14,17,39,59). Sin embargo, no se ha demostrado a la fecha que el aumento del Ca^{2+} intracelular participe también del preconditionamiento inducido por ejercicio.

La acidosis intracelular secundaria a la isquemia preconditionante explicaría el aumento transitorio y controlado del Ca^{2+} citosólico observado en estos breves períodos de isquemia. El aumento de la concentración intracelular de H^+ estimula el intercambiador Na^+/H^+ , resultando en una salida de H^+ y entrada de Na^+ , lo que a su vez estimula el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, con el consecuente aumento del Ca^{2+} citosólico (45,50,51).

A diferencia de los breves períodos de isquemia preconditionante, durante una isquemia prolongada la depleción energética produce una sobrecarga masiva de Ca^{2+} citosólico con daño irreversible en los cardiomiocitos (45,51,53,55). El rápido lavado de H^+ extracelulares durante los primeros minutos de la reperfusión reactiva el intercambiador Na^+/H^+ , logrando restablecer el pH intracelular a expensas de una mayor sobrecarga intracelular de Na^+ y Ca^{2+} , cuyo balance final dependerá de la capacidad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ de restablecer el potencial de membrana y la homeostasis iónica (45,51).

2.2 NADPH oxidasa como mediador del preconditionamiento.

La generación masiva de RLO (como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) con el inicio de la reperfusión guarda relación directa con el daño miocárdico por IR (45,50,51). Sin embargo, hace casi dos décadas se observó en el modelo del conejo que la exposición a dosis bajas de RLO, en ausencia de isquemia, inicia la cardioprotección, reproduciendo los efectos benéficos del PI (60), en la misma línea a lo reportado en el corazón de la rata, donde el uso de antioxidantes durante el PI abolió el efecto protector (61). Estos hallazgos, junto a la evidencia actual, sugieren que la generación de dosis subletales y controladas de RLO durante las maniobras preconditionantes jugarían un papel fundamental como

mediadores, actuando como segundos mensajeros en el desarrollo de la cardioprotección (8,24,26,60,62).

La mitocondria es la principal fuente de RLO durante el preconditionamiento (63), y la NADPH oxidasa la principal fuente de RLO en el tejido cardiaco, siendo implicada en la protección obtenida con el PI (64), con el preconditionamiento farmacológico con angiotensina II (65), y con el preconditionamiento por taquicardia (42). Estudios recientes han demostrado que los RLO, especialmente a través de la vía de NADPH oxidasa, participarían también del preconditionamiento por ejercicio (43,66). La evidencia actual sugiere entonces que las modificaciones *redox* de proteínas intracelulares serían también una parte fundamental de la cardioprotección inducida por ejercicio físico.

2.3 Canales KATP como mediadores del preconditionamiento.

Hace más de dos décadas se propuso por primera vez que la abertura de los canales KATP estaba involucrada en la protección que otorga el preconditionamiento (67), aquellos localizados en la membrana del sarcolema (sarcKATP), y particularmente los localizados en la membrana interna de la mitocondria, los mitoKATP (8,40,41,67-71). El canal sarcKATP está conformado por un canal de potasio rectificador interno en asociación con un receptor de sulfonilureas. Se cree que el canal mitoKATP tiene una estructura similar, si bien su composición exacta aún no se conoce (72).

La abertura de los canales sarcKATP acorta el potencial de acción y reduciría de esta forma la entrada de Ca^{2+} a la célula durante la isquemia prolongada, evitando la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular como mecanismo protector. El acortamiento del potencial de acción reduciría la excitabilidad celular, lo que ayudaría a preservar la energía celular durante la isquemia prolongada (40). Se ha reportado a estos canales como uno de los mediadores del preconditionamiento por ejercicio (73,74), siendo necesaria su abertura durante la isquemia prolongada para disminuir el daño por IR (40).

En los últimos años se ha postulado también al canal mitoKATP como posible mediador en la cadena que lleva a la protección, basado en los siguientes

hallazgos (41): a) estos canales se activan en la isquemia por la disminución del contenido de ATP celular y su activación con abridores de estos canales, como nicorandil y diazoxide, reproducen la protección (68,69), b) a la inversa, el bloqueo de estos canales con 5-hidroxi-decanoato (5HD) o glibenclamida revierten el efecto protector de la isquemia preconditionante (70), c) diversos estímulos preconditionantes como isquemia (8,24-27,75), taquicardia (13-15), administración de Ca^{2+} (53), agonistas de adenosina (76) y agonistas opioides $\delta 1$ (20), convergen en la activación del canal mitoKATP, con participación de PKC (77) y d) en el hombre, la incidencia de isquemia en pacientes con cardiopatía coronaria disminuye con la administración de nicorandil (78,79).

2.3.1 Canal mitoKATP y función energética.

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la principal fuente de producción de ATP en células eucariotes (33). La cadena de transporte de electrones permite sacar H^+ de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico. La mitocondria utiliza este gradiente para sintetizar ATP al permitir la entrada de H^+ a través del complejo F0-F1, donde el ADP es fosforilado a ATP. La abertura del canal mitoKATP permite que el K^+ entre a la mitocondria a favor de su gradiente electroquímico, arrastrando agua y produciendo un edema discreto de la matriz de este organelo. Un intercambiador K^+/H^+ de la membrana interna intercambia entonces el K^+ intramitocondrial con el H^+ extramitocondrial. El ingreso de H^+ a la matriz por una vía diferente del complejo F0-F1 reduce la producción de ATP, desacopla a la mitocondria (gasto de energía no asociado a producción de ATP) y la depolariza. De esta forma, la abertura del canal disipa energía que podría utilizarse por el complejo F0-F1 para sintetizar ATP. Sabemos que en condiciones normóxicas la magnitud del desacoplamiento generado por el ingreso de K^+ no excede los 10 mV, debido a la baja densidad de estos canales en la membrana interna y debido al aumento compensatorio de la bomba de H^+ y consumo de O_2 (con liberación de dosis subletales de RLO desde la mitocondria), que restablecería el $\Delta\Psi_m$ y la fosforilación oxidativa (80,81).

2.3.2 Papel de los canales mitoKATP en la protección celular.

En la actualidad no sabemos cómo o cuándo se abren estos canales durante el período de IR. Asumimos que la activación fisiológica ocurre como resultado de una exigencia metabólica o en respuesta a estímulos activadores, como ON (82), activación de PKC (77), RLO (83), entre otros. La principal manera de estudiar el curso temporal de la activación del canal es administrar su bloqueador específico en dos diferentes tiempos, previo al estímulo preconditionante (papel del canal como iniciador) o previo a la isquemia prolongada (papel del canal como mediador o efector) (84). La evidencia actual sugiere que la apertura del canal mitoKATP es tanto iniciador como mediador de la protección (41,59).

Tampoco se conoce la forma exacta por la que la abertura de los canales mitoKATP favorece la protección, pero hay evidencias de importancia. La activación de este canal aumenta la producción de RLO durante condiciones normóxicas, disminuye la producción de RLO durante la reperfusión, evita la acumulación de Ca^{2+} y disminuye el consumo de ATP durante la isquemia, mejora la producción de energía posterior a la isquemia, y disminuye la probabilidad de conformación del mPTP, efector de la muerte celular (41,46,47,85), todo lo cual contribuiría a la protección contra la IR.

Hipótesis propuestas (33,41,80,81,86): a) Edema mitocondrial y optimización de la fosforilación oxidativa. La apertura de canales mitoKATP disminuye la tasa de caída del ATP intracelular y retarda la pérdida del $\Delta\Psi_m$ durante la isquemia prolongada. En condiciones normóxicas, la abertura del canal optimizaría la eficiencia de producción de ATP. Hallazgos en mitocondrias de corazones expuestos a hipoxia crónica muestran un aumento de la síntesis basal de ATP y sugieren que los canales mitoKATP permanecen abiertos, otorgando una mayor resistencia a la isquemia. La expansión de la matriz mitocondrial asociada a la abertura de estos canales mejora la oxidación de ácidos grasos, la respiración y la producción de ATP. El edema de la matriz mitocondrial secundario al ingreso de K^+ y H_2O contrae el espacio intermembrana y mantiene sitios de contacto entre las membranas interna y externa, evitando la apertura del mPTP y preservando así el acoplamiento

funcional entre la creatinquinasa mitocondrial y la traslocasa de nucleótidos de adenina de la membrana interna, a través de la cual el ADP-ATP se transporta entre el espacio intermembrana y la matriz, sin escapar al citosol. Esto logra conservar el contenido de nucleótidos de adenina en la mitocondria durante la isquemia, siendo la fosforilación de la creatina el modo de transferir la energía al citosol. La fosfocreatina difunde al citosol y allí fosforila el ADP citosólico, formando el ATP que será utilizado para el requerimiento energético celular. Preservar los niveles de ADP mitocondrial significa sustrato disponible para la fosforilación oxidativa al momento de la reperfusión; b) la activación de canales mitoKATP con el ingreso de K^+ a la matriz disminuye o suprime la sobrecarga de Ca^{2+} durante la isquemia y por ende el daño mitocondrial, posiblemente por disminución de la gradiente electroquímica para la entrada de este ión; c) la activación de los canales mitoKATP aumenta la producción de niveles subletales de RLO secundario al aumento compensatorio de la fosforilación oxidativa, los que actúan como iniciadores de la cardioprotección a través de la activación de proteínas cinasas, particularmente PKC (77), sin embargo disminuye la liberación de dosis letales de RLO durante la reperfusión y; d) aparentemente disminuye la apoptosis inducida por isquemia, no sólo porque evita la pérdida completa e irreversible del potencial mitocondrial sino también por la disminución en la liberación de citocromo c (41).

3. Evidencia de preconditionamiento en humanos.

En la actualidad existen modelos *in vitro* y estudios clínicos que respaldan la existencia de preconditionamiento en humanos, si bien aún con enormes desafíos para lograr su aplicación terapéutica en la práctica clínica. La evidencia de preconditionamiento en humanos podemos dividirla en cuatro grupos (8,87):

3.1 Angina preinfarto.

Se ha observado menor daño isquémico consecuente a un accidente coronario si el paciente ha presentado episodios breves de isquemia las horas precedentes (6,7,88). Si bien el preconditionamiento clásico o precoz

puede jugar algún papel, es probable que episodios de dolor o isquemia silente cercanos a 24 horas antes del infarto ejerzan protección mediante PT (89). En un estudio trombolítico del grupo TIMI-4 (7), la angina preinfarto se relacionó con menor tamaño del infarto, menos muertes intrahospitalarias y menor falla cardíaca congestiva y shock. En un estudio del grupo TIMI-9 (90) en que se evaluó la relación temporal entre angina e infarto, sólo aquellos pacientes con angina dentro de las 24 horas precedentes tuvieron resultados favorables, como menor tamaño del infarto. Sin embargo, no todos los estudios de angina preinfarto son sugerentes de PI, especialmente en pacientes seniles. Al respecto, el desarrollo de circulación colateral es un hecho que no se puede descartar y se ha sugerido también que el beneficio de la angina preinfarto es debido a una mejor y más rápida trombolisis, sugiriendo que la angina preinfarto podría tener un efecto preconditionante vascular (91,92).

3.2 Fenómeno de *warm up*.

El fenómeno de *warm up* consiste en la disminución del grado de isquemia de demanda al repetir un determinado ejercicio luego de un breve período de reposo (93,94). Este fenómeno ha sido relacionado más con la fase temprana del PI que a la fase tardía (95).

3.3 Angioplastia percutánea.

El modelo de inflación secuencial del balón de angioplastia coronaria percutánea ha arrojado fuertes evidencias de un PI precoz, con atenuación progresiva de la isquemia en las oclusiones coronarias subsecuentes (96). Si bien algunos pacientes pueden mostrar una mayor circulación colateral, ésta no logra explicar totalmente la adaptación miocárdica a las inflaciones repetidas del balón (8). Los mecanismos estudiados apoyan el efecto preconditionante, involucrando a los canales KATP (5) y a adenosina (97), entre otros. No se ha estudiado si estos episodios transitorios de isquemia ejercen o no PT en el hombre.

3.4 Cirugía de revascularización coronaria.

Estudios anteriores han mostrado una mejor preservación miocárdica por la isquemia preconditionante durante cirugía coronaria y valvular, a pesar de una protección óptima con soluciones de cardioplejia e hipotermia (98-100). El efecto preconditionante precoz es el mecanismo protector durante la isquemia aguda quirúrgica, sin embargo, al igual que con la angioplastia, no podemos descartar un efecto preconditionante tardío en el postoperatorio inmediato. Más recientemente, un estudio de preconditionamiento isquémico remoto previo a cirugía coronaria mostró mejoría del pronóstico en el grupo de pacientes preconditionados (101).

Por último, hace algunos años se presentó el primer experimento de PT inducido farmacológicamente en humanos, mediante una infusión intravenosa de nitroglicerina durante cuatro horas, el día previo al procedimiento de angioplastia, con resultados favorables (102), si bien estudios posteriores arrojan resultados contradictorios (87).

4. Ejercicio como mecanismo preconditionante.

4.1 Descripción de la cardioprotección por ejercicio.

La primera descripción experimental de cardioprotección por ejercicio fue en el año 1978 (103), ocho años antes de la descripción del PI (2), y se ha observado en animales machos y hembras, en diferentes especies de animales, en modelos celulares, de corazón aislado y animal *in vivo*, y tanto en animales jóvenes como en animales de edad avanzada (104). El preconditionamiento por ejercicio, al igual que el PI, sigue una curva de protección bifásica, con una protección precoz e intensa (PP), seguida de una segunda ventana de protección tardía, menos robusta pero de mayor duración (PT). De nuestro conocimiento, esta descripción temporal de la protección por ejercicio se basa en dos estudios, el primero, un estudio del año 1999 de Yamashita y cols. en ratas (16) y, el segundo, un estudio del año 2002 de nuestro laboratorio (17), donde se describe el fenómeno del PP y PT sobre el tamaño del infarto en el perro. No está del todo claro la intensidad del ejercicio necesaria para constituirse en un estímulo preconditionante, si

bien parece que intensidades del 75% del consumo máximo de O₂ protegen en forma consistente contra el tamaño del infarto. No se conoce si intensidades menores o iguales al 60% del consumo máximo de O₂ generan preconditionamiento (104). La duración de la protección después del ejercicio preconditionante tampoco está suficientemente estudiada. Un estudio realizado en ratas reporta beneficios sobre la recuperación miocárdica funcional de hasta 9 días después del cese del ejercicio, en un entrenamiento de alta intensidad y durante varios días (105).

4.2 Mecanismos del preconditionamiento por taquicardia y ejercicio.

Como se mencionó previamente, existen muchos estímulos que pueden iniciar el preconditionamiento sin necesidad de isquemia preconditionante. Entre esos estímulos están la taquicardia (11-15) y el ejercicio (16,17). El preconditionamiento por ejercicio comparte muchos de los procesos del PI (Figura). Brevemente:

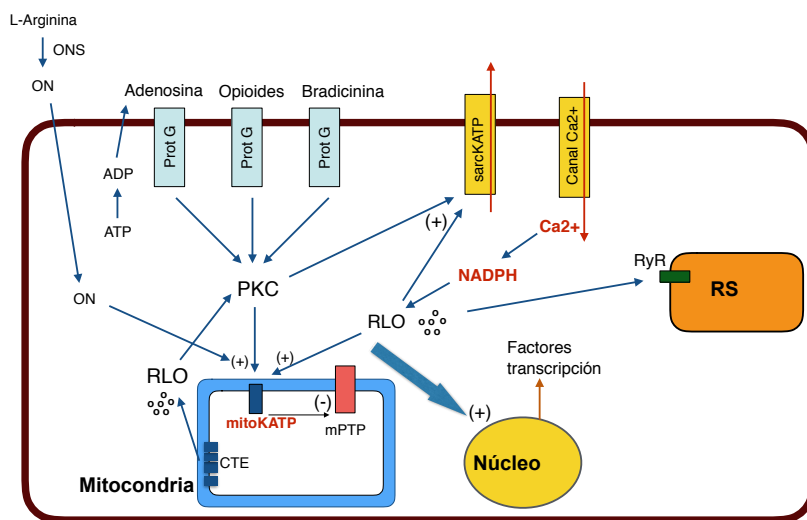


Figura: Esquema de los mecanismos involucrados en el preconditionamiento por ejercicio. Se destaca en letras rojas los mecanismos estudiados en la presente tesis, Ca²⁺, NADPH y canal mitoKATP. CTE: Cadena de transporte de electrones; mitoKATP: canal de potasio mitocondrial sensible a ATP; mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; PKC: Proteína cinasa C; Prot G: receptor acoplado a proteína G; RLO: radicales libres de oxígeno; RyR: receptor de rianodina; RS: retículo sarcoplásmico; ON: óxido nítrico; ONS: ON sintetasa; sarcKATP: canal de potasio sarcolemal sensible a ATP. Detalles en el texto.

Diferentes metabolitos liberados durante la taquicardia y el ejercicio, como adenosina y opiodes, entre otros, actuarían como iniciadores del preconditionamiento a través de un receptor acoplado a proteína G (11,104). La producción de dosis subletales de RLO también participaría como iniciador o mediador precoz del preconditionamiento por ejercicio y taquicardia, donde el efecto protector es abolido con el uso de antioxidantes (16,43,104). En estudios anteriores en nuestro laboratorio se ha observado que taquicardia y ejercicio aumentan la actividad de NADPH oxidasa, y que su bloqueo anula la protección (42,43). De nuestro conocimiento, a la fecha no se ha estudiado si el aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular por el ingreso desde el sarcolema es también un iniciador del preconditionamiento por ejercicio, similar a otras formas de preconditionamiento.

De forma similar a lo observado en el PI, en el preconditionamiento por ejercicio la protección también se continúa mediante una cascada de señales intracelulares vía proteínas cinasas, fosforilaciones, modificaciones *redox*, y activación de factores de transcripción, con síntesis de proteínas mediadoras y efectoras de la protección (104). El aumento transitorio del estrés oxidativo generado con la actividad física sería un estímulo para moléculas antioxidantes, como MnSOD y glutathion reductasa (66,104), y para producir, junto con la activación de proteínas cinasas, fosforilaciones y modificaciones *redox* en moléculas implicadas en la protección por ejercicio, como proteínas del RS (43), canales sarcKATP (73,74), y canales mitoKATP (17).

A pesar del hecho ampliamente conocido que la sobrecarga de Ca^{2+} es un mecanismo central del daño miocárdico por IR, hay escasa evidencia del efecto del ejercicio sobre la capacidad del cardiomiocito de manejar esta sobrecarga (104). Un estudio en ratas mostró que los corazones entrenados con ejercicio serían menos susceptibles a la sobrecarga de Ca^{2+} durante la reperfusión (106), y que el ejercicio protegió de la disfunción diastólica durante la IR, evaluada por la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo, sugiriendo una menor sobrecarga de Ca^{2+} en corazones entrenados con ejercicio (74).

Papel de la mitocondria en el acondicionamiento por ejercicio.

La mitocondria juega al menos dos papeles fundamentales en la supervivencia celular, a saber, la síntesis de ATP y la homeostasis del Ca^{2+} . Es además una de las principales fuentes de producción de RLO. La importancia en la energética celular, producción de RLO, y manejo del Ca^{2+} , reflejan la importancia de la mitocondria en el daño por IR y en el acondicionamiento, siendo considerado el efector final de la cardioprotección (33). Muchas señales moleculares convergen en la mitocondria, mejorando la energética y reduciendo la muerte celular por apoptosis y necrosis (33,46,47,107).

En condiciones aeróbicas fisiológicas, el aumento de un micromolar de Ca^{2+} estimula el ciclo de Krebs favoreciendo la síntesis de ATP, esencial para mantener el funcionamiento de las bombas dependientes de ATP, los gradientes iónicos de Ca^{2+} y la estabilidad de membranas (33,107). Además, la mitocondria puede participar en la homeostasis del Ca^{2+} regulando el flujo de Ca^{2+} en su membrana interna con modificaciones del volumen de la matriz mitocondrial, dependiente a su vez de la activación de los canales mitoKATP. La capacidad de la mitocondria para acumular Ca^{2+} es varias veces superior a la del RS, evidenciando su importancia para manejar la sobrecarga de Ca^{2+} en condiciones patológicas (33,107).

Se ha reportado diversos cambios fenotípicos en mitocondrias de corazones entrenados con ejercicio, entre ellos modificaciones en moléculas implicadas en vías apoptóticas, captadores de RLO (108), y canales mitoKATP (17). La evidencia sobre la participación del mPTP en el acondicionamiento por ejercicio es aún escasa y con resultados no concluyentes (104,108). Las mitocondrias de animales con actividad física preservarían la energética de manera más eficiente y serían más resistentes al daño por IR (106,108).

4.3 Interpretación de la evidencia actual.

Los estímulos no isquémicos sugieren que el estado metabólico pre-isquémico del miocárdico modula o inicia el fenotipo protector, respondiendo de una manera específica ante situaciones de mayor demanda metabólica, como es el ejercicio corporal (109). El ejercicio es uno de los pocos estímulos preconditionantes que han mostrado otorgar una cardioprotección sostenida tanto en modelos experimentales como en humanos (104,110,111). La ventaja del ejercicio como estímulo protector radica en la posibilidad de modular la resistencia a la isquemia con la inducción fisiológica, periódica y mantenida de preconditionamiento miocárdico mediante una actividad física regular, dado la limitante en clínica humana de anteponernos a un síndrome coronario agudo que permita realizar maniobras preconditionantes de tipo isquémico o farmacológico (112). El ejercicio induce preconditionamiento precoz y tardío (17), lo que permitiría mantener una protección miocárdica permanente con una actividad física adecuada. El concepto radica entonces en 'reinducir' preconditionamiento con cada episodio de ejercicio y, de esta forma, mantener al miocardio permanentemente preconditionado. El término 'permanente' hace referencia a la constante y periódica re-inducción de la protección mediante el ejercicio diario, y no a una protección permanente generada por un estímulo único.

Esta hipótesis concuerda con el hecho conocido que la incidencia de infarto del miocardio es menor en individuos que mantienen una actividad física regular (112,113), sumado a las evidencias clínicas y epidemiológicas que han mostrado que el ejercicio físico es un poderoso factor cardioprotector aún en presencia de otros factores de riesgo (104,114), y que los mecanismos involucrados incluyen cardioprotección por preconditionamiento frente al daño por IR (17,104), cambios anatómicos y fisiológicos de las arterias coronarias y del tono autonómico con aumento del flujo coronario (104,114), y efectos benéficos sobre los factores de riesgo cardiovascular, todo lo cual contribuye al mejor pronóstico cardiovascular a largo plazo en pacientes que mantienen una actividad física regular (115). En forma opuesta, la inactividad física se ha reconocido como uno de los principales factores de riesgo de muerte cardiovascular (104,115). La protección que otorga la actividad física

en forma crónica se debería entonces a una sumatoria de mecanismos protectores complementarios, entre ellos el efecto preconditionante del ejercicio físico.

Experimentos en el laboratorio del Dr. Domenech han demostrado que el modelo *in vivo* en el perro permite estudiar la protección que otorga el preconditionamiento del miocardio inducido por ejercicio secundario a una oclusión coronaria transitoria, que el ejercicio físico induce preconditionamiento precoz y tardío sobre el tamaño del infarto en el perro (17), y que en el precoz, al igual que en el preconditionamiento por taquicardia (14,15,42), participan NADPH oxidasa (43) y canales mitoKATP (17). Sin embargo, no se ha estudiado a la fecha los mecanismos iniciadores en este tipo de preconditionamiento, ni si los canales mitoKATP participan también del PT por ejercicio.

Debido a que durante el ejercicio existe un aumento del ingreso de Ca^{2+} a la célula dependiente de catecolaminas (116-118), a que la administración de Ca^{2+} induce preconditionamiento (38,39,55), y que tanto esta protección, como el ingreso de Ca^{2+} inducido por catecolaminas, son bloqueadas por verapamilo (38,39), pensamos que el ingreso de Ca^{2+} a la célula durante el ejercicio físico sería el iniciador de su efecto preconditionante. Además, debido a que el Ca^{2+} , y más específicamente el receptor 'sensor de Ca^{2+} ', participaría del preconditionamiento isquémico independiente de sus efectos hemodinámicos (37,119), decidimos estudiar el efecto de una dosis baja y única de verapamilo, que no modificara los efectos hemodinámicos propios del ejercicio.

Por último, y dado que recientemente se demostró que el PP por ejercicio activa la NADPH oxidasa, y que su inhibición con apocinina revierte el efecto protector del ejercicio, decidimos estudiar, una vez demostrado el efecto de verapamilo sobre el preconditionamiento por ejercicio, si el bloqueo de la protección con la administración de verapamilo es mediado por NADPH oxidasa.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En consecuencia, las hipótesis y objetivos de mi investigación son:

Hipótesis principal:

El aumento del ingreso de Ca^{2+} a la célula durante el ejercicio inicia el acondicionamiento precoz y tardío por ejercicio sobre el tamaño del infarto en el perro, independiente de sus efectos hemodinámicos.

Para analizar esta hipótesis se indujo acondicionamiento precoz y tardío por ejercicio en perros y se estudió si verapamilo, administrado previo al ejercicio acondicionante, en una dosis baja y única que no altere el efecto hemodinámico propio del ejercicio, revertía esta protección.

Hipótesis secundaria:

1.- El acondicionamiento tardío sobre el tamaño del infarto inducido por ejercicio en el perro está mediado por canales mitoKATP.

Para analizar esta hipótesis se indujo acondicionamiento tardío por ejercicio en perros y se estudió si el bloqueo de los canales mitoKATP, con 5HD, revertía esta protección.

2.- El aumento del ingreso de Ca^{2+} a la célula durante el ejercicio inicia la activación de NADPH oxidasa en el acondicionamiento precoz por ejercicio en el perro.

Para analizar esta hipótesis se indujo acondicionamiento precoz por ejercicio en perros, y se estudió si la administración de verapamilo, administrado previo al ejercicio acondicionante, en una dosis baja y única que no altere el efecto hemodinámico propio del ejercicio, revertía esta activación.

Objetivo principal:

Estudiar la participación del ión Ca^{2+} en la protección precoz y tardía obtenida por ejercicio físico en el perro.

Objetivos secundarios:

1.- Estudiar la participación de los canales mitoKATP en el acondicionamiento tardío sobre el tamaño del infarto inducido por ejercicio en el perro.

2.- Estudiar la participación del ión Ca^{2+} en la activación de NADPH oxidasa en el acondicionamiento precoz inducido por ejercicio en el perro.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. Aspectos éticos.

Los protocolos de estudio siguen las normas de “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado por *US National Institute of Health* (NIH publication N° 85-23, revised 1996), y fueron aprobados por el ‘Comité de Ética para el uso de animales de investigación’ de nuestra institución. El alumno candidato posee la acreditación como personal investigador en el uso de animales para investigación, Direcció General del Medi Natural, Barcelona, Generalitat de Catalunya.

1.1 Elección del modelo canino en el estudio de acondicionamiento por ejercicio.

Muchas de las preguntas que buscan respuesta en los modelos *in vivo* se originan y/o han sido previamente estudiadas en cultivos celulares o modelos de corazón aislado, algunas de las cuáles merecen ser estudiadas en modelos de animal completo para acercar la potencial diana terapéutica a la clínica humana (120). Los modelos de corazón aislado permiten condiciones experimentales mejor controladas que los modelos *in vivo*, siendo especialmente utilizados para estudio de mecanismos y vías metabólicas. Los modelos *in vivo*, en cambio, tienen la ventaja de mantener intacta la influencia hemodinámica y neurohumoral, permiten estudiar el modelo de isquemia regional, sin duda más cercano a la cardiopatía coronaria en humanos, a diferencia del daño hipóxico o por isquemia global de los modelos celulares o corazón aislado, y permiten además estudiar, en modelos con supervivencia del animal, los efectos a largo plazo de la injuria isquémica con o sin reperfusión, como la recuperación funcional o el remodelado ventricular, lo que otorga gran aplicabilidad clínica.

Entre los modelos *in vivo*, una de las principales ventajas del animal grande es su mayor facilidad de manipulación e instrumentación, que facilita la monitorización continua de variables fisiológicas y la extracción seriada de sangre para análisis. La obtención de muestras de seno coronario es

frecuente para análisis metabólico en el modelo canino. En el modelo porcino este análisis se ve limitado por el drenaje parcial de la vena álgica izquierda en el seno coronario, dificultando la interpretación de los resultados.

El modelo canino es el modelo clásico de estudio de protección miocárdica donde fue descrito el fenómeno del acondicionamiento isquémico el año 1986 (2), y de alta aplicación traslacional. El perro posee una gran circulación miocárdica colateral, a diferencia del modelo porcino, lo que representaría mejor las etapas avanzadas de cardiopatía coronaria, con gran desarrollo de flujo colateral compensatorio. Por último, en la presente tesis el estudio del ejercicio como maniobra protectora requiere de animales crónicamente instrumentados, conscientes, y en óptimas condiciones fisiológicas para la realización de un programa de entrenamiento físico reproducible en los diferentes grupos de animales mediante ejercicio controlado en una 'cinta sin fin', lo que sin duda se favorece con el modelo canino.

Experimentos en nuestro laboratorio han demostrado que el modelo canino *in vivo* permite estudiar la protección que otorga el acondicionamiento del miocardio inducido por taquicardia y ejercicio secundario a una oclusión coronaria transitoria, y que el ejercicio físico induce acondicionamiento precoz y tardío sobre el tamaño del infarto (11,17).

1.2 Manejo y cuidado de los animales.

Se utilizó perros adultos entre 18 y 25 kg de peso corporal, cedidos a la Universidad de Chile por convenio para investigación biomédica por el Departamento de Higiene Ambiental del Ayuntamiento, luego de la valoración por medicina veterinaria de la institución. A la llegada al bioterio de la Facultad de Medicina, los animales se observaron durante algunos días, con comida administrada en raciones controladas y agua *ad libitum*, corroborando las condiciones físicas estables del animal, antes de ingresar al estudio.

La cirugía de instrumentación se realizó bajo anestesia general, intubación endotraqueal y ventilación mecánica controlada, manteniendo controladas y estables las variables hemodinámicas y respiratorias, como se detalla en los

apartados metodológicos de ambos artículos de esta tesis. Se aplicó una técnica quirúrgica aséptica rigurosa, más antibiopprofilaxis.

Dentro de los cuidados postoperatorios se manejó la analgesia con antiinflamatorios no esteroideos más opiodes. Los animales fueron observados estrechamente durante todo el período postoperatorio para tratar cualquier manifestación patológica que ocurriese, incluyendo infecciones. Se evaluó cada animal de acuerdo a una escala preestablecida (121), para cuantificar el dolor y aflicción causados por un determinado procedimiento y así poder tomar las medidas apropiadas para aliviarlos.

La inducción del infarto también se realizó bajo anestesia general. El estudio finalizó después de la inducción del infarto con posterior reperusión, sin supervivencia del animal. Sólo para el estudio de la activación de la NADPH oxidasa por ejercicio (segunda etapa, apartado b) (42), el estudio finalizó después del ejercicio precondicionante, sin inducción de infarto.

La eutanasia se realizó con una sobredosis de pentobarbital (60 mg/kg iv), seguido de la exsanguinación del animal una vez verificado el estado de coma farmacológico barbitúrico.

1.3 Aspectos metodológicos relacionados.

Se realizó una prueba de cálculo muestral plasmada en el 1er artículo de tesis, con el objetivo de estudiar el mínimo número de animales que permita responder la hipótesis del proyecto. En la misma línea, los experimentos donde se evaluó las variables hemodinámicas y metabólicas durante el ejercicio fueron utilizados en su conjunto para ambas etapas del estudio, por ser los mismos protocolos de entrenamiento físico. En la etapa 2 se incluyó el estudio de las mismas variables en animales con administración previa de verapamilo (tabla 2 del 2do artículo de Tesis).

Durante toda la cadena de utilización de microesferas se utilizó las normas de bioseguridad con protección plomada, y el tejido animal fue posteriormente trasladado a la Comisión Chilena de Energía Nuclear para su eliminación.

2. Metodología experimental.

El estudio se desarrolló en 2 etapas experimentales.

Primera etapa. Estudio del efecto del bloqueo del canal mitoKATP sobre el acondicionamiento tardío por ejercicio (1era hipótesis secundaria).

1er artículo: Parra VM, Macho P, Domenech RJ. Late cardiac preconditioning by exercise in dogs is mediated by mitochondrial potassium channels. J Cardiovasc Pharmacol 2010; 56: 268-274.

Late Cardiac Preconditioning by Exercise in Dogs Is Mediated by Mitochondrial Potassium Channels

Victor M. Parra, MD, Pilar Macho, MD, and Raúl J. Domenech, MD

Abstract: We previously showed that exercise induces myocardial preconditioning in dogs and that early preconditioning is mediated through mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. We decided to study if late preconditioning by exercise is also mediated through these channels. Forty-eight dogs, surgically instrumented and trained to run daily, were randomly assigned to 4 groups: (1) Nonpreconditioned dogs: under anesthesia, the coronary artery was occluded during 1 hour and then reperfused during 4.5 hours. (2) Late preconditioned dogs: similar to group 1, but the dogs run on the treadmill for 5 periods of 5 minutes each, 24 hours before the coronary occlusion. (3) Late preconditioned dogs plus 5-hydroxydecanoate (5HD): similar to group 2, but 5HD was administered before the coronary occlusion. (4) Nonpreconditioned dogs plus 5HD: similar to group 1, but 5HD was administered before the coronary occlusion. Infarct size (percent of the risk region) decreased by effect of exercise by 56% ($P < 0.05$), and this effect was abolished with 5HD. 5HD by itself did not modify infarct size. Exercise did not induce myocardial ischemia, and the hemodynamics during ischemia-reperfusion period did not differ among groups. These effects were independent of changes in collateral flow to the ischemic region. We concluded that late cardiac preconditioning by exercise is mediated through mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels.

Key Words: preconditioning, exercise, mitoK_{ATP} channel, myocardial infarction

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2010;56:268–274)

INTRODUCTION

Ischemic preconditioning, as described by Murry et al¹ in 1986, is a mechanism by which brief periods of ischemia, called “preconditioning ischemia,” produce protection against subsequent longer ischemic periods.

Received for publication February 23, 2010; accepted June 2, 2010.
From the Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
Supported by Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (FONDECYT) grant 1030446.

No funding received from any of the following organizations: National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, and other(s).

The authors report no conflicts of interest.
Reprints: Raúl J. Domenech, MD, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina Universidad de Chile, Casilla 16038, Avenida Salvador 486 (Providencia), Santiago 9, Chile (e-mail: rdomenech@med.uchile.cl).
Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

268 | www.jcvp.org

J Cardiovasc Pharmacol™ • Volume 56, Number 3, September 2010

The preconditioning effect of increasing myocardial O₂ consumption without ischemia, with tachycardia^{2–7} or exercise,^{8,9} has also been described. This preconditioning effect is mediated through similar pathways as ischemic preconditioning, including adenosine receptors and mitochondrial adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K⁺ (mitoK_{ATP}) channels.^{2,4,9} Apart from the cardioprotection afforded by mitoK_{ATP} channel openers such as diazoxide,¹⁰ several preconditioning stimuli like ischemia,^{11,12} tachycardia,^{4,5} exercise,⁹ agonists of adenosine receptors,^{13,14} and opioids δ 1¹⁵ activate mitoK_{ATP} channels. Opening of these channels act as triggers^{16–18} or mediators and possible as effectors^{17–21} of the protection.

We previously showed that exercise induces early preconditioning (EP) and late preconditioning (LP) on the size of myocardial infarction in dogs⁹ and that EP and preconditioning by tachycardia⁴ are mediated through mitoK_{ATP} channels.^{4,9} However, the participation of mitoK_{ATP} channels as a mediator in LP by exercise has not been assessed.

We decided to study if LP by exercise is mediated by mitoK_{ATP} channels. We conducted our study in dogs and assessed if LP on infarct size was abolished with the mitoK_{ATP} blocker, 5-hydroxydecanoate (5HD).

MATERIALS AND METHODS

This investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

Surgery

Fifty-six mongrel dogs between 20 and 25 kg were instrumented under aseptic surgery. Briefly, under anesthesia with pentobarbital (30 mg/kg, intravenously [IV]) and mechanical ventilation of the lungs, the thorax was opened at the fifth intercostal space, and sylvatic catheters were implanted into the aortic root through its wall, into the coronary sinus through the great coronary vein and into the left atrium through its appendage.⁹ An occluder (plastic snare) was implanted around the anterior descending coronary artery immediately distal to the emergence of the first diagonal branch. The tubings and the snare were tunneled out of the thoracic cavity through the subcutaneous tissue and its proximal ends kept under the skin in the interscapular region. Prophylactic antibiotics were given during surgery. For 2–3 days after surgery, analgesia with morphine (IV) and anti-inflammatory analgesics was maintained according to requirements. After complete recovery from surgery, dogs were trained in the laboratory during 2 weeks to allow them to become accustomed to run on

a treadmill at a speed of 5–9 km/h during 5 minutes, twice a day. The rest of the day, the dogs were kept in comfortable cages at about 22°C. Three dogs died during surgery, and 5 dogs died a few days afterward because of different complications of surgery. Therefore, 48 dogs were randomly assigned to the following 4 experimental groups 15–20 days after surgery (Fig. 1):

- Group 1: Not preconditioned dogs (NP, n = 14). The dogs were allowed to rest for 60 minutes in the laboratory, and then, they were anesthetized with intravenous pentobarbital (30 mg/kg), and the anterior descending coronary artery was occluded with the plastic snare during 1 hour and reperfused during 4.5 hours.
- Group 2: LP by exercise (LP, n = 12). Same procedure as in group NP was followed, but dogs were allowed to run on the treadmill 5 periods, 5 minutes each at 6 km/h with intervening 5-minute period of rest. Twenty-four hours after the exercise, the infarction was induced as in group NP.
- Group 3: LP plus 5HD (LP + 5HD, n = 12). Similar to group 2, but $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channels were blocked with 5HD 10 mg/kg IV administered 20 minutes before coronary occlusion.
- Group 4: 5HD in not preconditioned dogs (NP + 5HD, n = 10). In not preconditioned dogs like group NP, 5HD was administered at a time equivalent to that in group 3. This group was the control for group 3 to determine the effects of 5HD on myocardial ischemia without preconditioning.

To obtain a stable preparation and comparable hemodynamic conditions among groups, aortic pressure changes were damped by connecting the systemic arterial circulation, through the brachiocephalic trunk, to a large reservoir filled with homologous, heparinized, and constantly stirred blood that is thermoregulated to 37°C.² The height of the reservoir was frequently adjusted to maintain a mean arterial pressure of about 100 mm Hg in the aortic root during the experiments.

We previously showed that this procedure together with the induction of a small infarct size (less than 10% of the left ventricular free wall volume) prevented from excessive distension of the ischemic region and severe left ventricular failure.²

Aortic pressure and heart rate were continuously recorded during rest, exercise, and experiments in a Nihon Kohden physiograph. Aortic pressure was measured with an extracorporeal transducer Statham P23Db.

In all experiments, normal values of partial pressure of O₂, CO₂, and pH in arterial blood were maintained using

controlled mechanical ventilation and sodium bicarbonate IV according to pH and base excess analysis.

Infarct Size and Risk Region Measurements

The size of the infarction relative to the risk region was measured with the triphenyltetrazolium staining technique.² After the experiments, the right coronary artery and the circumflex coronary artery were perfused from the aorta with a solution of Evans blue dye in saline. The anterior descending coronary artery was perfused from the place where it had been ligated, with a solution of 1% triphenyltetrazolium chloride. The perfusions were done simultaneously at a pressure of 90 mm Hg. After perfusion, the left ventricle was cut into slices of approximately 8 mm thickness parallel to the atrioventricular groove. The slices were incubated for 10 minutes in a 1% solution of triphenyltetrazolium. In each slice, the volumes of the nonrisk zone, risk zone, and necrotic zone (stained blue, red, and not stained, respectively) were obtained by measuring with planimetry the corresponding areas on the cross surface of the slice and multiplying them by the thickness of the slices. These volumes were added across the slices to obtain the corresponding total volumes of the 3 regions. The magnitude of the infarction was expressed by the volume of the necrotic region as percent of the volume of the risk region. The risk region was expressed as percent of the total left ventricular volume.

Measurement of Myocardial Flow to the Ventricular Wall

Myocardial blood flow to the left ventricular wall was measured with the radioactive microspheres technique as previously described² during the last period of exercise and after recovery in all preconditioned dogs and before the coronary occlusion in nonpreconditioned dogs. Myocardial O₂ consumption was calculated as the product of myocardial flow times the coronary arteriovenous difference in O₂ content (between aortic root and coronary sinus blood samples). Coronary arteriovenous difference in lactate content was also measured. Collateral flow to the ischemic left ventricular wall, 30 minutes into the ischemic period, was also measured with the microspheres technique. We used carbonized plastic microspheres (15 ± 5 μm in diameter, New England Nuclear) labeled with ⁴⁶Sc, ⁸⁵Sr or ⁵⁷Co suspended in isotonic saline and 0.01% Tween 80 and ultrasonicated. The microspheres were placed in a plastic chamber (1-mL-volume capacity),

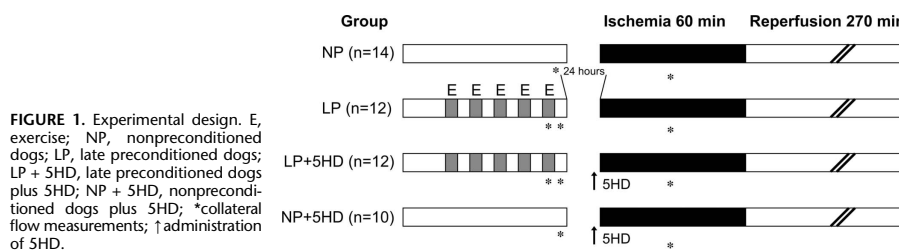


FIGURE 1. Experimental design. E, exercise; NP, nonpreconditioned dogs; LP, late preconditioned dogs; LP + 5HD, late preconditioned dogs plus 5HD; NP + 5HD, nonpreconditioned dogs plus 5HD; *collateral flow measurements; †administration of 5HD.

magnetically stirred for about 20–30 seconds. A reference flow sample (10 mL/min) was simultaneously obtained from the brachial artery (or aortic root for measurements during exercise) during 1.5 minutes.²² After the experiments, transmural pieces of the left ventricular wall were obtained from the center of the ischemic region. Each sample was weighed, and its radioactivity (Cm) and the radioactivity of the blood collected from the reference samples (Cr) were measured in a gamma spectrometer equipped with a multichannel analyzer (Packard Auto Gamma 5500). Regional collateral flow (Qm) was calculated as $Qm = Qr \times Cm \times Cr^{-1}$, where Qr is the flow rate of the reference sample. Flow values are expressed per gram of tissue.

Exclusion Criteria

To avoid differences in the degree of myocardial ischemia among groups, we discarded dogs in which more than 2 attempts were needed for electrical defibrillation and dogs in which collateral blood flow to the ischemic region was superior to $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Comparison of hemodynamic and metabolic variables and infarct size among groups were tested with 2-way analysis of variance for repeated measurements and Kruskal–Wallis test as appropriate followed by Dunn analysis. Hemodynamic and metabolic effects of exercise were assessed with paired *t* test. The effect of coronary collateral flow to the ischemic region on the difference of infarct size among the groups was assessed with analysis of covariance. The null hypothesis was discarded with $P < 0.05$. The α error (2 tail) was set at 0.05 and type II error at 0.2. According to the main hypothesis and previous results,^{2,9} we assumed a significant reduction in infarct size of 40% to be detected, with SD of 9%. The number of experiments required with these assumptions was 14 dogs per group.^{23,24} We used Stata 9.0 as statistical program for statistical analysis.

RESULTS

Seven dogs were discarded during the experiments because of more than 3 episodes of ventricular fibrillation: 2 dogs in groups 1, 2, and 3 each; 1 dog in group 4. Seven dogs were discarded after the experiments because of collateral blood flow to the ischemic region above $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$: 2 dogs in group 1; 1 dog in groups 2 and 4 each; 3 dogs in group 3. Therefore, the results are presented for 34 dogs.

Table 1 shows the hemodynamic and metabolic effects of exercise in preconditioned dogs. During exercise, there was a significant increase in heart rate (50%), mean aortic pressure (19%), coronary flow (61%), and myocardial O₂ consumption (62%). There were no significant changes in coronary arteriovenous differences of O₂ and lactate content during exercise. Arteriovenous difference in lactate content was $0.17 \pm 0.16 \text{ mmol/L}$ at rest and $0.21 \pm 0.10 \text{ mmol/L}$ during exercise. Coronary venous lactate content was $1.33 \pm 0.15 \text{ mmol/L}$ at rest and $1.37 \pm 0.15 \text{ mmol/L}$ during exercise (nonsignificant). No repolarization changes were observed in the electrocardiogram during exercise.

Table 2 shows the hemodynamic variables in anesthetized dogs during baseline, ischemia, and reperfusion. There were no significant alterations across these periods or among the groups. The administration of 5HD did not induce any hemodynamic change.

Figure 2 shows the effects of exercise on infarct size in all the groups. Exercise decreased infarct size by 56%, from $27.6\% \pm 11.8\%$ in the nonpreconditioning group to $12.1\% \pm 4.1\%$ in the LP group ($P < 0.05$). The effect of LP was abolished by the administration of 5HD. The drug by itself did not modify the infarct size. These effects were independent of the collateral flow to the ischemic region (covariance, $P < 0.05$, not shown). There were no significant differences among groups in risk region volumes as percent of the left ventricular wall volumes ($47.1\% \pm 2.1\%$, $46.3\% \pm 2.8$, $48.7\% \pm 2.0\%$, and $45.4\% \pm 3.1\%$, for groups 1–4, respectively) or in left ventricular wall volumes (80.2 ± 9.0 , 75.7 ± 6.2 , 82.7 ± 5.3 , and $79.3 \pm 8.7 \text{ cm}^3$ for groups 1–4, respectively).

DISCUSSION

The present study confirms our previous results in the sense that exercise induces LP with a substantial decrease of the myocardial infarct size induced by coronary occlusion in dogs.⁹ Besides, the present results show that this protecting effect of exercise can be completely prevented by blocking mitoK_{ATP} channels with 5HD, although 5HD by itself (in the absence of preconditioning) did not modify the infarct size. This result suggests that this kind of preconditioning is mediated by the opening of these channels.

This protective effect cannot be explained by hemodynamic changes during ischemia and reperfusion because these parameters were not significantly different among the groups and the magnitude of exercise and myocardial O₂ consumption was of similar magnitude in both groups. These results cannot be attributed either to changes in collateral blood flow to the

TABLE 1. Hemodynamics and Metabolic Effects of Exercise in Dogs (n = 16)

	HR (c/min)	MAP (mm Hg)	CF (mL·min ⁻¹ ·g ⁻¹)	MVO ₂ (mL·min ⁻¹ ·100 g ⁻¹)	AVO ₂ (mL/100 mL)	AV lactate (mmol/L)
Basal	107.8 \pm 5.8	98.1 \pm 3.9	0.44 \pm 0.14	7.9 \pm 2.0	12.2 \pm 3.8	0.17 \pm 0.16
Exercise	158.2 \pm 4.0*	113.0 \pm 5.4*	0.71 \pm 0.20*	12.8 \pm 2.9*	13.1 \pm 4.0	0.21 \pm 0.10

Values are mean \pm standard error of the mean.

* $P < 0.05$, versus baseline.

AVlactate, coronary arteriovenous difference of lactate; AVO₂, coronary arteriovenous difference in oxygen content; c/min, cycles/min; CF, coronary blood flow; HR, heart rate; MAP, mean aortic pressure; MVO₂, myocardial oxygen consumption.

TABLE 2. Hemodynamic Variables

		Ischemia			Reperfusion		
		Baseline	30 min	60 min	60 min	120 min	180 min
HR (c/min)	C	127 ± 6	148 ± 12	151 ± 13	148 ± 11	144 ± 14	134 ± 10
	P	124 ± 11	127 ± 8	130 ± 11	130 ± 9	130 ± 6	129 ± 15
	P + 5HD	125 ± 9	146 ± 8	158 ± 5	157 ± 7	142 ± 9	146 ± 5
	C + 5HD	139 ± 5	134 ± 7	137 ± 7	127 ± 9	125 ± 12	129 ± 13
SAP (mm Hg)	C	118 ± 14	116 ± 11	124 ± 13	128 ± 12	122 ± 16	128 ± 14
	P	117 ± 9	112 ± 5	127 ± 7	126 ± 7	115 ± 7	117 ± 7
	P + 5HD	119 ± 5	123 ± 6	128 ± 9	132 ± 10	129 ± 10	131 ± 10
	C + 5HD	112 ± 5	108 ± 8	115 ± 10	127 ± 10	119 ± 10	117 ± 11
DAP (mm Hg)	C	84 ± 7	83 ± 10	86 ± 9	85 ± 8	82 ± 8	86 ± 7
	P	82 ± 8	89 ± 5	89 ± 1	96 ± 5	91 ± 5	87 ± 5
	P + 5HD	88 ± 4	88 ± 4	91 ± 4	95 ± 6	93 ± 5	91 ± 6
	C + 5HD	80 ± 8	78 ± 7	88 ± 8	88 ± 8	91 ± 8	83 ± 7

Values are mean ± standard error of the mean.
c/min, cycles/min; DAP, diastolic aortic pressure; HR, heart rate; SAP, systolic aortic pressure.

ischemic myocardium or to differences in risk region sizes. Finally, the absence of changes in the arteriovenous difference of O₂ and lactate and in the ventricular repolarization during exercise discards that myocardial ischemia occurred during exercise and thereby that preconditioning was induced by ischemia. However, we may not discard the mediation of several metabolites that are released during exercise, like adenosine,²⁵ bradykinin,^{25,26} opioids,^{27,28} nitric oxide,²⁹ and reactive oxygen species (ROS),³⁰⁻³² those might activate the metabolic pathway through which preconditioning is produced, in a way similar to that described during classical

preconditioning and preconditioning by tachycardia.^{2,4,5,9,33,34} Besides, we cannot rule out the participation of remote preconditioning from exercising skeletal muscle. However, based on the fact that electrically induced tachycardia in anesthetized dogs by itself induces preconditioning,^{2,6} it is reasonable to think that the protective effect of exercise is partly mediated by the increase in myocardial metabolic rate.

Our results also confirm the magnitude of the protective effect of LP (56% reduction in infarct size), that is smaller than that previously described for the early protection in anesthetized dogs (75%), even though the size of the risk zone and the magnitude of myocardial oxygen consumption were similar to those of our previous study.⁹ This difference between EP and LP has also been described previously³⁵ and could be ascribed to the time selected for the assessment of the late effect. According to the study by Yamashita et al,⁸ exercise in rats provides a protection against myocardial infarction according to the time after the preconditioning maneuver elected to assess the protection, with a larger protective effect at 0.5 and 48 hours after. Apart from the involvement in EP, different studies suggest that mitoK_{ATP} channels also play a key role in delayed preconditioning generated from different stimuli, mainly pharmacologic¹² and ischemic.¹² Diazoxide induces late protection by opening mitoK_{ATP}, an effect that is abolished by 5HD.^{12,36,37} Delayed ischemic preconditioning is also mediated by mitoK_{ATP}, a protection that is abolished by 5HD given before index ischemia.¹² To our knowledge, the current study is the first showing the involvement of mitoK_{ATP} channels in delayed preconditioning induced by exercise.

We have reported that preconditioning by exercise and tachycardia are mediated by the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) oxidase and ryanodine receptors^{33,34} and that NADPH oxidase blockade abolishes the cardioprotection.³⁴ Adrenergic stimulation during exercise might be responsible for NADPH oxidase activation³⁹ and consequently an increase in the generation of ROS, which, in turn, would activate mitoK_{ATP} via protein kinase C (PKC).¹⁸ In this regard, whatever the

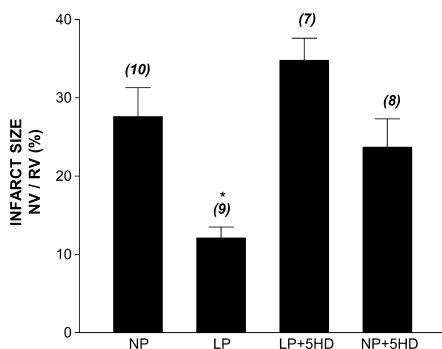


FIGURE 2. Infarct size expressed by the necrotic volume (NV) as a percentage of the risk volume (RV) of the left ventricular wall. NP, nonpreconditioned dogs; LP, late preconditioned dogs; LP + 5HD, late preconditioned dogs plus 5HD; NP + 5HD, nonpreconditioned dogs plus 5HD. Numbers in parentheses represent number of dogs. Values are mean ± standard error of the mean. *P < 0.05 versus NP, by Kruskal–Wallis test followed by Dunn analysis.

initial stimuli may be, diverse signaling pathways have been shown to converge upon the mitochondria, throughout the activation of the mitoK_{ATP} channel and the inhibition of the mitochondrial permeability transition pore.^{18,40} In fact, cardiac mitoK_{ATP} channels are involved as triggers^{16,17} and/or as mediators and possible effectors^{17,19–21} of the protection during preconditioning. The hypothesized mechanisms for the activation of mitoK_{ATP} channel-mediated cardioprotection are (1) a slight reduction of the mitochondrial membrane potential produced by mitochondrial K⁺ influx, which would prevent mitochondrial Ca²⁺ overload during ischemia⁴¹; and (2) an increase in mitochondrial matrix volume,⁴² which would decrease ATP inflow into the mitochondria during ischemia, reducing ATP consumption (by the reverse mode of the mitochondrial F₁F₀-ATPase) in replacing mitochondrial membrane potential.⁴³ In addition, the activation of mitoK_{ATP} channel will release small levels of ROS,^{16,35} which may further amplify the cardioprotection signaling.¹⁸ Therefore, the increased mitochondrial K⁺ influx contributes to the cardiomyocyte defense against ischemia and reperfusion.^{18,44}

Even though EP and LP by exercise are mediated by mitoK_{ATP} channels, the dose of 5HD needed to revert the LP effect in this study was 40% larger than that to revert the EP protection in our previous report (10 vs. 7 mg/kg).⁹ Pilot experiments in our laboratory showed that 7 mg/kg of 5HD failed to block the protective effect of LP by exercise (data not shown). Sato et al⁴⁵ showed that the dose needed to block mitoK_{ATP} channels in myocytes exposed to PKC activator was 4 times higher than that without the use of the PKC activator. In addition, Wang et al,¹⁷ in the isolated heart model, showed that the 5HD concentration needed to block the protective effect was 4 times higher if the blocker was administered before prolonged ischemia versus before preconditioning stimulus. These results suggest that the phosphorylated channel, pharmacologically or by preconditioning stimulus, is more resistant to the activity of the blocker. The phosphorylated mitoK_{ATP} channel might open earlier, with higher open probability and more resistant to be blocked.⁴⁵

In many previous studies in isolated hearts and animals, the role of mitoK_{ATP} channels has been assessed by the use of drugs with antagonistic effects on mitoK_{ATP} channels, such as diazoxide and 5HD,^{10,46} and particularly by the ability of 5HD as a specific blocker of mitoK_{ATP} channels.¹⁸ Although the mitoK_{ATP}-selective openers, as diazoxide, are cardioprotective,^{10,47,48} the mitoK_{ATP} blocker 5HD blocks the protection afforded by mitoK_{ATP} channel openers,^{10,48} ischemic preconditioning,¹⁹ and postconditioning.⁴⁹ Diazoxide is about 1000 times more potent in opening mitoK_{ATP} channel than sarcolemmal K_{ATP} channel,^{10,50} whereas 5HD inhibits mitoK_{ATP} channels with little effect on sarcolemmal channels.^{10,45,51} The main limitation of our study is the assumption that 5HD is a specific inhibitor of mitoK_{ATP} channels, not considering other possible effects of the drug. Recent studies suggest that 5HD has complex effects on mitochondrial energy metabolism different from its action on mitoK_{ATP} channel,^{44,52–54} questioning the general assumption that the blockade of cardioprotection by 5HD is a proof of the involvement of mitoK_{ATP} channel and discarding other possible mechanisms involved in the protection. In this line,

the study by Lascano et al⁵⁴ in a conscious sheep model reported that 5HD and diazoxide, 2 drugs with antagonistic effects on mitoK_{ATP} channels,³⁶ had similar protective effects against stunning, suggesting that mechanisms other than mitochondrial channels would explain these protective effects. Because the molecular mechanism of mitoK_{ATP} channel blockade by 5HD is not currently known and the fact that glibenclamide inhibits mitoK_{ATP} channel, although not specifically, additional studies including this last drug should be considered. Nonetheless, the previous reports mentioned above, which used both glibenclamide and 5HD in their experiments,^{10,19,49,51} support the blocking effect of 5HD on the mitoK_{ATP} channels and therefore support our results.

It is well known that the incidence of acute myocardial infarction is less in individuals who practice moderate or intense physical activity regularly.^{55,56} It is reasonable to think that exercise would increase the resistance to myocardial ischemia through the induction of preconditioning state, LP especially.^{8,9} Myocardium would be continuously preconditioned against ischemia according to the magnitude and frequency of physical activity. Recent studies suggest that the heart can be put in a preconditioning state with continuous administration of mitoK_{ATP} channel openers.^{57,58} In our study, the protective effect of the exercise was dependent of the mitoK_{ATP} channel opening during indexed ischemia. The reinduction of this protection might maintain these channels activated or phosphorylated, keeping myocardium in a state of higher resistance to prolonged ischemia, similar to hearts exposed to chronic hypoxia.⁵⁹ Similarly, studies in isolated hearts⁶⁰ and in vivo⁶¹ have showed prolonged cardioprotective effect with repeated pharmacologic or physiologic (exercise) stimulus. Thus, if exercise induces LP and is mediated by mitoK_{ATP} channels, we propose that the advantage of exercise consists in the possibility to induce sustained longer preconditioning, called chronic preconditioning, in a physiological manner through regular physical activity. In summary, our results show that LP against myocardial infarction induced by exercise in dogs is mediated by mitoK_{ATP} channels.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Juan Carlos Fuenzalida, Guillermo Arce, and Rodrigo Durán is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74:1124–1136.
2. Domenech RJ, Macho P, Vélez D, et al. Tachycardia preconditions infarct size in dogs. Role of adenosine and protein kinase C. *Circulation*. 1998; 97:786–794.
3. Domenech RJ, Macho P. Non-ischemic myocardial preconditioning. *Mol Cell Biochem*. 1998; 186:201–203.
4. Macho P, Solís E, Sánchez G, et al. Mitochondrial ATP dependent potassium channels mediate non-ischemic preconditioning by tachycardia in dogs. *Mol Cell Biochem*. 2001; 216:129–136.
5. Koning MM, Gho BCG, van Klaarwater E, et al. Rapid ventricular pacing produces myocardial protection by nonischemic activation of ATP potassium channels. *Circulation*. 1996; 93:178–186.
6. Domenech R, Sánchez G, Donoso P, et al. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35:1429–1437.

7. Lucats L, Chalvignac V, Bizé A, et al. Rapid ventricular pacing induces delayed cardioprotection against myocardial stunning. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:849–855.
8. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, et al. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med.* 1999;189:1699–1706.
9. Domenech RJ, Macho P, Schwarze G, et al. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res.* 2002;55:561–566.
10. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovsky V, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 1997;81:1072–1082.
11. Bernardo NL, D'Angelo M, Okubo S, et al. Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart. *Am J Physiol.* 1999;276:H1323–H1330.
12. Takano H, Tang X-L, Bolli R. Differential role of KATP channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol.* 2000;279:H2350–H2359.
13. Bernardo NL, Okubo S, Maatich MM, et al. Delayed preconditioning with adenosine is mediated by opening of ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit heart. *Am J Physiol.* 1999;277:H128–H135.
14. Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, et al. Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. A key step in ischemic preconditioning? *Circulation.* 2000;102:800–805.
15. Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, et al. Opioid-induced second window of cardioprotection. Potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ Res.* 1999;84:846–851.
16. Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioning state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000;87:460–466.
17. Wang S, Cone J, Liu Y, Dual roles of mitochondrial KATP channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H246–H255.
18. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008;88:581–609.
19. 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.
20. Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. Mitochondrial KATP channel opening is important during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic preconditioning rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:831–834.
21. Wang Y, Kudo M, Xu M, et al. Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:2037–2046.
22. Domenech RJ, Macho P, González R, et al. Effect of endothelin on total and regional coronary resistance and on myocardial contractility. *Eur J Pharmacol.* 1991;192:409–416.
23. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences.* 2nd ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates; 1988:1–74, 179–213.
24. Glantz S. What Does “Not Significant” Really Mean? In *Primer of Biostatistics.* 5th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2002: 164–198.
25. Langberg H, Bjorn C, Boushel R, et al. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *J Physiol.* 2002;542:977–983.
26. Blais C, Adam A, Massicotte D, et al. Increase in blood bradykinin concentration after eccentric weight-training exercise in men. *J Appl Physiol.* 1999;87:1197–1201.
27. Dickson EW, Hogrefe CP, Ludwig PS, et al. Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H402–H408.
28. Hull SS Jr, Vanoli E, Adamson PB, et al. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation.* 1994;89:548–552.
29. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 2000;87:972–983.
30. Salo DC, Donovan CM, Davies KJ. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress protein are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med.* 1991;11:239–246.
31. Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, et al. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem.* 1992;111:109–115.
32. Lennon SL, Quindry JC, French JP, et al. Exercise and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand.* 2004;182:161–169.
33. Sánchez G, Pedrozo Z, Domenech RJ, et al. Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:982–991.
34. Sánchez G, Escobar M, Pedrozo Z, et al. Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2008;77:380–386.
35. Yellon D, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83:1113–1151.
36. Takashi E, Wang Y, Ashraf M. Activation of mitochondrial KATP channel elicit late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res.* 1999;85:1146–1153.
37. Ockaili R, Emani VR, Okubo S, et al. Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999;277:H2425–H2434.
38. Wang X, Fisher PW, Xi L, et al. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:105–113.
39. Isabelle M, Monteil C, Moritz F, et al. Role of alpha1-adrenoreceptors in cocaine-induced NADPH oxidase expression and cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2005;67:699–704.
40. Garlid KD, Costa ADT, Quinlan CS, et al. Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:858–866.
41. Murata M, Akao M, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 2001;89:891–898.
42. Costa ADT, Quinlan CL, Andrukhiv A, et al. The direct physiologic effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H406–H415.
43. Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, et al. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2004; 95:734–741.
44. Hanley PJ, Daut J. K_{ATP} channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K_{ATP} channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:17–50.
45. Sato T, O'Rourke B, Marbán E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ Res.* 1998;83:1110–1114.
46. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res.* 2004;94:420–432.
47. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Garlid KD, et al. Pharmacologic characterization of BMS-191095, a mitochondrial K_{ATP} opener with no peripheral vasodilator or cardiac action potential shortening activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:1184–1192.
48. Pasdois P, Beauvoit B, Tariosse L, et al. Effect of diazoxide on flavoprotein oxidation and reactive oxygen species generation during ischemia-reperfusion: a study on Langendorff-perfused rat hearts using optic fibers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H2088–H2097.
49. Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1103–1110.
50. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovsky V, et al. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* 1996; 271:8796–8799.
51. McCullough J, Normandin D, Conder M, et al. Specific block of the anti-ischemic actions of cromakalim by sodium 5-hydroxydecanoate. *Circ Res.* 1991;69:949–958.
52. Hanley PJ, Drose S, Brandt U, et al. 5-Hydroxydecanoate is metabolized in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. *J Physiol.* 2005;562(pt 2):307–318.
53. Lim KH, Javadov SA, Das M, et al. The effects of ischemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart, mitochondrial volume and respiration. *J Physiol.* 2002;545:961–974.
54. Lascano EC, Negroni JA, del Valle HF. Early preconditioning protection against stunning in conscious sheep. Role of KATP channels. *Mol Cell Biochem.* 2009;331:247–257.
55. Mittleman MA, Maclure M, Tofler GH, et al. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of myocardial infarction onset study investigators. *N Engl J Med.* 1993;329:1677–1683.

56. Willich SN, Lewis M, Lowel H, et al. Physical exertion as a trigger of acute myocardial infarction. Triggers and mechanisms of myocardial infarction study group. *N Engl J Med*. 1993;329:1684-1690.
57. Wang Y, Haider HK, Ahmad N, et al. Mechanisms by which KATP channel openers produce acute and delayed cardioprotection. *Vasc Pharmacol*. 2005;42:253-264.
58. Steensrud T, Nordhaug D, Husnes KV, et al. Replacing potassium with nicorandil in cold St. Thomas' Hospital cardioplegia improves preservation of energetics and function in pig hearts. *Ann Thorac Surg*. 2004; 77:1391-1397.
59. Eells JT, Henry MM, Gross GJ, et al. Increased mitochondrial KATP channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? *Circ Res*. 2000;87:915-921.
60. Dana A, Baxter GF, Walker JM, et al. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1142-1149.
61. Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, et al. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:826-831.

Segunda etapa. Estudia la participación del ión Ca^{2+} en el acondicionamiento por ejercicio, en dos aspectos:

a) como iniciador del acondicionamiento, mediante el estudio del efecto sobre el tamaño del infarto del bloqueo de canales de Ca^{2+} del sarcolema sobre el PP y PT (Protocolo 2, hipótesis y objetivo principal).

b) como iniciador de la activación de NADPH oxidasa, mediante el estudio del efecto del bloqueo de canales de Ca^{2+} del sarcolema sobre la activación de esta enzima en el PP (Protocolo 3, 2da hipótesis secundaria).

2do artículo: Parra VM, Macho P, Sánchez G, Donoso P, Domenech RJ. Exercise preconditioning of myocardial infarct size in dogs is triggered by calcium. J Cardiovasc Pharmacol 2015; 65: 276-281.

Exercise Preconditioning of Myocardial Infarct Size in Dogs Is Triggered by Calcium

Victor M. Parra, MD, Pilar Macho, MD, Gina Sánchez, PhD, Paulina Donoso, PhD,
and Raúl J. Domenech, MD

Abstract: We showed that exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs and that these effects are mediated through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) oxidase activation. As the intracoronary administration of calcium induces preconditioning and exercise enhances the calcium inflow to the cell, we studied if this effect of exercise triggers exercise preconditioning independently of its hemodynamic effects. We analyzed in 81 dogs the effect of blocking sarcolemmal L-type Ca^{2+} channels with a low dose of verapamil on early and late preconditioning by exercise, and in other 50 dogs, we studied the effect of verapamil on NADPH oxidase activation in early exercise preconditioning. Exercise reduced myocardial infarct size by 76% and 52% (early and late windows respectively; $P < 0.001$ both), and these effects were abolished by a single low dose of verapamil given before exercise. This dose of verapamil did not modify the effect of exercise on metabolic and hemodynamic parameters. In addition, verapamil blocked the activation of NADPH oxidase during early preconditioning. The protective effect of exercise preconditioning on myocardial infarct size is triggered, at least in part, by calcium inflow increase to the cell during exercise and, during the early window, is mediated by NADPH oxidase activation.

Key Words: preconditioning, exercise, calcium, myocardial infarction
(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2015;65:276–281)

INTRODUCTION

We previously showed that exercise induces early preconditioning (EP) and late preconditioning (LP) on the myocardial infarct size (IS) induced by coronary occlusion in dogs¹ and that these effects are mediated through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) oxidase activation and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels.^{2,3} However, the triggering for this kind of preconditioning is not known. Because

Received for publication July 27, 2014; accepted November 4, 2014.
From the Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Supported by Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (FONDECYT), grants 1030449 and 1030446, and by Fondo de Áreas Prioritarias (FONDAP), Center for Molecular Studies of the Cell, 15010006 from Chile.

The authors report no conflicts of interest.

Reprints: Raúl J. Domenech, MD, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Casilla 16038, Avenida Salvador 486 (Providencia), Santiago 9, Chile (e-mail: rdomenec@med.uchile.cl).
Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

276 | www.jcvc.org

intracoronary administration of Ca^{2+} induces preconditioning^{4–6} and this protection can be blocked by verapamil^{5,6} and the activation of α -adrenoceptors and β -adrenoceptors during exercise⁷ increases Ca^{2+} inflow to the cell,^{8–10} we reasoned that this increase of Ca^{2+} inflow triggers exercise preconditioning. As catecholamine-induced increase in intracellular calcium is experimentally inhibited by verapamil,⁹ a nondihydropyridine sarcolemmal L-type Ca^{2+} channel blocker,¹¹ we studied if EP and LP induced by exercise are prevented by the administration of verapamil before exercise (VE). Furthermore, as calcium, and more specifically the calcium-sensing receptor, has been involved as a mediator in cardiac ischemic preconditioning independently of its hemodynamic effects,^{12,13} we used a single low dose of verapamil, which did not modify the cardiac hemodynamic effect of exercise, to test the hypothesis that the increase of Ca^{2+} inflow to the cell during exercise triggers the cardioprotection independently of its hemodynamic effects.

We also recently showed that EP by exercise increases NADPH oxidase activity and that its inhibition with apocinin reverts the protective effect of exercise on myocardial IS.² To assess if calcium is involved in this activation, we additionally studied the effect of verapamil on NADPH oxidase activation in early exercise preconditioning.

METHODS

This investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by our institutional animal care and use committee.

We followed 2 experimental protocols:

Protocol 1: Effect of Verapamil on the Preconditioning Effect of Exercise on IS

Eighty-six mongrel dogs were instrumented under aseptic surgery. Briefly, under anesthesia with intravenous (IV) pentobarbital (30 mg/kg) and mechanical ventilation of the lungs, the thorax was opened at the fifth left intercostal space, and Silastic catheters were implanted into the aortic root through its wall, into the coronary sinus through the great coronary vein, and into the left atrium through its appendage. An occluder (plastic snare) was implanted around the anterior descending coronary artery immediately distal to the emergence of the first diagonal branch. Epicardial pacing electrodes were sutured in the outflow tract of the right ventricle to

J Cardiovasc Pharmacol™ • Volume 65, Number 3, March 2015

control heart rate. The tubings, wires, and the snare were tunneled out of the thoracic cavity through the subcutaneous tissue, and their proximal ends kept under the skin in the interscapular region. Prophylactic antibiotics and analgesia were provided for a few days after surgery. After 2 weeks of recovery, dogs were trained in the laboratory during 2 additional weeks to allow them to become accustomed to run on a treadmill at a speed of 5–9 km/h for 5 minutes, twice a day. The rest of the day the dogs were kept in comfortable cages at about 22°C with food and water ad libitum. Three dogs died during surgery, and 2 dogs died a few days afterward because of different complications of surgery. Previously, in 10 other dogs, we determined the proper verapamil dose that did not induce significant hemodynamic changes and allowed dogs to run on the treadmill. Therefore, 81 dogs were randomly assigned to the following 6 experimental groups (Fig. 1):

1. Nonpreconditioned dogs (NP, N = 14): Dogs were allowed to rest for 60 minutes in the laboratory and then they were anesthetized (intravenous pentobarbital, 30 mg/kg). The anterior descending coronary artery was occluded with the plastic snare for 1 hour and reperused for 4.5 hours. To obtain a stable preparation and comparable hemodynamic conditions between groups, aortic pressure changes were damped by connecting the systemic arterial circulation, through the femoral artery, to a large reservoir filled with homologous, heparinized, and constantly stirred blood thermoregulated to 37°C. The height of the reservoir was frequently adjusted to maintain a mean arterial pressure of about 100 mm Hg in the aortic root during the experiments. Heart rate was kept constant at about 150 beats per minute by electrical stimulation. Dogs' rectal temperature was measured with an electric thermometer and maintained at about 37°C with a heater under the surface of the surgical table.

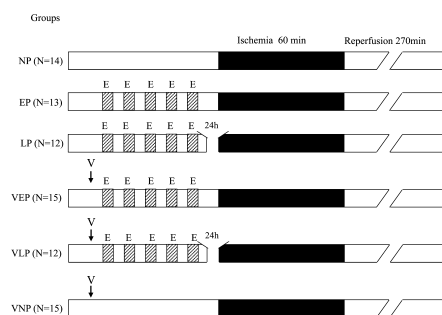


FIGURE 1. Protocol 1: experimental groups to study the effect of exercise and verapamil on IS. E, exercise; EP, dogs with early preconditioning; LP, dogs with late preconditioning; NP, nonpreconditioned dogs; VEP, verapamil before early preconditioning; VLP, verapamil before late preconditioning; VNP, verapamil in nonpreconditioned dogs.

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

2. EP by exercise (EP, N = 13): Same procedure as in group NP was followed, but dogs were allowed to run on the treadmill for 5 periods, 5 minutes each at 6 km/h with intervening 5-minute periods of rest. After the last exercise period, the animals rested for about 10 minutes to allow the heart rate and the aortic pressure to recover to basal values before inducing pacing at about 150 cycles per minute, connecting the arterial line with the reservoir and inducing the infarction as in group NP.
3. LP by exercise (LP, N = 13): Preconditioning was performed as in group EP, but infarct was induced 24 hours after the exercise.
4. Verapamil before EP (VEP, N = 15): Similar to group EP, but verapamil 0.15 mg/kg IV was administered about 5 minutes before exercise.
5. Verapamil before LP (VLP, N = 12): Similar to group LP, but verapamil 0.15 mg/kg IV was administered 5 minutes before exercise.
6. Verapamil in nonpreconditioned dogs (VNP, N = 15): Similar to group NP, but verapamil was administered at a time equivalent to group VEP. This group was a control for group VEP to determine the effects of verapamil on myocardial ischemia without preconditioning.

Aortic pressure and heart rate were continuously recorded during rest and exercise periods and during ischemia and reperfusion. Myocardial blood flow to the left ventricular wall was measured with the radioactive microsphere technique as previously described¹⁴ during the last period of exercise and after recovery in all preconditioned dogs and before the coronary occlusion in nonpreconditioned dogs. Myocardial O₂ consumption was calculated as the product of myocardial flow times the coronary arteriovenous difference in O₂ content (between aortic root and coronary sinus blood samples). Collateral flow to the ischemic left ventricular wall, 30 minutes into the ischemic period, was also measured with the microspheres technique. The size of the infarction relative to the risk region was measured with the triphenyltetrazolium staining technique.¹⁴ The magnitude of the infarction was expressed by the volume of the necrotic region as percent of the volume of the risk region. The risk region was expressed as percent of the total left ventricular volume.

Protocol 2: Effect of Exercise and Verapamil on NADPH Oxidase Activation

Fifty dogs, surgically instrumented and trained as indicated in the previous protocol, were randomly assigned to the following experimental groups to measure the activity of NADPH oxidase (Fig. 2):

1. Control (C, N = 19): After resting for 1 hour, the dogs were anesthetized (IV pentobarbital 30 mg/kg), the thorax was opened under mechanical ventilation of the lungs, and the heart was excised for analysis of the NADPH oxidase activity.
2. Exercise (E, N = 11): Dogs performed exercise as described above. After the last exercise period, the animals rested for 10 minutes to allow the heart rate and the aortic pressure to return to basal values, then they were

www.jcvp.org | 277

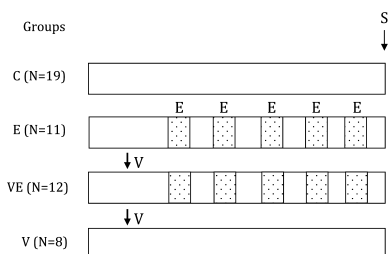


FIGURE 2. Protocol 2: experimental groups to study the effect of exercise and verapamil on NADPH oxidase activation. C, control; E, exercise; S, sampling; V, verapamil without exercise; VE, verapamil before exercise.

anesthetized, the lungs mechanically ventilated, and the heart excised for analysis.

- Verapamil before exercise (VE, N = 12): Similar to group E, but verapamil, 0.15 mg/kg, was administered 5 minutes before exercise.
- Verapamil (V, N = 8): As in group C, but verapamil, 0.15 mg/kg, was administered 1 hour before the animals were anesthetized for analysis.

Determination of NADPH Oxidase Activity

Superoxide production was measured by lucigenin chemiluminescence by incubating sarcoplasmic reticulum (SR) vesicles (0.2 mg/mL) in 100 mM MOPS-Tris, pH7.0, 100 μ M NADPH, and 5 μ M lucigenin at 25°C. Chemiluminescence was measured in a Berthold FB 12 luminometer and expressed as nanomoles of superoxide anion per milligram protein per minute. SR vesicles were isolated from the zone of the ventricular wall perfused by the anterior descending coronary artery as previously described in detail.¹⁵ SR fractions were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C . Protein content was determined by the method of Hartree.¹⁶

Statistical Analysis

Multiple comparisons were performed with analysis of variance followed by Holm *t* test analysis. To discard the effect of collateral flow to the ischemic region from the effect of the maneuvers on the IS, we regressed ISs on collateral flow values and compared these regressions with analysis of covariance (ANCOVA). Results are expressed as mean \pm SEM. The null hypothesis was discarded with a *P* value <0.05 .

Criteria for Exclusion

To avoid variability in the IS because of different exposure to ischemia during ischemia/reperfusion (IR) period, we used 2 exclusion criteria, a collateral flow to the ischemic region $>0.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and >3 consecutive attempts required to convert ventricular fibrillation.

278 | www.jcvp.org

RESULTS

Protocol 1: Effect of Verapamil on the Preconditioning Effect of Exercise on Myocardial IS

Of the 81 dogs randomized to this protocol, 8 were discarded because of the exclusion criteria (2 dogs in groups NP and VLP and 1 dog in groups VEP, LP, EP, and VNP). The results correspond to 73 dogs.

The hemodynamic evolution during baseline, ischemia, and reperfusion is depicted in Table 1. No significant differences were observed across these periods or among the groups. The administration of verapamil, both in preconditioned and in nonpreconditioned dogs, did not induce any hemodynamic change. As there were no differences in the hemodynamic evolution between EP and LP, with and without verapamil, both groups were considered together as 1 group. The regression of ISs, in the different groups, on the values of collateral flow to the ischemic region showed an independence of IS from collateral flow (ANCOVA, $P < 0.02$, not shown). There were no significant differences in myocardial risk size between groups; the risk size/total area expressed as percent were: 48.9 ± 2.2 , 47.7 ± 1.8 , 46.3 ± 2.4 , 49.8 ± 3.8 , 50.3 ± 4.5 , and 46.1 ± 5.8 for groups NP, EP, LP, VEP, VLP, and VNP, respectively ($P > 0.05$). Table 2 shows the hemodynamic and metabolic effects of exercise in preconditioned dogs (early and late) with and without verapamil. During exercise, there was a significant increase in heart rate (47%), mean aortic pressure (15%), coronary flow (61%), and myocardial O_2 consumption (62%) compared with basal, but no significant changes were observed in the arteriovenous difference of oxygen and lactate content. The electrocardiogram did not show repolarization changes. The administration of verapamil did not modify this response to exercise.

The effects of the different maneuvers on IS are shown in Figure 3. EP decreased IS from $25.3\% \pm 3.5\%$ to $6.0\% \pm 2.7\%$ ($P < 0.001$, EP vs. NP) and LP from $25.3\% \pm 3.5\%$ to $12.1\% \pm 2.1\%$ ($P < 0.001$, LP vs. NP). Both effects were abolished by the administration of VE ($P > 0.05$ for both). Verapamil by itself (in nonpreconditioned dogs) did not modify IS (from $25.3\% \pm 3.5\%$ in group NP to $26.1\% \pm 2.7\%$ in group VNP, $P > 0.05$).

Protocol 2: Effect of Exercise and Verapamil on NADPH Oxidase Activation

Figure 4 shows the effects of EP by exercise and verapamil on NADPH oxidase activation. Exercise increased the activation and verapamil, administered before exercise, reverted it. The drug by itself did not modify the NADPH oxidase activation.

DISCUSSION

Ischemic preconditioning, described in 1986,¹⁷ is a mechanism by which brief periods of ischemia induce protection against subsequent longer ischemic periods. Since then, there has been an increasing understanding of its mechanisms^{18–22} and other forms of cardioprotection,^{23–27} including exercise preconditioning.^{1–3}

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

TABLE 1. Hemodynamic Effects of Ischemia and Reperfusion

	Maneuvre	Baseline	Ischemia		Reperfusion		
			30 min	60 min	60 min	120 min	180 min
HR, cycles per minute	NP	153 ± 10	150 ± 12	155 ± 11	160 ± 13	158 ± 11	147 ± 9
	P	155 ± 14	160 ± 12	147 ± 10	155 ± 11	150 ± 9	149 ± 10
	VP	158 ± 7	169 ± 4	168 ± 4	167 ± 3	154 ± 6	150 ± 12
	VNP	147 ± 10	154 ± 7	158 ± 4	150 ± 5	150 ± 6	146 ± 6
SAP, mm Hg	NP	105 ± 8	110 ± 10	115 ± 7	109 ± 9	107 ± 11	110 ± 9
	P	100 ± 7	115 ± 8	120 ± 10	117 ± 11	110 ± 10	115 ± 8
	PV	98 ± 5	115 ± 4	111 ± 5	114 ± 4	111 ± 5	109 ± 8
	VNP	101 ± 4	113 ± 5	114 ± 5	110 ± 5	107 ± 4	104 ± 5
DAP, mm Hg	NP	80 ± 3	84 ± 6	85 ± 5	82 ± 5.0	80 ± 5	78 ± 8
	P	79 ± 6	87 ± 9	79 ± 7	83 ± 7.0	80 ± 5	79 ± 6
	VP	70 ± 5	85 ± 3	86 ± 4	84 ± 3	85 ± 5	80 ± 7
	VNP	75 ± 3	82 ± 4	83 ± 4	79 ± 5.0	77 ± 5	76 ± 5

Values are presented as mean ± SEM.
 NP, nonpreconditioned; P, preconditioned with exercise (early and late considered together); VP, verapamil followed by preconditioning with exercise; VNP, verapamil in nonpreconditioned dogs.

Exercise Preconditioning on IS Is Triggered by Ca²⁺

This study confirms our previous results in the sense that exercise induces early and late cardioprotection with a substantial decrease of the myocardial IS induced by coronary occlusion in dogs.^{1,3} Furthermore, the results of this study add to the above findings and suggest, for the first time, that this protection by exercise is triggered or mediated by the calcium inflow to the cell, probably through sarcolemma L-type channels, because verapamil completely reversed the preconditioning effect of exercise.

The effect of verapamil cannot be explained by changes in collateral blood flow to the ischemic myocardium as revealed by the ANCOVA analysis nor by differences in risk region volumes between the groups. The absence of changes in the arteriovenous difference of O₂ and lactate contents and of ventricular repolarization changes argue against the occurrence of ischemia during exercise and thereby the possibility that preconditioning was induced by ischemia. The results cannot be attributed either to hemodynamic or myocardial O₂ consumption changes during the experiments because these changes during exercise were of similar magnitude in groups with and without verapamil. This is explained by the lower dose of verapamil we used compared with others studies in a similar canine model (0.15 vs. 0.8 mg/kg, respectively), who found

only a slight reduction in mean blood pressure.²⁸ The dose we used was based on pilot studies to obtain the proper dose not producing a significant hemodynamic effect. Accordingly, we focused on the hypothesis that calcium inflow to the cell, but not the hemodynamic–metabolic changes produced by exercise, mediates the protection afforded by exercise.

Our results seem to disagree with those of Miyawaki et al⁶ in Langendorff-perfused rat hearts. They found that only doses of verapamil, associated with a decrease in ventricular + dP/dt during calcium preconditioning, were able to block the protection elicited by calcium, suggesting that the protection was associated with an increase in myocardial activity induced by calcium. However, Sun and Murphy¹² recently found that the inhibition of calcium-sensing receptor abolished the ischemic preconditioning-induced cardioprotection in Langendorff-perfused mice hearts, with no effect on cardiac hemodynamic–contractile functions. These results are in line with ours in the sense that the protection afforded by calcium does not necessarily go through myocardial hemodynamic or metabolic changes.

Although there is a growing evidence for the participation of calcium in diverse kinds of preconditioning, assessed mainly by the administration of Ca²⁺ and the L-type Ca²⁺ channel blocker verapamil,^{4–6,29,30} a detrimental effect of calcium during myocardial IR injury is also widely

TABLE 2. Metabolic and Hemodynamic Effects of Exercise

Maneuvre	HR, cycles per minute	MAP, mm Hg	CF, mL·min ⁻¹ ·g ⁻¹	MVO ₂ , mL/min per 100 g	AVO ₂ , mL per 100 mL	AV Lactate, mmol/L
Basal	107.8 ± 5.8	98.1 ± 3.9	0.44 ± 0.14	7.9 ± 2	12.2 ± 3.8	0.17 ± 0.16
E	158.2 ± 4*	113 ± 5.4*	0.71 ± 0.2*	12.8 ± 2.9*	13.1 ± 4.0	0.20 ± 0.11
VE	160 ± 6*	110 ± 8*	0.73 ± 0.15*	12.6 ± 3*	13.5 ± 3.5	0.18 ± 0.1

Values are presented as mean ± SEM.
 *P < 0.05 versus basal.
 AVO₂, coronary arteriovenous difference in oxygen content; AV lactate, coronary arteriovenous difference of lactate; CF, coronary flow; E, exercise; HR, heart rate; MAP, mean aortic pressure; MVO₂, myocardial oxygen consumption; VE, verapamil before exercise.

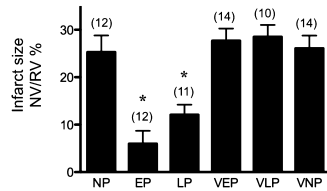


FIGURE 3. IS in the different groups: NP, nonpreconditioned dogs; EP, early preconditioning; LP, late preconditioning; VEP, verapamil before EP; VLP, verapamil before LP; VNP, verapamil in nonpreconditioned dogs; NV, necrotic volume; RV, risk volume. * $P < 0.05$ as compared with control.

recognized,^{31–34} and calcium antagonists administered during the IR period have been used for years to limit the myocardial injury.^{35–37} In this regard, we did not find a protective effect of verapamil in nonpreconditioned dogs, probably because we used a single low dose administered 1 hour before the indexed ischemia, suggesting that the cellular levels of verapamil during the IR period were not high enough to prevent the detrimental effects of calcium during this period.

We decided to use verapamil because of its cardioselectivity with negative chronotropic and inotropic effects, which were easily controlled by a small dose of the drug and our experimental protocol. This, together with a lower vasodilator effect of the drug and because it is the most studied Ca^{2+} channel blocker in preconditioning studies and the clinics as compared with others blockers.^{5,6,36–39}

Exercise Preconditioning and NADPH Oxidase Activation

It is known that NADPH oxidase is a major source of reactive oxygen species (ROS) in cardiac tissue⁴⁰ and plays an important role in diverse forms of preconditioning,^{41,42} including preconditioning by tachycardia and exercise.^{2,43} In this regard, we previously found a loss of early exercise cardioprotection after NADPH oxidase inhibition, suggesting that ROS generated by this enzyme are important mediators of the preconditioning response and that early exercise preconditioning increased the NADPH oxidase activation with an

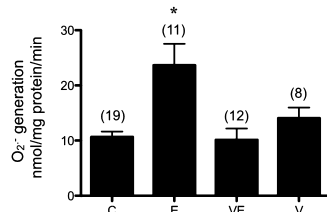


FIGURE 4. NADPH oxidase activity in different groups. C, control; E, only exercise; V, verapamil without exercise; VE, verapamil before exercise. * $P < 0.05$ as compared with control.

280 | www.jcvm.org

increased membrane association of the regulatory subunits p47^{phox} and rac1, with no change in the relative content of the membrane-bound catalytic subunit gp91^{phox}.² Frasier et al⁴³ reported recently that ROS generated by NADPH oxidase triggers the cardioprotection induced by exercise through the increase in glutathione reductase activity. In this study, we found that calcium is probably involved in NADPH oxidase activation because verapamil inhibited this activation simultaneously with the reversion of the EP effect of exercise.

Interpretation of the Results

The protective effect afforded by exercise has been explained traditionally by hemodynamic and myocardial metabolic demand changes related to cytosolic calcium increase. We have found that this protective effect can be blocked by calcium inflow decrease despite the maintenance of the hemodynamic effects induced by exercise, suggesting that calcium dynamics mediates the protection in an independent way.

Based on our present and prior results^{1–3} plus the antecedent that the calcium preconditioning is abolished by K^+ adenosine triphosphate channel blocker and by verapamil,⁴⁴ we believe that the transitory increase in cytosolic Ca^{2+} through the sarcolemma during exercise triggers the cascade for the preconditioning effect of exercise, which would be mediated by the activation of NADPH oxidase, mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels, and the inhibition of the mitochondrial permeability transition pore,⁴⁵ which has been implicated as an end point in cardiomyocyte death.^{46–48}

One of the limitations of our study is that we did not measure calcium entrance to the cell directly, which is needed to confirm our findings. Besides, we assessed the effect of exercise and verapamil on the NADPH oxidase activity in the early phase of preconditioning but not in the late phase, which is needed to a comprehensive understanding of the NADPH oxidase activity in exercise preconditioning. Further research is needed to confirm the precise mechanism by which verapamil blocks the exercise cardioprotection, including the effects of the drug on tissues besides the heart.

Clinical Implications

According to the final goal of myocardial ischemia research,^{49–51} preconditioning may be one of the mechanisms by which exercise decreases the damage produced by the acute coronary syndrome.^{52,53} The fact that verapamil prevents the exercise cardioprotection may have clinical implications because of the frequent use of L-type Ca^{2+} channel blockers in clinical practice. This presumptive detrimental effect should be balanced with the beneficial effect of Ca^{2+} blockers in patients with coronary artery disease. In summary, our results suggest that the preconditioning effect of exercise on the IS is triggered or mediated by calcium through NADPH oxidase.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Julien I. E. Hoffman (University of California, San Francisco) for his advice and help to this study. The technical assistance of Juan Carlos Fuenzalida,

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Guillermo Arce, Rodrigo Durán, and BQ Luis Montecinos is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Domenech R, Macho P, Schwarze G, et al. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res*. 2002;55:561–566.
- Sánchez G, Escobar M, Pedrozo Z, et al. Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2008;77:380–386.
- Parra VM, Macho P, Domenech RJ. Late cardiac preconditioning by exercise in dogs is mediated by mitochondrial potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;56:268–274.
- Przyklenk K, Katsuya H, Kloner RA. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation*. 1997;96:1305–1312.
- Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997;80:790–799.
- 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.
- Mazzeo RS, Rajkumar C, Jennings G, et al. Norepinephrine spillover at rest and during submaximal exercise in young and old subjects. *J Appl Physiol*. 1997;82:1869–1874.
- Eckel J, Gerlach-Eskuchen E, Reinauer H. Alpha-adrenoceptor-mediated increase in cytosolic free calcium in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:617–625.
- Saini HK, Tripathi ON, Zhang S, et al. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in catecholamine-induced increase in intracellular calcium in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H373–H380.
- Hussain M, Orchard CH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, L-type Ca²⁺ current and the Ca²⁺ transient in rat myocytes during beta adrenergic stimulation. *J Physiol*. 1997;505:385–402.
- Eisenberg MJ, Brox A, Bestawros AN. Ca²⁺ channels blockers: an update. *Am J Med*. 2004;116:35–43.
- Sun J, Murphy E. Calcium-sensing receptor: a sensor and mediator of ischemic preconditioning in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1309–H1317.
- Busija AR, Fridolfsson HN, Patel HH. A new sense of protection: role of the Ca²⁺-sensing receptor in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1300–H1301.
- Domenech RJ, Macho P, Vélez D, et al. Tachycardia preconditions infarct size in dogs. Role of adenosine and protein kinase C. *Circulation*. 1998;97:786–794.
- Domenech R, Sánchez G, Donoso P, et al. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1429–1437.
- Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972;48:422–427.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124–1136.
- Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:79–109.
- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003;83:1113–1151.
- Downey JM, Cohen MV. Unraveling the mysteries of classical preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:845–848.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*. 2007;12:181–188.
- Cohen MV, Downey JM. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2008;103:203–215.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol*. 2003;285:H579–H588.
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, et al; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the working group of cellular biology of the heart of the European society of cardiology. *Cardiovasc Res*. 2010;87:406–423.
- Cohen MV, Downey JM. Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:821–831.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008;79:377–386.
- Candilio L, Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischemic conditioning: a clinical trial's update. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16:304–312.
- Reimer KA, Lowe JE, Jennings RB. Effect of the calcium antagonist verapamil on necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;55:581–587.
- Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC, et al. Clinical L-type Ca²⁺ channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:2191–2197.
- Dekker LR, Coronel R, VanBavel E, et al. Intracellular Ca²⁺ and delay of ischemia-induced electrical uncoupling in preconditioned rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*. 1999;44:101–112.
- Tissier R, Berdeaux A, Ghaleh B, et al. Making the heart resistant to infarction: how can we further decrease infarct size? *Front Biosci*. 2008;13:284–301.
- Hernando V, Insete J, Sartorio CL, et al. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:271–279.
- Insete J, Hernando V, Garcia-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2012;96:23–31.
- Naylor WG. Pharmacological aspects of calcium antagonism. Short term and long term benefits. *Drugs*. 1993;46(suppl 2):40–47.
- Vander Heide RS, Schwartz LM, Reimer KA. The novel calcium antagonist Ro 40-5967 limits myocardial infarct size in the dog. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1526–1532.
- Wolfe CL, Donnelly TJ, Sievers R, et al. Myocardial protection with verapamil during ischaemia and reperfusion: dissociation between myocardial salvage and the degree of ATP depletion during ischaemia. *Cardiovasc Res*. 1991;25:101–109.
- da-Luz PL, Silveira MC, Chagas AC, et al. Myocardial protection by verapamil and reperfusion following coronary occlusion. *Braz J Med Biol Res*. 1990;23:317–324.
- Richard S. Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. *Drugs*. 2005;65(suppl 2):1–10.
- Elliott WJ, Ram CV. Calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13:687–689.
- Li JM, Gall NP, Grieve DJ, et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 2002;40:477–484.
- Bell RM, Cave AC, Johar S, et al. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *FASEB J*. 2005;19:2037–2039.
- Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, et al. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension*. 2005;4:860–866.
- Frasier CR, Moukdar F, Patel HD, et al. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc Res*. 2013;98:47–55.
- Kouchi I, Murakami T, Nawada R, et al. KATP channels are common mediators of ischemic and calcium preconditioning in rabbits. *Am J Physiol*. 1998;274:H1106–H1112.
- Xu M, Wang Y, Hirai K, et al. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis. *Am J Physiol*. 2001;280:H899–H908.
- Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2009;104:189–202.
- Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24:225–234.
- Sánchez G, Fernández C, Montecinos L, et al. Preconditioning tachycardia decreases the activity of the mitochondrial permeability transition pore in the dog heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410:916–921.
- Cohen MV, Downey JM. Is it time to translate ischemic preconditioning's mechanism of cardioprotection into clinical practice? *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16:273–280.
- Downey JM, Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis*. 2006;48:363–371.
- Downey JM, Cohen MV. We think we see a pattern emerging here. *Circulation*. 2005;111:120–121.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24:235–254.
- Domenech RJ. Preconditioning: a new concept about the benefit of exercise. *Circulation*. 2006;113:e1–e3.

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

www.jcvp.org | 281

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análisis conjunto de ambos artículos.

Descontados los animales fallecidos por complicaciones quirúrgicas y por criterios de exclusión (35 animales), se presentan los resultados para 34 perros en la primera etapa, '*efecto del bloqueo del canal mitoKATP sobre el acondicionamiento tardío por ejercicio*', y 123 perros en la segunda, '*participación del ión Ca^{2+} en el acondicionamiento por ejercicio*', 73 para el estudio de verapamilo sobre el tamaño del infarto, y 50 para el estudio de la activación de NADPH oxidasa.

1.1 Efectos del ejercicio acondicionante.

Durante el ejercicio acondicionante se observó en la totalidad de los experimentos un aumento significativo de la frecuencia cardíaca y presión arterial media, sin cambios de repolarización ventricular al electrocardiograma, utilizado por protocolo para descartar la presencia de isquemia durante el ejercicio.

En una muestra acotada, se observó durante el ejercicio acondicionante un aumento significativo del flujo coronario y consumo de O_2 miocárdico, sin cambios en la diferencia arterio-venosa coronaria de lactato ni del contenido de O_2 (se presenta estos resultados en los artículos de tesis).

El PP y PT por ejercicio disminuyeron el tamaño del infarto secundario a una oclusión coronaria transitoria, como se detalla más abajo en cada etapa del proyecto. Los efectos sobre el tamaño del infarto fueron independientes del flujo colateral a la región isquémica (ANCOVA, P no significativo).

1.2 Maniobras de isquemia y reperfusión.

No hubo variaciones significativas de frecuencia cardíaca y presión arterial en los períodos 'pre-isquemia, isquemia, y reperfusión', ni dentro de un mismo grupo experimental ni tampoco entre los diferentes grupos (tabla 2 en primer artículo de tesis, y tabla 1 en el segundo).

Tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos en el volumen de la región de riesgo (volumen ventricular irrigado por la arteria coronaria ocluida) como porcentaje del volumen de la pared del ventrículo izquierdo.

2. Primera etapa del proyecto.

Estudio del *'efecto del bloqueo del canal mitoKATP sobre el preconditionamiento tardío por ejercicio'* (1era hipótesis secundaria).

La figura 2 del 1er artículo de esta tesis muestra el tamaño del infarto (porcentaje de necrosis en relación a miocardio en riesgo) en los diferentes grupos experimentales para esta etapa de estudio. El PT por ejercicio disminuyó el tamaño del infarto en más de un 50%, de $27,6 \pm 3,7\%$ en el grupo control a $12,1 \pm 1,4\%$ en el grupo preconditionado ($P < 0,05$).

El efecto preconditionante fue abolido con la administración de 5HD. La droga por sí sola no modificó el tamaño del infarto y no produjo alteraciones hemodinámicas durante los períodos de isquemia y reperfusión (Tabla 2 del 1er artículo).

3. Segunda etapa del proyecto.

Estudio de la *'participación del ión Ca^{2+} en el preconditionamiento por ejercicio'*.

3.1 Ca^{2+} como iniciador del preconditionamiento.

Efecto sobre el tamaño del infarto del bloqueo de canales de Ca^{2+} del sarcolema sobre el PP y PT (hipótesis y objetivo principal).

La figura 3 del 2do artículo de esta tesis muestra los efectos del ejercicio sobre el tamaño del infarto (porcentaje de necrosis en relación a miocardio en riesgo) en los diferentes grupos en esta etapa de estudio. El PP disminuyó el tamaño del infarto de $25,3 \pm 3,5\%$ en el grupo no preconditionado a $6,0 \pm 2,7\%$ en el grupo preconditionado ($P < 0,001$), y el PT disminuyó el tamaño del infarto de $25,3 \pm 3,5\%$ en el grupo no preconditionado a $12,1 \pm 2,1\%$ en el grupo preconditionado ($P < 0,001$).

Ambos efectos protectores fueron abolidos con la administración de verapamilo (*P* no significativo respecto del grupo no precondicionado). Verapamilo no modificó el tamaño del infarto en animales no precondicionados (Figura 3 del 2do artículo), y tampoco modificó la respuesta hemodinámica al ejercicio (Tabla 2 del 2do artículo).

3.2 Ca²⁺ como iniciador de la activación de NADPH oxidasa.

Efecto del bloqueo de canales de Ca²⁺ del sarcolema sobre la activación de la enzima NADPH oxidasa en el PP (2da hipótesis secundaria).

La figura 4 del 2do artículo de esta tesis muestra los efectos del PP por ejercicio y de verapamilo sobre la activación de NADPH oxidasa. El ejercicio aumentó la activación de esta enzima, mientras que verapamilo, administrado previo al ejercicio, revirtió este efecto.

Verapamilo por sí solo no modificó la activación de esta enzima.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desde la descripción del PI en 1986 (2) ha habido un conocimiento creciente sobre los mecanismos involucrados en el preconditionamiento (8,9,24-28) y sobre otras formas de cardioprotección, como el postcondicionamiento (30,31), el condicionamiento remoto (32,122), y el preconditionamiento por ejercicio (17,43).

Nuestros resultados confirman en su conjunto que el modelo canino *in vivo* permite estudiar la protección que otorga el preconditionamiento del miocardio inducido por ejercicio sobre el tamaño del infarto secundario a una oclusión coronaria transitoria, y que el ejercicio físico induce preconditionamiento precoz y tardío en el perro.

Este efecto protector no se explica por cambios en las variables hemodinámicas durante la IR debido a que éstas no cambiaron significativamente entre los grupos. Tampoco se puede explicar por variaciones del flujo colateral a la zona isquémica ni a diferencias en el tamaño de la región en riesgo. Además, los resultados permiten descartar el estímulo isquémico durante la maniobra preconditionante debido a que durante el ejercicio: a) no hubo cambios en la diferencia arterio-venosa coronaria del contenido de O₂, b) los niveles venosos coronarios de lactato y su extracción miocárdica no se modificaron, y c) no se observó alteraciones electrocardiográficas sugerentes de isquemia.

Sin embargo, no es posible descartar la participación de diferentes metabolitos liberados durante el ejercicio, como adenosina (123), bradiciinina (123), opiodes (124), ON (24) y RLO (104,125), como activadores de diferentes vías metabólicas del preconditionamiento, de forma análoga al PI y al preconditionamiento por taquicardia (11,14,15,42,43). Tampoco podemos descartar la participación del fenómeno de preconditionamiento remoto, por ejemplo desde el músculo esquelético durante el ejercicio físico. Sin embargo, dado el hecho demostrado que la taquicardia inducida eléctricamente en perros anestesiados induce preconditionamiento *per se*

(11,44), es razonable suponer que el efecto protector del ejercicio sea mediado, al menos en parte, por acción directa del ejercicio sobre el miocardio.

Nuestros resultados también confirman que la magnitud del efecto protector del PT es menor que la del PP (en torno a 55% vs 75 % de reducción del tamaño del infarto, respectivamente), ya descrito previamente (8), a pesar que el tamaño de las zonas en riesgo y la magnitud del consumo de O₂ miocárdico sean similares en los diferentes grupos. También se ha descrito previamente una diferencia en la magnitud de la protección dentro de la segunda ventana de protección (PT) (8), y se explicaría por el tiempo al cual se mide el efecto protector en el PT, como lo ilustra el estudio de Yamashita y cols. (16), donde el ejercicio en ratas mostró una distribución bifásica, con máximos efectos protectores a las 0,5 y a las 48 horas posterior al estímulo protector.

1. Hallazgos de la 1era etapa de estudio.

En estudios previos en nuestro laboratorio se había demostrado que el PP por taquicardia y ejercicio era mediado por canales mitoKATP (14,17). Diferentes estudios han sugerido que los canales mitoKATP participan también del PT, tanto con estímulos isquémicos (75) como farmacológicos (75,82,126), con el uso de diazoxide como activador de los canales mitoKATP, bloqueándose la protección con la administración de 5HD, un bloqueador de estos canales. Los resultados de la primera etapa de esta tesis agregan ahora la evidencia que los canales mitoKATP median también el efecto preconditionante tardío del ejercicio, debido a que este efecto protector fue bloqueado completamente por 5HD. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio en mostrar la participación del canal mitoKATP en el PT inducido por ejercicio.

En la mayoría de los estudios que examinan la participación del canal mitoKATP en el preconditionamiento se comparan los efectos cardioprotectores de drogas con efectos antagónicos sobre estos canales, como diazoxide y 5HD (41). Los abridores de estos canales son cardioprotectores, mientras que el bloqueador 5HD revierte la protección

alcanzada tanto con abridores del canal mitoKATP (41,68), como con PI (75) y con postcondicionamiento (127). Diazoxide es cerca de 1000 veces más potente en abrir los canales mitoKATP que los canales sarcKATP y, a su vez, 5HD inhibe el canal mitoKATP con poco efecto en los canales sarcKATP (41).

Si bien tanto el PP como el PT son mediados por los canales mitoKATP, la dosis de 5HD requerida para revertir el efecto protector tardío fue un 40% superior a la requerida para revertir el efecto protector precoz (10 vs 7 mg/kg). Estudios preliminares en nuestro laboratorio mostraron que una dosis de 7 mg/kg de 5HD no logró revertir el efecto preconditionante tardío (datos no mostrados). Estos hallazgos son concordantes con el estudio de Sato y cols. (128), donde se demuestra que se requiere una dosis hasta 4 veces más alta para bloquear el canal mitoKATP en miocitos tratados con un activador de PKC, sugiriendo que la fosforilación del canal vía PKC lo haría más resistente a la acción del bloqueador. En el estudio de Wang y cols. (59), en el modelo de corazón aislado del conejo, se requirió una concentración 4 veces más alta de 5HD para bloquear la protección al administrarlo previo a la isquemia prolongada versus la administración previo al estímulo protector, apoyando el postulado que la fosforilación del canal luego del estímulo protector lo haría más resistente a la acción del bloqueador. El canal mitoKATP fosforilado se abriría entonces más precoz e intensamente frente a una isquemia letal subsecuente y con mayor resistencia a su bloqueo (128). Los hallazgos presentados en esta tesis, junto a un estudio previo (17), concuerdan con la literatura, en que la dosis del bloqueador necesaria para revertir el PT es mayor que la necesaria para revertir el PP.

Los hallazgos de esta primera etapa de la tesis no concuerdan con el estudio de Brown y cols. en ratas (73), donde la administración de 5HD no bloqueó el PT por ejercicio sobre el tamaño del infarto. Al menos tres diferencias metodológicas podrían explicar esta aparente discrepancia: a) el modelo de estudio, de corazón aislado de rata en el estudio de Brown, versus el modelo canino *in vivo* en la presente tesis, b) el modelo de entrenamiento, entrenamiento crónico de más 12 semanas en el estudio de Brown, donde se espera que el ejercicio proteja por múltiples mecanismos ya descritos, versus un único estímulo de ejercicio preconditionante en nuestro modelo, y c) la

dosis del bloqueador 5HD utilizada, en el estudio de Brown se administró, para intentar bloquear el PT, la misma dosis utilizada para bloquear el PI precoz, mientras que en nuestro estudio, la dosis de 5HD utilizada para bloquear el PT fue superior a la dosis necesaria para bloquear el PP. Creemos que estos tres factores explicarían las aparentes discordancias con nuestros hallazgos. Además, los resultados de la presente tesis concuerdan con los hallazgos previos en el PP por ejercicio (17), sosteniendo el postulado que los canales mitoKATP median el acondicionamiento sobre el tamaño del infarto inducido por ejercicio en el perro.

La principal limitación de esta 1era etapa de la presente tesis es asumir que el 5HD es un inhibidor específico de los canales mitoKATP, sin considerar otros posibles mecanismos de acción. Se ha observado efectos de esta droga sobre el metabolismo energético mitocondrial, cuestionando su efecto sobre el mitoKATP como el único o principal mecanismo de bloqueo de la protección (129). Comparar el efecto de glibenclamida en este tipo de acondicionamiento, una droga con conocidos efectos bloqueadores de los canales mitoKATP, si bien menos específica que 5HD, ayudaría a dilucidar que sea el efecto bloqueador del canal mitoKATP el mecanismo que revierte el efecto protector del ejercicio. Sin embargo, estudios previos que han utilizado tanto glibenclamida como 5 HD (41,68) sugieren el mecanismo de bloqueo de los canales mitoKATP como el responsable del efecto, apoyando nuestros resultados

2. Hallazgos de la 2da etapa de estudio.

2.1 El acondicionamiento por ejercicio es iniciado por Ca^{2+} .

Los resultados de la segunda etapa de esta tesis muestran y sugieren, por primera vez, que la protección que otorga el ejercicio es iniciada por la entrada de Ca^{2+} a la célula, probablemente a través de los canales tipo L del sarcolema, debido a que verapamilo revirtió completamente el efecto protector del ejercicio. Los resultados no pueden atribuirse a cambios hemodinámicos secundarios a la administración de la droga, debido a que la baja dosis de verapamilo utilizada, comparada con la de otros estudios en un

modelo canino similar (0,15 vs 0,8 mg/kg, respectivamente) donde sólo describen una ligera disminución en la presión arterial media (130), no generó variaciones hemodinámicas durante el ejercicio ni durante el proceso de IR. Se utilizó esta 'baja dosis' para estudiar la hipótesis de que 'es el ingreso de Ca^{2+} a la célula, y no los efectos hemodinámicos, los que median la protección del ejercicio preconditionante'.

Distintos estudios sugieren que el aumento del Ca^{2+} citosólico es uno de los mecanismos iniciadores del preconditionamiento (38,39,53). En el corazón de la rata se ha observado que 3 episodios de 5 min de isquemia seguidos de 5 min de reperfusión inducen un aumento en el Ca^{2+} intracelular (131), concordante con el papel del Ca^{2+} como iniciador del estado protector. El aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular inducido farmacológicamente por infusión intracoronaria de Ca^{2+} preconditionaría el corazón de la rata (39), del conejo (53) y del perro (54,55), a través de PKC y canales KATP (38,53,54). El papel del Ca^{2+} como iniciador es apoyado por diferentes estudios que han mostrado que el bloqueo de los canales tipo L de Ca^{2+} elimina la cardioprotección (38,39,53,56). Estos hallazgos sugieren en su conjunto que el aumento transitorio de la entrada de Ca^{2+} por los canales tipo L del sarcolema iniciaría la protección. Más aún, los efectos protectores de diazoxide frente al daño por IR son abolidos con la inhibición de los canales tipo L de Ca^{2+} (77). Esto sugiere que la protección de diazoxide sería mediada no sólo por la activación de los canales mitoKATP, con aumento transitorio del Ca^{2+} citosólico por la menor captación mitocondrial (69), sino además por el aumento transitorio de la entrada de Ca^{2+} por los canales del sarcolema, sugiriendo una interrelación entre aumento del Ca^{2+} citosólico, activación de canales mitoKATP y cardioprotección. Por último, Xu y cols. (132) reportaron que el preconditionamiento por Ca^{2+} en cultivos de cardiomiocitos redujo la muerte por apoptosis al inhibir la apertura del mPTP y, por lo tanto, la liberación de citocromo c y la acumulación de Ca^{2+} mitocondrial, resaltando la importancia de la mitocondria como efector final en el preconditionamiento. Estos hallazgos en su conjunto concuerdan con los hallazgos de la presente tesis, donde el preconditionamiento por ejercicio

sería iniciado por el ingreso de Ca^{2+} a la célula, y mediado por los canales mitoKATP.

Nuestros hallazgos no concuerdan con el estudio de Miyawaki en corazón aislado de rata (38), donde muestra que sólo la dosis de verapamilo que disminuya el dP/dt ventricular durante el preconditionamiento por Ca^{2+} es capaz de bloquear la protección, sugiriendo que la protección está asociada al aumento de la actividad miocárdica inducida por Ca^{2+} . Sin embargo, recientemente Sun y Murphy (37) encontraron que la inhibición del CaSR abolió la protección alcanzada por el preconditionamiento isquémico en el corazón aislado del ratón, sin efecto en la función contráctil ni en la hemodinámica cardíaca, lo cual va en la línea de nuestros resultados, donde la protección alcanzada por Ca^{2+} no necesariamente requiere cambios metabólicos o hemodinámicos, sugiriendo un papel importante del ión Ca^{2+} como activador de segundos mensajeros y mediadores que lleven a la cardioprotección, como PKC y canales mitoKATP (54,77)

El CaSR pertenece a la familia de receptores acoplados a Proteína G, inicialmente descrito y clonado desde células paratiroides, cuya función sería detectar pequeñas variaciones del Ca^{2+} extracelular y modular la liberación de hormona paratiroidea para mantener constantes los niveles de Ca^{2+} extracelular. El CaSR también se expresa en el tejido cardíaco, sin embargo su papel fisiológico no está aún definido. Su activación por Ca^{2+} extracelular, con Ca^{2+} actuando como primer mensajero (133), activaría una compleja cascada de señalización intracelular con activación de proteínas cinasas involucradas en los mecanismos protectores del PI. El PI modifica además el ambiente metabólico extracelular, como pH y fuerza iónica, los que también modificarían la actividad del CaSR (37,133).

Daño celular por sobrecarga de Ca^{2+} .

A pesar de la evidencia creciente de la participación del Ca^{2+} en diversos tipos de preconditionamiento, evaluado principalmente por la administración de Ca^{2+} y la de su bloqueador verapamilo (39,55,56), el efecto deletéreo del ión Ca^{2+} durante el período de IR es ampliamente reconocido y motivo de una

amplia investigación experimental en busca de limitar su daño durante la reperfusión (45,51,134).

En un estudio previo en el modelo canino (44) observamos que durante la isquemia prolongada aumentó la tasa de liberación de Ca^{2+} y disminuyó la de captación de Ca^{2+} por parte del RS, asociado a una disminución en los niveles del receptor de Rianodina y de fosfolambano, efectos que contribuirían a la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico y al consecuente daño celular. Observamos además que la taquicardia preconditionante previno estos cambios descritos, concordante con hallazgos previos en PI, lo que contribuiría a disminuir la sobrecarga de Ca^{2+} durante la isquemia prolongada al preservar la integridad funcional del RS, un posible mediador del preconditionamiento por taquicardia, además de la activación de los canales mitoKATP (14).

La sobrecarga de Ca^{2+} intracelular genera destrucción del sarcolema, necrosis celular, depleción de fosfatos de alta energía y pérdida de la integridad intracelular (50-52), y es en este escenario donde los antagonistas de Ca^{2+} administrados durante la IR se han usado tradicionalmente para limitar el daño miocárdico (135,136). Al respecto, en los resultados de la presente tesis no encontramos un efecto protector de verapamilo en animales no preconditionados, probablemente porque se utilizó una dosis baja y única de verapamilo administrada una hora previo a la isquemia, donde es esperable que los niveles celulares de esta droga no hayan sido suficientes para prevenir los efectos deletéreos del Ca^{2+} durante la IR. En otras palabras, en nuestros experimentos la acción protectora directa de verapamilo contra la IR no se contrapuso con su acción deletérea al abolir el preconditionamiento.

Decidimos estudiar verapamilo dada su cardioselectividad, con efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos que fueron controlados por el uso de una dosis baja, su bajo poder vasodilatador, y debido a que es el bloqueador de Ca^{2+} más ampliamente utilizado en estudios de preconditionamiento y en clínica, comparado con otros bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L (38,39,136,137).

2.2 Activación de NADPH oxidasa en el preconditionamiento por ejercicio.

La NADPH oxidasa es la principal fuente de RLO en el tejido cardiaco (64), y si bien el estrés oxidativo secundario a la activación de esta enzima ha sido asociada a estados patológicos como hipertrofia miocárdica y remodelado ventricular (138), hoy en día hay fuertes evidencias de que juega un papel importante en diversas formas de preconditionamiento (64,65), incluido el preconditionamiento por ejercicio y taquicardia (43,66). En estudios previos en nuestro laboratorio se demostró que el PP por taquicardia y ejercicio era mediado por la activación de NADPH oxidasa a través de un aumento de la asociación a membrana de sus subunidades p47^{phox} y rac₁, y que su inhibición con apocinina revertía el efecto protector (42,43), sugiriendo que los RLO generados por esta enzima jugaban un papel importante en la cardioprotección. Dado que apocinina inhibe la isoforma NOX2 de NADPH oxidasa, es razonable suponer que sería ésta la isoforma involucrada, concordante con la evidencia que ratones con deficiencia de NOX2 son insensible a la protección generada por el PI (64).

Los hallazgos previos de nuestro laboratorio son concordantes con el estudio reciente de Frasier y cols., donde se demostró en la rata que la generación de RLO por NADPH oxidasa era el iniciador de la cardioprotección inducida por ejercicio (66). Estos estudios sugieren en su conjunto que períodos breves de estimulación fisiológica por ejercicio aumentan la actividad de NADPH oxidasa promoviendo el fenotipo cardioprotector. El estímulo adrenérgico o el *stretch* fisiológico del corazón durante el ejercicio (104,139) podrían ser responsables de esta activación, con la consecuente producción de RLO, lo que promovería la modulación post transduccional tipo *redox* en diferentes proteínas intracelulares, como el receptor de Rianodina del RS (43), glutatión reductasa (66), y familias de proteínas cinasas, lo que a su vez activaría el canal mitoKATP vía PKC (77).

La generación controlada de RLO con aumento transitorio del estrés oxidativo es un hecho frecuente de diferentes protocolos cardioprotectores (107), incluido el preconditionamiento por taquicardia y ejercicio (42,43,66). Estas

modificaciones *redox* reversibles explicarían en parte la menor actividad del mPTP en las maniobras preconditionantes. Estudios recientes en nuestro laboratorio muestran que el preconditionamiento por taquicardia disminuye la actividad del mPTP en el perro (85), asociado a modificaciones *redox* de sus proteínas, lo que mediaría, al menos en parte, la protección de la taquicardia preconditionante. Los resultados de la presente tesis muestran que el ejercicio preconditionante también produciría un aumento del estrés oxidativo vía NADPH oxidasa, si bien a la fecha los hallazgos sobre la participación del mPTP en el preconditionamiento por ejercicio son contradictorios (104). Una de las limitaciones de la 2da etapa de esta tesis es que no medimos directamente la entrada de Ca^{2+} al citosol, sin duda necesario para confirmar nuestros hallazgos. Además, evaluamos el efecto de ejercicio y verapamilo sobre la activación de NADPH oxidasa sólo en la fase precoz del preconditionamiento por ejercicio, siendo necesario estudiar si lo mismo ocurre en la etapa tardía de la protección. Se requiere más investigación para precisar los mecanismos por los cuales verapamilo bloquea la cardioprotección por ejercicio, incluyendo la participación de tejidos diferentes del corazón.

3. Interpretación de los resultados.

Los resultados de la presente tesis confirman la distribución temporal de la protección del ejercicio preconditionante (16,17), con una protección precoz (PP) de mayor magnitud que la protección tardía (PT).

Basado en nuestros hallazgos, en estudios previos de nuestro laboratorio (14,17), y en el antecedente que el preconditionamiento por Ca^{2+} es abolido por bloqueadores del canal mitoKATP y por verapamilo (53), creemos que el aumento transitorio de Ca^{2+} citosólico durante el ejercicio, a través de canales tipo L del sarcolema, es uno de los iniciadores del efecto preconditionante del ejercicio, el que sería mediado por la activación de NADPH oxidasa, los canales mitoKATP, y la inhibición del mPTP (132), implicado como el efector final de la muerte del cardiomiocito (46,47).

De acuerdo al objetivo último de la investigación traslacional en protección miocárdica frente al daño por IR (140-142), creemos que el

precondicionamiento sería uno de los mecanismos por los cuales el ejercicio disminuye el daño miocárdico secundario a un síndrome coronario agudo (143). El efecto de verapamilo y de 5HD (y en forma análoga de glibenclamida) de bloquear la protección por ejercicio podría tener relevancia clínica debido al uso frecuente de estos bloqueadores en la práctica clínica. El eventual efecto negativo de verapamilo debería balancearse con el efecto benéfico de los bloqueadores de Ca^{2+} en pacientes con enfermedad coronaria.

Beneficios del ejercicio como mecanismo preconditionante.

Es ampliamente reconocido que la incidencia de infarto del miocardio es menor en individuos que mantienen una actividad física regular (112,113), y que existe una alta correlación epidemiológica entre individuos con actividad física regular y aquellos que sobreviven a un infarto del miocardio (104,143), concordante con la evidencia científica de que el ejercicio preconditionante protege del daño miocárdico por IR sobre el tamaño del infarto (16,17), la aparición de arritmias, y el atontamiento miocárdico (104). En la actualidad, el ejercicio sería el estímulo preconditionante más relevante estudiado hasta la fecha (104), con gran potencial terapéutico.

La reinducción de esta protección podría mantener la activación de NADPH oxidasa y de los canales mitoKATP, otorgando una mayor resistencia a la isquemia, en forma análoga a lo observado en corazones expuestos a hipoxia crónica (144). Dana y cols. lograron mantener un efecto protector continuo contra el infarto con la administración repetida de un agonista del receptor de adenosina en intervalos de 48 horas, sin evidencias de downregulation del receptor (145).

Es razonable pensar que el ejercicio permitiría aumentar la resistencia a la isquemia miocárdica mediante la inducción de preconditionamiento, especialmente tardío (16,17), lo que permitiría mantener una protección miocárdica permanente con una actividad física adecuada y regular (109).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En suma, nuestros resultados sugieren que el efecto preconditionante del ejercicio sobre el tamaño del infarto en el perro es iniciado por la entrada de Ca^{2+} a la célula, el que estaría mediado por la activación de NADPH oxidasa y por la activación de los canales mitoKATP.

El modelo canino utilizado en esta Tesis es un modelo ya probado y que permitió dar respuesta a los objetivos e hipótesis planteados.

Creemos que el estudio propuesto es de relevancia traslacional, con gran cercanía experimental y clínica, y que aborda un mecanismo cardioprotector ampliamente demostrado en las diferentes especies de mamíferos estudiados, incluido el hombre.

Por último, el estudio del ejercicio y su efecto preconditionante refuerza y complementa el factor protector de la actividad física regular, y conocer sus mecanismos involucrados ampliaría las posibilidades terapéuticas en cardiopatía isquémica en clínica humana.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Gerczuk PZ, Kloner RA. An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 969-978.
2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
3. Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion induced arrhythmias. *Am J Physiol* 1987; 253: H1470–H1476.
4. Bolli R. The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase: an overview. *Basic Res Cardiol* 1996; 91: 57-63.
5. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A, et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation* 1994; 90: 700-705.
6. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, et al. Prodromal Angina Limits Infarct Size. A Role for Ischemic Preconditioning *Circulation* 1995; 91: 291-297.
7. Kloner R, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995; 91: 37-47.
8. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83: 1113–1151.
9. Downey JM, Cohen MV. Unraveling the mysteries of classical preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 845–848.
10. Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24: 235–254.
11. Domenech RJ, Macho P, Vélez D, Sánchez G, Liu X, Dhalla N. Tachycardia preconditions infarct size in dogs. Role of adenosine and protein kinase C. *Circulation* 1998; 97: 786-794.
12. Domenech RJ, Macho P. Non-ischemic myocardial preconditioning. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 201-203.

13. Domenech RJ, Macho P. Role of KATP channels in non ischemic preconditioning by tachycardia. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: A18.
14. Macho P, Solis E, Sanchez G, Schwarze H, Domenech R. Mitochondrial ATP dependent potassium channels mediate non-ischemic preconditioning by tachycardia in dogs. *Mol Cell Biochem* 2001; 216: 129-136.
15. Koning MM, Gho BC, van Klaarwater E, Opstal RL, Duncker DJ, Verdouw PD. Rapid ventricular pacing produces myocardial protection by nonischemic activation of KATP⁺ channels. *Circulation* 1996; 93: 178-186.
16. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 1999; 189: 1699-1706
17. Domenech RJ, Macho P, Schwarze G, Sánchez G. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 561-566.
18. Takano H, Tang X-L, Qiu Y, Guo Y, French B, Bolli R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res* 1998; 83: 73-84
19. Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* 1994; 90: 2993-3000
20. Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, Nagase H, Gross GJ. Opioid-induced second window of cardioprotection. Potential role of mitochondrial KATP Channels. *Circ Res* 1999; 84: 846-851
21. Tanaka K, Ludwig L, Kersten J, Pagel PS, Warltier DC. Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 2004; 100: 707-721
22. Riess M, Stowe D, Warltier D. Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1603-H1607
23. Kunst G, Klein AA. Peri-operative anaesthetic myocardial preconditioning and protection - cellular mechanisms and clinical relevance in cardiac

- anaesthesia. *Anaesthesia* 2015; 70: 467-482.
24. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 972–983.
 25. Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 79–109.
 26. Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24: 225–234.
 27. Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 181–188.
 28. Cohen MV, Downey JM. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2008; 103: 203–215.
 29. 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* 2003; 285: H579–H588.
 30. Cohen MV, Downey JM. Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 821–831.
 31. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, et al; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the working group of cellular biology of the heart of the European society of cardiology. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 406–423.
 32. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 377–386.
 33. Murphy E, Steenbergen C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 51–67.
 34. Bankwala Z, Hale SL, Kloner RA. Alpha-adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation* 1994; 90: 1023-1028.
 35. Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Alpha 1-adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res.* 1994; 75: 576-585.
 36. Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF. Bradykinin elicits “second window”

- myocardial protection in rat heart through an NO-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1458-H1464.
37. Sun J, Murphy E. Calcium-sensing receptor: a sensor and mediator of ischemic preconditioning in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H1309-H1317.
 38. Miyawaki H, Zhou X, and Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996; 79: 137-146.
 39. Miyawaki H and Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997; 80: 790-799.
 40. O'Rourke B. Myocardial KATP channels in preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 845-855.
 41. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 2004; 94: 420-432.
 42. Sánchez G, Pedrozo Z, Domenech RJ, Hidalgo C, Donoso P. Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 982–991.
 43. Sánchez G, Escobar M, Pedrozo Z, Macho P, Domenech RJ, Hartel S, et al. Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 380–386.
 44. Domenech R, Sánchez G, Donoso P, Parra V, Macho P. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 1429–1437.
 45. García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L, Cabestrero A. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 274-285.
 46. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 78: 100-116.
 47. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a

- current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 78: 129-41.
48. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. 2002;55:534–543.
 49. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008; 359: 473-481.
 50. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291-300.
 51. Insete J, Hernando V, García-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2012; 96: 23–31.
 52. Ashraf M, J Suleiman, M Ahmad. Ca^{2+} preconditioning elicits a unique protection against the Ca^{2+} paradox injury in rat heart. Role of adenosine. *Circ Res* 1994; 74: 360–367.
 53. Kouchi I, Murakami T, Nawada R, Akao M, Sasayama S. KATP channels are common mediators of ischemic and calcium preconditioning in rabbits. *Am J Physiol* 1998; 274: H1106–H1112.
 54. Node K, Kitakaze M, Sato H, Minamino T, Komamura K, Shinozaki Y, et al. Role of intracellular Ca^{2+} in activation of protein kinase C during ischemic preconditioning. *Circulation* 1997; 96: 1257–1265.
 55. Przyklenk K, Hata K, Kloner R. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation* 1997; 96: 1305–1312.
 56. Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC, Meng X, Banerjee A, Harken AH. Clinical L-type Ca^{2+} channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2191–2197.
 57. Sun H, Chartier D, Leblanc N, Nattel S. Intracellular calcium changes and tachycardia induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 751–61.
 58. Chudin E, Goldhaber J, Garfinkel A, Weiss J, Kogan B. Intracellular calcium dynamics and the stability of ventricular tachycardia. *Biophys J*

- 1999;77:2930–2941.
59. Wang S, Cone J, Liu Y. Dual roles of mitochondrial KATP channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H246-H255.
 60. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simona C, Violante A, et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997; 80: 743–8.
 61. Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E. A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res* 1995; 77: 424–429.
 62. Hirata N, Shim YH, Pravdic D, Lohr NL, Pratt PF Jr, Weihrauch D, et al. Isoflurane differentially modulates mitochondrial reactive oxygen species production via forward versus reverse electron transport flow: implications for preconditioning. *Anesthesiology* 2011; 115: 531–540.
 63. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 2014; 114: 524-537
 64. Bell RM, Cave AC, Johar S, Hearse DJ, Shah AM, Shattock MJ. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *FASEB J* 2005; 19: 2037–2039.
 65. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, et al. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension* 2005; 4: 860–866.
 66. Frasier CR, Moukdar F, Patel HD, Sloan RC, Stewart LM, Alleman RJ, et al. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc Res* 2013; 98: 47–55.
 67. Gross GJ and Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992; 70: 223-233.
 68. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997; 81:

1072-1082.

69. Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marbán E. Nicorandil, a potent cardioprotective agent acts by opening mitochondrial ATP-dependent potassium channels. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 514-518.
70. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998; 97: 2463-2469.
71. Gross GJ and Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 1999; 84: 973-979.
72. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991; 352: 244–247.
73. Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, et al. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial isoform of the K_{ATP} channel in the rat. *J Physiol* 2005; 569: 913–924.
74. Chicco AJ, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Gardner RT, Fasen GS, et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal K_{ATP} channel blockade in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2432– H2437.
75. Takano H, Tang X-L, Bolli R. Differential role of K_{ATP} channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol* 2000; 279: H2350-H2359.
76. Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marbán E. Adenosine primes the opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. A key step in ischemic preconditioning? *Circulation* 2000; 102: 800-805.
77. Wang Y, Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial K_{ATP} channel-mediated protection against Ca²⁺ overload injury in rat myocardium. *Circ Res* 1999; 84: 1156–1165.
78. Patel DJ, Purcell HJ, Fox KM. Cardioprotection by opening of the K_{ATP} channel in unstable angina, is this a clinical manifestation of myocardial preconditioning? Results of a randomized study with nicorandil. CESAR-2 Investigation. *Clinical European studies in angina and revascularization.*

- Eur Heart J 1999; 20: 51-57.
79. The Iona Study Group. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: The impact of nicorandil in angina (IONA) randomized trial. *Lancet* 2002; 359: 1269-1275.
 80. Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A, Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol* 1998; 275: H1567-H1576.
 81. Garlid KD. Opening mitochondrial ATP in the heart: What happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 275-279.
 82. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marbán E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by Nitric Oxide. *Circulation* 2000; 101: 439-45.
 83. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2001; 89: 1177-1183.
 84. Gross GJ, Fryer RM. Mitochondrial K_{ATP} channels: Triggers or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? *Circ Res* 2000; 87: 431-433.
 85. Sánchez G, Fernández C, Montecinos L, Domenech RJ, Donoso P. Preconditioning tachycardia decreases the activity of the mitochondrial permeability transition pore in the dog heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410: 916-921.
 86. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetics consequences of opening the ATP-sensitive K⁺ channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H649-H657.
 87. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 2013; 381: 166-175.
 88. Kloner RA, Shook T, Antman EM et al. TIMI 9 investigators. A prospective analysis on the potential preconditioning effect of preinfarction angina in TIMI 9. *Circulation* 1996; 94 (suppl I): I-611
 89. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications. Part 2. *Circulation* 2001; 104: 3158-3167.

90. Kloner RA, Shook T, Antman EM, Cannon CP, Przyklenk K, Yoo K, and the TIMI-9B Investigators. Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome. *Circulation* 1998; 97: 1042-1045.
91. Zahn R, Schiele R, Schneider S, Gitt AK, Seidi K, Bossaller C, et al. For the Myocardial Infarction Registry Study Group. Effect of preinfarction angina pectoris on outcome in patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty (results from the Myocardial Infarction Registry [MIR]). *Am J Cardiol* 2001; 87: 1-6
92. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 334: 7-12.
93. Williams DO, Bass TA, Gerwitz H, Most AS. Adaptation to the stress of tachycardia in patients with coronary artery disease: insight into the mechanism of the warm-up phenomenon. *Circulation* 1985; 71: 687-92.
94. Rinaldi CA, Masani ND, Linka AZ, Hall RJ. Effect of repetitive episodes of exercise induced myocardial ischemia on left ventricular function in patients with chronic stable angina: evidence for cumulative stunning or ischemic preconditioning? *Heart* 1999; 81: 404-411.
95. Tomai F. Exercise-induced myocardial ischemia triggers early phase of preconditioning but not the late phase. *Am J Cardiol* 1999; 83: 586-588.
96. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990; 82: 2044-2051.
97. Leeser MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R. Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty. *Circulation* 1997; 95: 2500-2507.
98. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin-T release in patients undergoing cardiac surgery. *Heart* 1997; 77: 314-318.
99. Illes RW, Swoyer KD. Prospective, randomized clinical study of ischemic preconditioning as an adjunct to intermittent cold blood cardioplegia. *AnnThorac Surg* 1998; 65: 748-753.
100. Li G, Chen S, Lu E, Li Y. Ischemic preconditioning improves preservation

- with cold blood cardioplejia in valve replacement patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 15: 653-657.
101. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 2013; 382: 597-604.
 102. Leesar MA, Stoddard MF, Dawn B, Jasti VG, Masden R, Bolli R. Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 2001; 103: 2935-2941.
 103. McElroy CL, Gissen SA, Fishbein MC. Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* 1978; 57: 958–962.
 104. Frasier CR, Moore RL, Brown DA. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *J Appl Physiol* 2011; 111: 905-915.
 105. Lennon SL, Quindry J, Hamilton KL, French J, Staib J, Mehta JL, Powers SK. Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol* 2004; 96: 1299–1305.
 106. Bowles DK, Starnes JW. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol* 1994; 76: 1608– 1614.
 107. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008; 88: 581–609.
 108. Kavazis AN, McClung JM, Hood DA, Powers SK. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H928–H935.
 109. Domenech RJ. Preconditioning: a new concept about the benefit of exercise. *Circulation* 2006; 113: e1–e3.
 110. Billman GE. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H1171 – H1193.
 111. Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle

- characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 1993; 328: 538–545.
112. Mittleman MA, Maclure M, Tofler GH, Sherwood JB, Goldberg RJ, Muller JE. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J Med*. 1993; 329: 1677-1683.
 113. Willich SN, Lewis M, Lowel H, Arntz HR, Schubert F, Schroder R. Physical exertion as a trigger of acute myocardial infarction. Triggers and Mechanisms of Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med*. 1993; 329: 1684-1690.
 114. Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL. Exercise and preconditioning. *Curr Opin Cardiol*. 2002; 17: 495-502.
 115. Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology* 2014; 29: 27-38.
 116. Mazzeo RS, Rajkumar C, Jennings G, et al. Norepinephrine spillover at rest and during submaximal exercise in young and old subjects. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1869–1874.
 117. Saini HK, Tripathi ON, Zhang S, et al. Involvement of $\text{Na}^{1+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in catecholamine-induced increase in intracellular calcium in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H373–H380.
 118. Hussain M, Orchard CH. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content, L-type Ca^{2+} current and the Ca^{2+} transient in rat myocytes during beta adrenergic stimulation. *J Physiol* 1997; 505: 385–402.
 119. Busija AR, Fridolfsson HN, Patel HH. A new sense of protection: role of the Ca^{2+} -sensing receptor in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H1300–H1301.
 120. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 121-135.
 121. Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116: 431-436.

122. Candilio L, Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischemic conditioning: a clinical trial's update. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 16: 304–312.
123. Langberg H, Bjorn C, Boushel R, Hellsten Y, Kjaer M. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *J Physiol* 2002; 542: 977–983.
124. Dickson EW, Hogrefe CP, Ludwig PS, Ackermann LW, Stoll LL, Denning GM. Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H402–H408.
125. Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 2004; 182: 161–169.
126. Wang X, Fisher PW, Xi L, Kukreja RC. Essential role of mitochondrial Ca^{2+} -activated and ATP-sensitive K^{+} channels in sildenafil-induced late cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 105–113.
127. 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: 1103–1110.
128. Sato T, O'Rourke B, Marbán E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K^{+} channels by protein kinase C. *Circ Res* 1998; 83: 110–114.
129. Hanley PJ, Daut J. K_{ATP} channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K_{ATP} channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 17–50.
130. Reimer KA, Lowe JE, Jennings RB. Effect of the calcium antagonist verapamil on necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 55: 581–587.
131. Smith GB, Stefenelli T, Wu ST, Wikman-Coffelt J, Parmley WW, Zaugg CE. Rapid adaptation of myocardial calcium homeostasis to short episodes of ischemia in isolated hearts. *Am Heart J* 1996; 131: 1106–1112.
132. Xu M, Wang Y, Hirai K, et al. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis. *Am J Physiol* 2001;

280: H899–H908.

133. Smajilovic S, Tfelt-Hansen J. Calcium acts as a first Messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 457-467.
134. Hernando V, Inserte J, Sartório CL, Parra VM, Poncelas-Nozal M, García-Dorado D. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49: 271–279.
135. Vander Heide RS, Schwartz LM, Reimer KA. The novel calcium antagonist Ro 40-5967 limits myocardial infarct size in the dog. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1526–1532.
136. Wolfe CL, Donnelly TJ, Sievers R, Parmley WW. Myocardial protection with verapamil during ischaemia and reperfusion: dissociation between myocardial salvage and the degree of ATP depletion during ischaemia. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 101–109.
137. Elliott WJ, Ram CV. Calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2011; 13: 687–689.
138. Murdoch M, Zhang C, Cave A, Shah A. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 208–215.
139. Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 2011; 333: 1440 – 1445.
140. Cohen MV, Downey JM. Is it time to translate ischemic preconditioning's mechanism of cardioprotection into clinical practice? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 16: 273–280.
141. Downey JM, Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 48: 363–371.
142. Downey JM, Cohen MV. We think we see a pattern emerging here. *Circulation* 2005; 111: 120–121.
143. Marongiu E, Crisafulli A. Cardioprotection acquired through exercise: the role of ischemic preconditioning. *Curr Cardiol Rev* 2014; 10: 336-348.
144. Eells JT, Henry MM, Gross GJ, Baker JE. Increased mitochondrial KATP channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? *Circ Res* 2000; 87: 915-921.

145. Dana A, Baxter GF, Walker JM, and Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1142-1149.

