

## Precondicionamiento temprano contra las arritmias de reperfusión en un modelo de oveja consciente. Rol de los canales de potasio dependientes de ATP.

### *Early preconditioning against reperfusion arrhythmias in a conscious sheep model. Role of ATP-dependent potassium channels.*

Elena C. Lascano<sup>†</sup>, Edmundo I. Cabrera Fischer\*,  
Jorge A. Negroni<sup>†</sup>.

<sup>†</sup>Departamento de Biología, Universidad Favaloro,  
\*AIDUF, CONICET, Buenos Aires, Argentina.  
Solís 453.

CP 1075 Buenos Aires, Argentina  
Correo electrónico

Recibido 04-SET-2012 - ACEPTADO después de revisión 12-Octubre-2012.

Los autores de este trabajo declaran al mismo no afectado por conflictos de interés.

Versión para imprimir 

#### RESUMEN

Faltan evidencias claras de preconditionamiento temprano (PT) contra las arritmias de reperfusión en animales conscientes.

**Objetivo:** Analizar la protección del PT contra las arritmias de reperfusión en un modelo ovino consciente sometida a isquemia reversible y la participación de los canales de potasio ATP dependientes (KATP) como efectores del mecanismo protector.

**Material y Métodos:** Se utilizaron ovejas adultas instrumentadas con un sensor de presión intraventricular, cables de marcapaso en aurícula derecha para registrar el electrocardiograma, un ocluser neumático en tercio distal de arteria descendente anterior y microcristales piezoeléctricos en la zona isquémica para medir espesor parietal. A la semana de la cirugía se realizó el PT consistente en 6 episodios de isquemia reperfusión 45 min antes de una isquemia de 12 min seguida de 30 min de reperfusión. El índice de severidad de arritmias (ISA) de Lambeth se comparó con la situación control sin PT. La participación de los KATP se analizó administrando glibenclamida, inhibidor inespecífico de los KATP, y con inhibidores específicos de los KATP sarcolemales (HMR1098) y mitocondriales (5-HD), antes de la isquemia prolongada.

**Resultados:** El PT redujo la incidencia de arritmias ( $p < 0.01$ ). La glibenclamida y el HMR1098 abolieron completamente la protección del PT y aumentaron el ISA y con el 5HD el efecto inhibitorio fue menor. El comportamiento mecánico acompañó la respuesta electrocardiográfica.

**Conclusiones:** La participación de los KATP sarcolemales como efectores de la protección del PT contra las arritmias sugiere que las drogas inhibitorias utilizadas clínicamente, como por ejemplo la glibenclamida, se deberían usar con prudencia.

**Palabras clave:** Precondicionamiento temprano. Arritmias. Canales KATP.

*Rev Fed Arg Cardiol. 2013; 42(1): 20-28*

#### SUMMARY

Early preconditioning (EP) against reperfusion arrhythmias is not clear in conscious animals.

**Objective:** To analyze the EP protection against reperfusion arrhythmias in a conscious sheep model undergoing reversible ischemia and the role of ATP-dependent potassium channels (KATP) as effectors of the protective mechanism.

**Material and Methods:** Adult sheep, prepared with an intraventricular pressure transducer, pacemaker wires in the right atrium to record the electrocardiogram, a pneumatic occluder in the distal third of the anterior descending coronary artery and piezoelectric microcrystals in the ischemic zone to measure wall thickness were used. One week after surgery, EP consisting of 6 periods of ischemia-reperfusion was performed 45 min before a 12 min ischemia followed by 30 min reperfusion. Lambeth's arrhythmia severity index (ASI) was compared with controls without EP. The role of KATP channels was analyzed with glibenclamide, non-selective inhibitor of KATP channels, HMR1098 and 5-HD, specific inhibitors of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels, respectively, before the prolonged ischemia.

**Results:** EP reduced arrhythmias incidence ( $p < 0.01$ ). Glibenclamide and HMR1098 totally abolished EP protection, increasing ASI, and 5-HD had a lower inhibitory effect. Mechanical behavior matched the electrocardiographic response.

**Conclusions:** The prominent sarcolemmal KATP channel participation as effectors of EP protection against arrhythmias suggests that clinically-used drugs which might close them should be used cautiously.

**INTRODUCCIÓN.**

El preconditionamiento es un fenómeno de protección natural desencadenado por períodos breves de isquemia-reperusión que torna a los miocitos más resistentes frente a una isquemia posterior más prolongada, disminuyendo el tamaño del infarto [1-2], la disfunción mecánica o atontamiento [3-5] y la severidad de las arritmias de isquemia y reperusión [6-8]. El preconditionamiento presenta un comportamiento bifásico, con dos fases o ventanas de protección que se denominan preconditionamiento clásico, temprano (PT) o primera ventana de preconditionamiento, cuyo efecto se prolonga hasta un máximo de 2-3 hr luego de los períodos breves de isquemia-reperusión, y preconditionamiento tardío o segunda ventana de preconditionamiento, que comienza a manifestarse 12 hr después de los períodos de isquemia-reperusión, alcanza un pico de protección aproximadamente a las 24 hr y puede durar hasta 72 hr.

Paralelamente a los numerosos trabajos experimentales que demuestran la protección por preconditionamiento existen hallazgos clínicos donde se manifiesta este potente fenómeno cardioprotector, entre los cuales se encuentran el aumento de la sobrevida [9-11] y de la función [12] en pacientes que han sufrido un infarto con dolor anginoso previo la reducción de la elevación del segmento ST en oclusiones sucesivas durante la angioplastia [13], y la disminución de los niveles de troponina I luego de protocolos de preconditionamiento isquémico durante cirugía cardiovascular [14]. Estas expresiones de autodefensa del corazón frente a eventos isquémicos en pacientes corresponden a la descripción de preconditionamiento temprano ya que tienen lugar dentro de un lapso breve entre el desencadenamiento y la efectivización de la protección. Por lo tanto, la inducción de preconditionamiento en la práctica clínica permitiría a los pacientes afectados por angina de esfuerzo aumentar su capacidad de realizar mayor actividad o ejercicio, facilitar el inflado prolongado de balón durante la angioplastia o ser utilizado para preservar el corazón durante la cirugía y el trasplante cardíacos. Estas ventajas han conducido a la realización de numerosos trabajos de investigación básica para desentrañar cuales son los mecanismos que desencadenan el preconditionamiento y las vías de protección con el fin de desarrollar intervenciones o fármacos que lo mimeticen. No obstante, todavía no se ha podido responder fehacientemente a esta necesidad ya que la mayor parte de los estudios se ha realizado en miocito, corazón aislado o animales a tórax abierto, existiendo insuficiente comprobación de que los hallazgos de protección y los mecanismos que los producen puedan reproducirse en mamíferos grandes conscientes como modelo experimental de mayor aproximación a la condición clínica.

Por ello, el estudio del preconditionamiento en ausencia de necrosis, sin la contaminación de un aumento de la mejoría por disminución del tamaño del infarto, tiene importancia para analizar la protección contra las arritmias, fenómeno poco estudiado y que en el único trabajo en animales conscientes arrojó resultados negativos [15].

A pesar de que se han hallado numerosas moléculas liberadas durante la isquemia o agentes farmacológicos que desencadenan la protección, hasta el presente no se sabe con certeza cual es el efector final. Entre los efectores encargados de la protección por preconditionamiento se encuentran los canales de K dependientes de ATP (KATP), ubicados en el sarcolema y las mitocondrias. La apertura de los KATP sarcolemales, que produce acortamiento del potencial de acción y en consecuencia menor sobrecarga de calcio, ha sido extensamente estudiada en modelos de isquemia en corazón aislado y animales a tórax abierto. Pese a ello, subsisten dudas acerca de su participación exclusiva o relativa, ya que otras experiencias señalan a los KATP mitocondriales como responsables de la protección.

En consecuencia, se estudió la protección por PT contra las arritmias en ovejas conscientes sometidas a isquemia totalmente reversible para simular situaciones experimentales más cercanas a la condición clínica. En cuanto al mecanismo de protección, debido a que se encuentra en discusión el rol de los KATP sarcolemales y mitocondriales en la protección del PT y no existe ningún dato en animales conscientes, se analizó la participación de los KATP en el mecanismo del PT contra las arritmias de reperusión.

**MATERIAL Y MÉTODOS.**

Se utilizaron ovejas adultas jóvenes de la raza Hampshire Down, que fueron usadas simultáneamente para el estudio de recuperación mecánica por preconditionamiento. Brevemente, durante 10 días antes de la cirugía, los animales se adaptaron al entorno y personal del bioterio de la Universidad Favaloro, acreditado de acuerdo a los estándares de cuidado y uso humanitario de los animales de laboratorio por el ANMAT (1320/07) y el National Institute of Health (acreditación No: A5556-01) y tratados de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicado por el US National Institute of Health (No 85-23, revisado en 1996).

El procedimiento quirúrgico ya fue realizado con anterioridad en el laboratorio [16-19]. El día de la cirugía, fue sedado con acepromacina (0.3 mg/Kg) antes de inducirse la anestesia con tiopental sódico (20 mg/Kg). Luego de la intubación y conexión a ventilación mecánica, la anestesia se mantuvo con enflurano 2-3% vaporizado con oxígeno y citrato de fentanilo (0.1 mg). Se realizó una toracotomía en el 5to espacio intercostal izquierdo, y se disecó la vena mamaria introduciéndose en la misma un catéter K31 de Tygon para la infusión de drogas. Se efectuó la pericardiotomía y a través de una incisión en el ápex del corazón se introdujo un microtransductor de presión (Konigsberg P7, Pasadena, Cal, USA) junto con un catéter K31 de Tygon lleno de solución fisiológica para su posterior calibración. Se disecó la arteria coronaria descendente anterior distalmente a la segunda rama diagonal y se ocluyó mecánicamente la porción disecada para verificar visualmente que la zona que sería sometida a isquemia (zona de riesgo) fuese no mayor al 20% de la masa ventricular izquierda. Se colocó un par de cristales piezoeléctricos de 5 MHz (uno en el subendocardio y otro en el epicardio) en el centro de la zona de riesgo para medir espesor parietal regional mediante la técnica de sonomicrometría. Luego se ubicó un oclisor neumático alrededor de la porción arterial disecada. Se colocaron cables de marcapaso en la aurícula derecha para registrar el electrocardiograma (ECG). Finalmente, se tunelizaron todos los cables y catéteres haciéndolos emerger entre las escápulas y la toracotomía se cerró por planos. Al finalizar la cirugía y durante 3 o más días se inyectó por vía

endovenosa 1 g/día i.m de cefalomicina. El cuidado postquirúrgico de los animales estuvo a cargo del personal veterinario y técnico del bioterio. Antes del protocolo experimental y a partir del segundo día postquirúrgico, cada animal fue sometido a 5-7 sesiones diarias de acostumbamiento al entorno donde se realizarían las experiencias, controlándose la calidad de las señales y que la frecuencia cardíaca disminuyera paulatinamente con la habituación hasta valores normales para un animal consciente (70-80 latidos/min). Al finalizar el protocolo experimental, el animal fue posteriormente utilizado en otros protocolos experimentales luego de al menos una semana de separación entre experimentos, y al término de su vida útil fue sacrificado con una sobredosis de tiopental sódico seguida de una inyección en bolo de cloruro de potasio. La señal de espesor permitió verificar la isquemia en el sitio de oclusión y la señal de presión se usó para separar los ciclos cardíacos y juntamente con el ECG constatar la existencia de arritmias.

Siete a diez días después de la cirugía, los animales fueron estudiados dentro del carro en estado consciente, sin sedación. En los flancos, a nivel del corazón, se colocaron 2 electrodos conectados a un desfibrilador (Rhomicron, Argentina) en caso de tener que cardiovertir al animal durante la isquemia o reperfusión temprana. El microtransductor de presión Konigsberg y los cables de los cristales de sonomicrometría se conectaron a los respectivos módulos de un equipo System 6 (Triton Technology, San Diego, Cal) y los cables de marcapaso a un amplificador diferencial universal (Instituto de Ing. Biomédica, Fac de Ingeniería, UBA). El catéter con fluido para calibrar el microtransductor de presión se conectó a un transductor de presión tipo Statham (DT-XX, Viggo-Spectramed, Oxnard Cal) previamente calibrado mediante un calibrador de presión digital (Xcaliber, Viggo-Spectramed, Oxnard Cal). El punto de presión cero se estableció aproximadamente a nivel de la aurícula derecha, y la señal generada por el microtransductor Konigsberg se ajustó en nivel y amplificación hasta corresponder con la del transductor externo. La señal eléctrica de espesor se calibró en mm usando la calibración interna del sonomicrómetro.

Cuando tuvieron lugar episodios de arritmia durante la isquemia o reperfusión, se continuó el experimento si hubo reversión espontánea al ritmo sinusal. En los casos en que la arritmia evolucionó a taquicardia ventricular de más de 30 seg de duración, se administró un bolo de lidocaina (1-2 mg/kg), y cuando la taquicardia evolucionó a fibrilación ventricular y esta no reversionó espontáneamente luego de 30 seg, se aplicó un shock eléctrico cardioversor (200-300 Joules) con el desfibrilador. En caso de que dos intentos de cardioversión fueran infructuosos, se sacrificó el animal con una sobredosis de tiopental sódico.

### Protocolo experimental.

Los animales se dividieron en los siguientes grupos:

- Control (CONT); N=9: se efectuaron 12 min de isquemia seguido de 30 min de reperfusión.
- Precondicionamiento temprano (PT); N=9: se realizaron seis períodos de 5 min de isquemia-5 min de reperfusión, 45 min hs antes de los 12 min de isquemia y 30 min de reperfusión.
- Precondicionamiento Temprano + Glibenclamida, inhibidor inespecífico KATP de los sarcolemas y mitocondriales, antes de la isquemia prolongada, (PTG), N=6: Igual a PT, excepto que, después de los períodos de precondicionamiento, se infundió glibenclamida (0.4 mg/kg), durante 10 min, empezando 30 min antes de la isquemia de 12 min.
- Precondicionamiento Temprano + la sal sódica de (1-[5-[2-(5-cloro-o-anisamido) etil]-2-metoxifenil] sulfonil-3-metil-tiourea (HMR 1098), inhibidor específico de los KATP sarcolemas, antes de la isquemia prolongada, (PTHMR), N=6: Igual a PT, excepto que se infundió HMR1098 (12 mg/kg en H<sub>2</sub>O destilada) en bolo 15 min antes de la isquemia de 12 min.
- Precondicionamiento temprano + la sal sódica del ácido 5-hidroxicanoico (PT5HD), inhibidor específico de los KATP mitocondriales, antes de la isquemia prolongada, (PT5HD), N=6: Igual a PT con 5-HD (5 mg/kg) administrado 10 min antes de la isquemia de 12 min.

### Adquisición y análisis de datos.

En cada tiempo de adquisición, se digitalizaron las señales consecutivas de latidos estables durante 15 seg, con un intervalo de muestreo de 4 ms, usando una computadora personal equipada con un convertidor analógico-digital (National Instruments Lab-Pc; Austin, Texas, USA) y software desarrollado en el laboratorio. Las medidas de espesor parietal consideradas en este trabajo fueron las adquiridas cada 5 min durante los 20 min previos a la isquemia (el promedio de estas medidas corresponde al valor de las condiciones basales), en el último minuto de la isquemia y cada 10 min durante la primera media hora de reperfusión.

La efectividad del número y duración de los períodos precondicionantes para producir protección, así como la duración de la isquemia prolongada (12 min) se determinaron sobre la base de experimentos previos para precondicionamiento tardío contra el atontamiento [18].

Asimismo, en un trabajo previo, se estableció mediante la medición de la duración del potencial de acción (APD<sub>90</sub>) obtenida a través de potenciales monofásicos en animales a tórax abierto, que las dosis de las drogas eran las mínimas que producían el efecto esperado sobre los KATP sarcolemas [19].

### Análisis de datos.

Se definió como fin de diástole al comienzo de la deflexión positiva de la derivada de la presión ventricular izquierda obtenida digitalmente (dP/dt) y como fin de sístole al espesor medido en el tiempo en que se alcanza el 10% de la dP/dtmin previo al valor de la misma. La fracción de espesamiento sistólico (FES) se calculó de la siguiente manera:  $FES = (Es - Ed) / Ed$  donde Es es espesor regional ventricular de fin de sístole y Ed es espesor regional ventricular de fin de diástole.

El procesamiento de señales y el cálculo de parámetros fueron realizados para cada tiempo de adquisición de datos. La presión de fin de sístole (Pfs), la dP/dtmax, la frecuencia cardíaca (FC), y la FES fueron calculadas en cada latido registrado y el promedio de latidos procesados durante los 15 seg de adquisición (15 a 30 latidos) fue el valor asignado a la muestra para ese tiempo. Los valores de isquemia y reperfusión fueron expresados como porcentaje del valor basal considerado como 100%.

### Análisis de los episodios arrítmicos.

Las arritmias fueron detectadas a partir de las señales de electrograma y presión intraventricular durante la isquemia y la reperfusión y diagnosticadas de acuerdo a la convención de Lambeth como latidos ectópicos prematuros (LEP), salvas de taquicardia ventricular (STV), taquicardia ventricular (TV) y fibrilación ventricular (FV)

[20]. La gravedad de las arritmias se evaluó a través de un índice de severidad de arritmias (ISA) [21] para permitir la comparación estadística en experimentos con taquiarritmias. Los valores asignados a cada tipo de episodio arritmico fueron los siguientes: ritmo sinusal=0, latidos ectópicos prematuros (LEP)=1, STV=2, taquicardia ventricular (TV)=3, fibrilación ventricular reversible (RFV)=4 y fibrilación ventricular irreversible (FVI)=5. El valor del ISA de cada animal correspondió al del episodio de mayor gravedad.

### Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como media±ES. Se utilizó el test t de Student para comparar diferencias entre 2 grupos y ANOVA para comparar diferencias entre más de 2 grupos. El ANOVA de una vía fue utilizado para analizar el efecto del tiempo sobre las variables hemodinámicas. En ambos casos, si F fue significativo, se realizó un análisis posterior aplicando el test de Scheffé para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas para  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS.

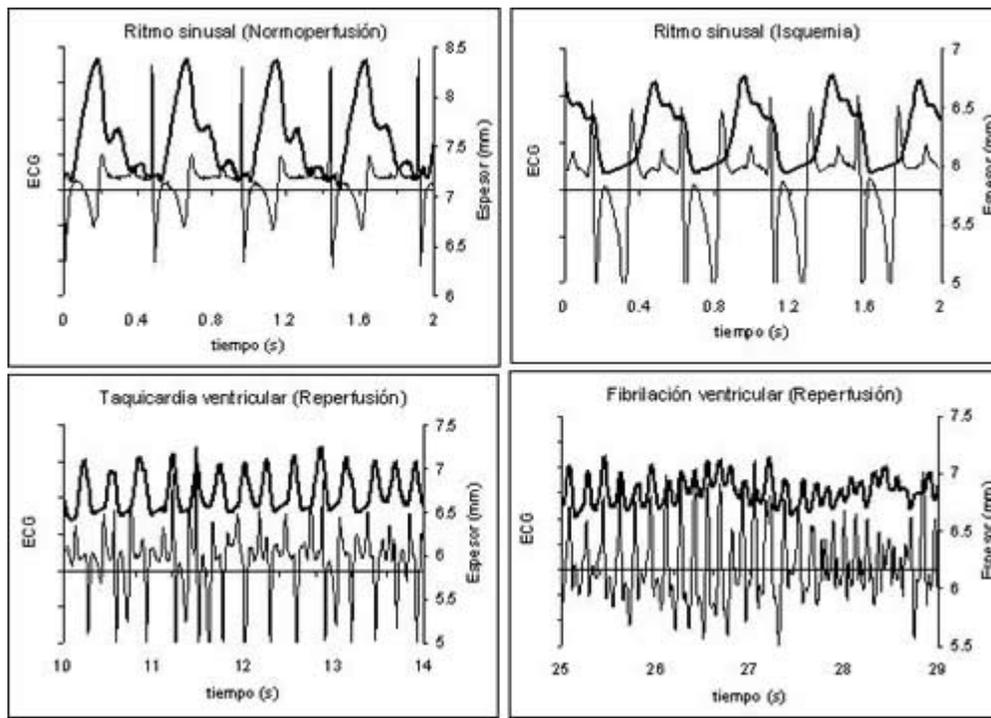
La **Tabla 1** muestra que la Pfs no tuvo diferencias significativas respecto del valor basal al final del período isquémico y durante toda la reperfusión en ninguno de los grupos estudiados. Esto demuestra que las diferencias en la recuperación de la función mecánica y la generación de arritmias se debieran al efecto de la oclusión control o al preconditionamiento y no a variaciones en la respuesta hemodinámica a la isquemia. En concordancia con los resultados de Pfs, la dP/dtmax evidenció valores semejantes a los basales al finalizar la isquemia, los cuales se conservaron a lo largo de la reperfusión en todos los grupos. Al ser la dP/dtmax un índice de contractilidad, estos resultados sugieren que el estado inotrópico del ventrículo izquierdo no tuvo alteraciones durante la isquemia ni la reperfusión. La estabilidad de la FC, con valores similares a los basales, mostró que el tamaño del área sometida a isquemia fue lo suficientemente pequeña como para no tener que compensar con una mayor frecuencia una disminución de la capacidad contráctil del corazón. Asimismo, su regularidad es indicadora de que la isquemia y la reperfusión no alteraron al animal, lo que junto con la uniformidad de la Pfs y la dP/dtmax, demuestran que la función de bomba del corazón no se vió afectada por el tamaño o la duración de la isquemia.

**TABLA 1.**  
Valores hemodinámicos basales, fin de isquemia  
y durante los primeros 30 min de reperfusión.

	Basal	12 min de isquemia	10 min de reperfusión	20 min de reperfusión	30 min de reperfusión
<b>CONT</b>					
Pfs	105.3±4.1	103.2±6.7	110.2±6.6	104.9±5.5	102.1±5.0
dP/dtmax	2597±136	2392±86	2409±124	2420±147	2461±145
FC	88.1±5.5	90.9±6	90.3±6.4	87.1±6.0	85.6±6.2
<b>PT</b>					
Pfs	103.0±4.5	96.6±2.7	105.3±2.2	103.9±3.4	103.7±4.2
dP/dtmax	2206±146	2063±131	2053±147	2076±136	2090±125
FC	68.7±3.0	69.8±3.3	66.9±3.4	67.5±3.0	67.7±2.6
<b>PTG</b>					
Pfs	99.9±3.2	106.1±3.4	105.4±4.2	99.1±4.3	99.2±3.6
dP/dtmax	2097±224	2069±248	2104±185	2080±205	2115±220
FC	80.5±7.2	84.8±9.0	86.8±7.7	85.5±8.1	83.8±7.7
<b>PTHMR</b>					
Pfs	99.42.7	99.9±4.9	100.8±5.3	99.0±4.7	93.9±4.4
dP/dtmax	2197±218	2124±178	2089±146	2084±121	2081±135
FC	69.0±4.0	67.4±4.0	68.0±3.9	67.7±5.3	62.7±3.3
<b>PT5HD</b>					
Pfs	93.5±1.3	93.6±2.2	96.5±1.9	94.7±1.6	95.9±2.2
dP/dtmax	2925±443	3021±404	2943±446	3016±412	3118±400
FC	105.9±4.8	109.4±4.0	104.1±5.1	103.5±7.5	105.3±9.2

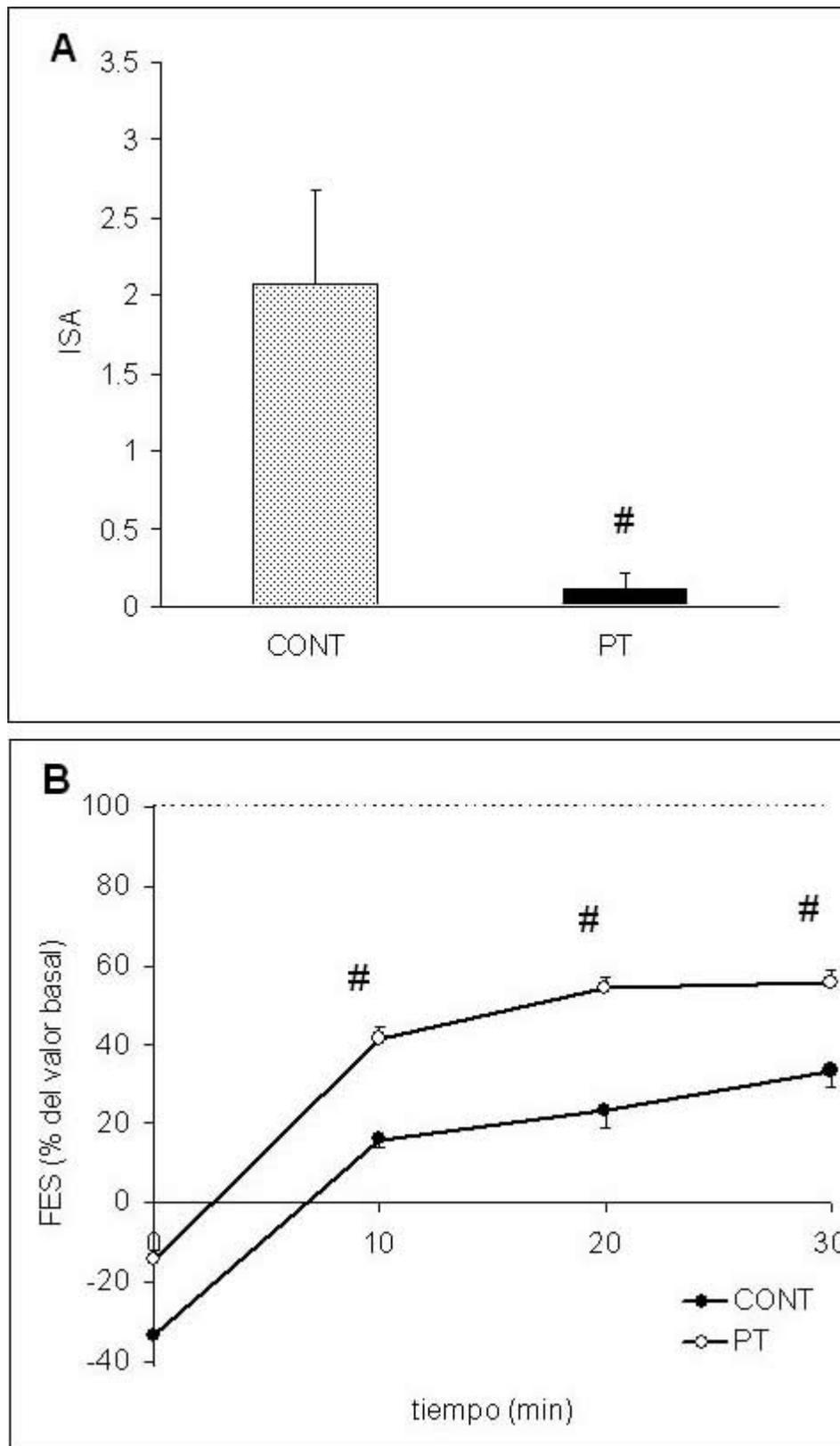
**Pfs:** presión de fin de sístole; **dP/dtmax:** derivada máxima de la presión ventricular;  
**FC:** frecuencia cardíaca; **CONT:** control; **PT:** preconditionamiento temprano;  
**PTG:** preconditionamiento temprano con glibendámda antes de la isquemia;  
**PTHMR:** preconditionamiento temprano con HMR1098 antes de la isquemia;  
**PT5HD:** preconditionamiento temprano con 5-hidroxicanoato antes de la isquemia. Media±SE;

En el grupo CONT, se generaron arritmias graves al reperfundirse el corazón luego de 12 min de isquemia. La **Figura 1** muestra en un animal los registros del ritmo sinusal durante el período basal de normoperfusión y durante la isquemia, y de TV y FV durante la reperfusión temprana.



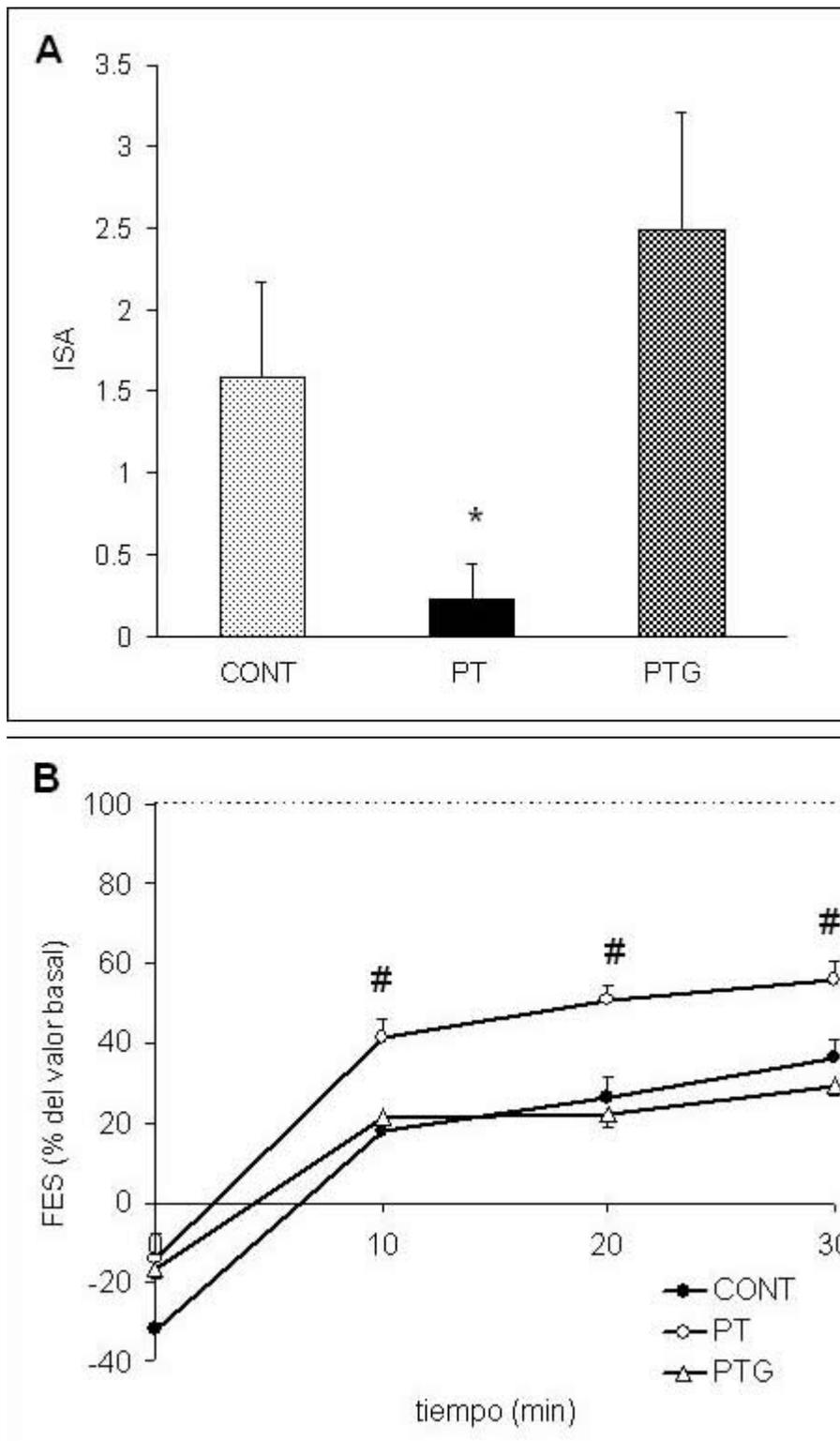
**Figura 1.** Ritmo sinusal durante la normoperfusión y la isquemia, y taquicardia y su evolución a fibrilación ventricular en el momento de la reperusión. Los tiempos durante la reperusión son segundos después de comenzada la misma.

El acondicionamiento temprano ofreció protección contra las arritmias evidenciado por un ISA significativamente reducido respecto del grupo CONT (**Figura 2A**). En estas condiciones, el 8% de los animales del grupo PT presentó únicamente extrasístoles en el momento de la reperusión y el resto no mostró alteraciones del ritmo sinusal en ningún momento de la experiencia.



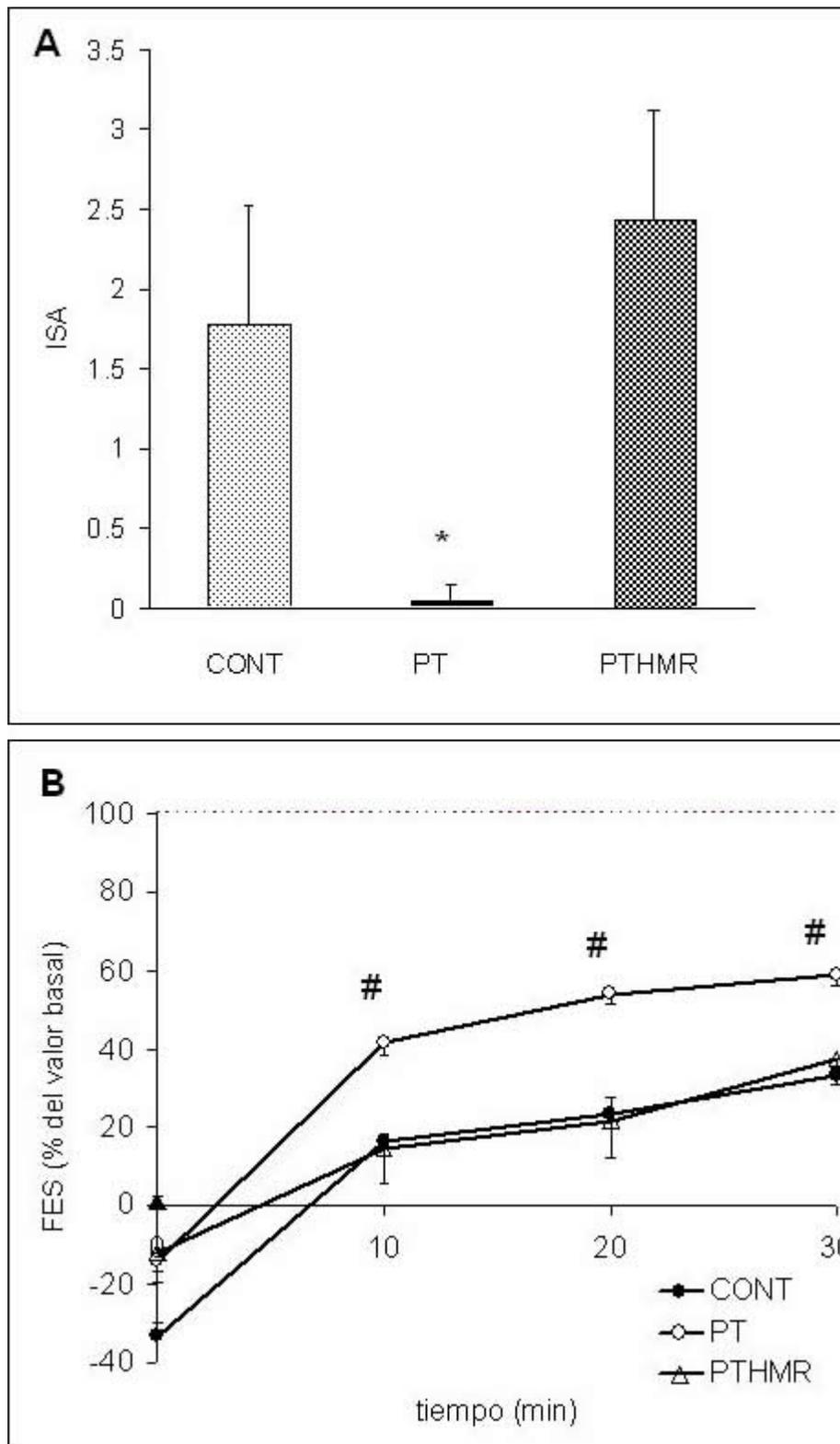
**Figura 2. A:** Índice de severidad de arritmias (ISA) en Control (CONT) y preconditionamiento temprano (PT). Media±SE, # P<0.01 vs CONT (test de Student). CONT (N=14), PT (N=9). **B:** Fracción de espesamiento sistólico (FES), expresado como % del valor basal. Media±SE, # P<0.01 vs CONT

La administración de glibenclamida tuvo un efecto adverso sobre la protección conferida por PT contra las arritmias, no solamente aboliendo la disminución en el valor de ISA obtenida en el grupo PT sino incrementando, aunque no significativamente, el desencadenamiento de episodios arritmicos respecto de CONT (**Figura 3A**).



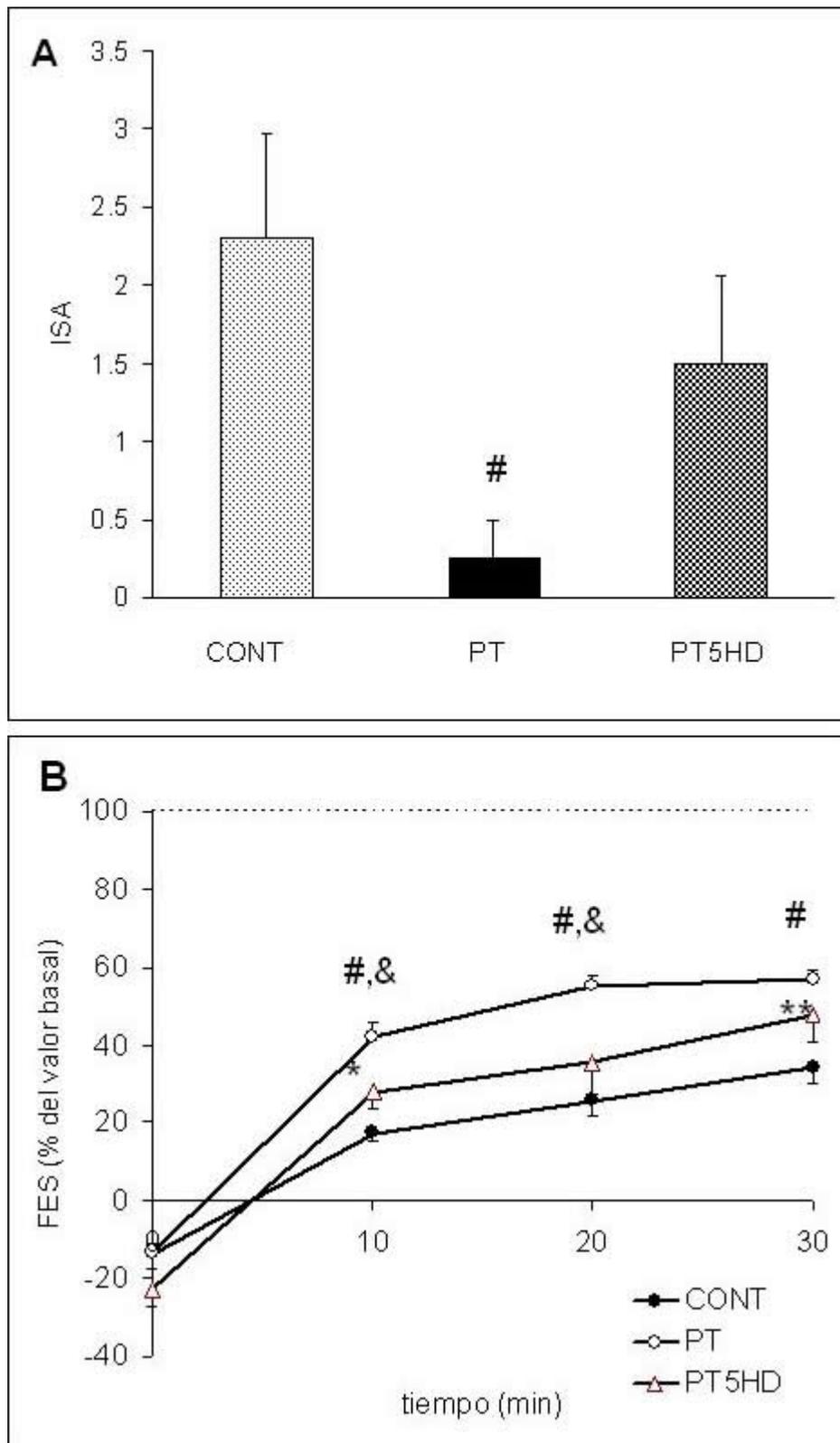
**Figura 3.** **A:** Índice de severidad de arritmias (ISA) en Control (CONT), preconditionamiento temprano (PT) y PT con glibenclamida (PTG). Media±SE, \*P<0.05 PT vs CONT y PTG (ANOVA seguido de Scheffé). CONT (N=12), PT (N=9), PTG (N=8). **B:** FES como % del valor basal. Media±SE, # P<0.01 vs CONT.

El HMR1098 tuvo un efecto potenciador de las arritmia semejante a lo obtenido con glibenclamida, eliminando no sólo la protección del preconditionamiento, sino incrementando, aunque no significativamente, los episodios arrítmicos por encima de los del grupo CONT (**Figura 4A**).



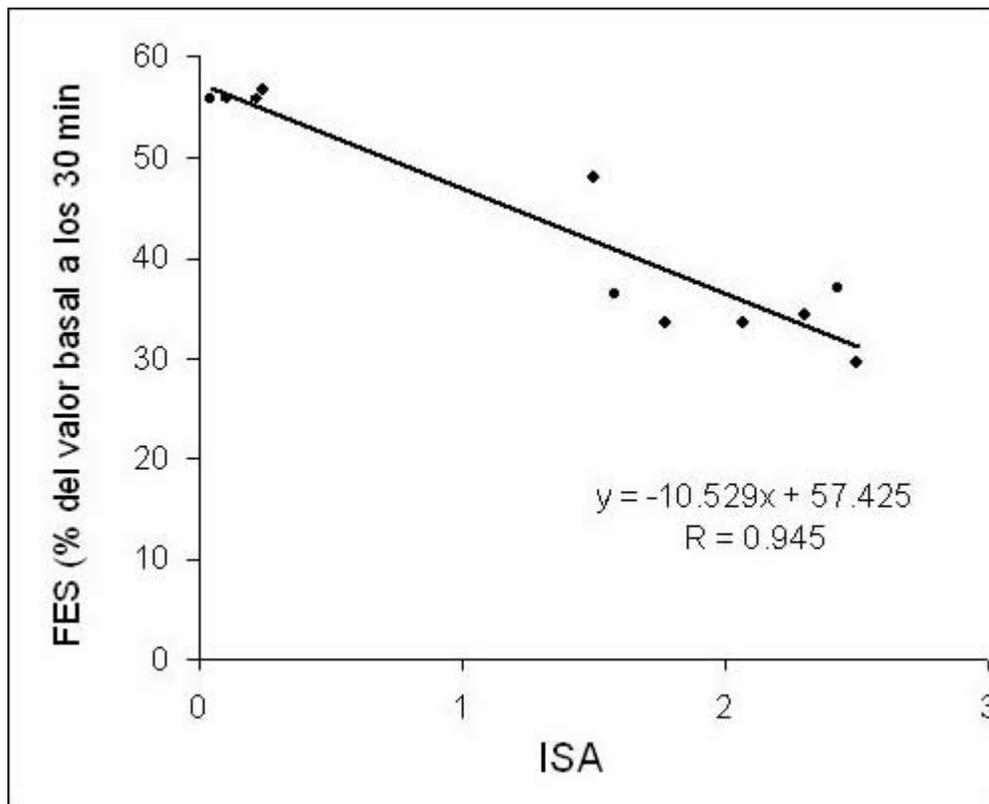
**Figura 4. A:** Índice de severidad de arritmias (ISA) en Control (CONT), preconditionamiento temprano (PT) y PT con HMR-1098 (PTHMR). Media±SE, \* P<0.05 PT vs CONT y PTHMR(ANOVA seguido de Scheffé). CONT (N=9), PT (N=6); PTHMR (N=7). **B:** FES como % del valor basal. Media±SE, # P<0.01 vs CONT.

El 5-HD tuvo una respuesta intermedia en la inhibición de la arritmias, ya que no evidenció diferencias significativas respecto del grupo CONT ni PT. Tampoco tuvo un efecto promotor de las mismas como fuera observado con glibenclamida y HMR1098, ya que el grupo PT5HD mostró una tendencia a disminuir la incidencia de episodios arritmicos respecto del grupo CONT (**Figura 5A**).



**Figura 5. A:** Índice de severidad de arritmias (ISA) en Control (CONT), preconditionamiento temprano (PT) y PT con 5-HD (PT5HD). Media±SE. # P<0.01 vs CONT (ANOVA seguido de Scheffé). CONT (N=10), PT (N=8), PT5HD (N=6). **B:** FES como % del valor basal. Media±SE, \* P<0.05 vs CONT; # y \*\* P<0.01 vs CONT; & P<0.01 vs PT5HD (ANOVA seguido de Scheffé).

La respuesta eléctrica del corazón estuvo en todos los grupos en concordancia con la respuesta mecánica (**Figura 6**), observándose una mayor recuperación de la fracción de espesamiento durante los 30 primeros minutos de reperfusión en el grupo PT en comparación con el CONT (**Figura 2B**), la cual fue abolida por completo en los grupos GLI y HMR (**Figuras 3B y 4B**) y parcialmente en el grupo 5-HD (**Figura 5B**).



**Figura 6.** Relación entre la media de la fracción de espesamiento sistólico (FES) a los 30 min de reperusión, y la media del índice de severidad de arritmias (ISA) para los grupos CONT, PT, PTG, PTHMR y PT5HD. FES está expresada como % de recuperación respecto del valor basal considerado como 100%

## DISCUSIÓN.

El presente estudio demuestra que existe preconditionamiento isquémico temprano contra las arritmias y el atontamiento postisquémico en animales conscientes y que los KATP participan como efectores del mecanismo protector. Dentro de los KATP, se comprobó una participación muy manifiesta de los KATP sarcolemales como efectores de la salvaguardia contra las arritmias, ya que su apertura, que reduce la duración del potencial de acción evitando la sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , fue completamente abolida por glibenclamida y HMR1098, inhibidores inespecífico y específico, respectivamente, de estos canales. Por otra parte, los KATP mitocondriales parecen ser menos importantes como efectores del mecanismo de defensa, debido a que el antagonista específico de su apertura (5-HD) produjo una inhibición más débil del preconditionamiento contra las arritmias. Esta variación en el grado de participación de los KATP sarcolemales y mitocondriales se manifestó de manera similar en el caso de la respuesta mecánica al PT.

Diversos trabajos [6-8] han comprobado el papel de salvaguardia contra las arritmias provisto por PT. Sin embargo, el único estudio que analizó protección contra las arritmias por PT inducido por 10 episodios de 2 min de isquemia-2 min de reperusión en cerdos conscientes, no encontró variaciones respecto de control cuando se consideraron latidos ectópicos o taquicardia ventricular luego de 40 min de isquemia [4]. A diferencia de este trabajo, el presente estudio estableció defensa contra la incidencia de arritmias de reperusión en animales conscientes frente a una isquemia sostenida reversible, lo que permitió analizar la protección sin los efectos agregados que puede producir la muerte celular.

La importancia de los KATP sarcolemales y mitocondriales en el mecanismo del preconditionamiento temprano es aún discutido. En un principio se asumió que la apertura de los KATP sarcolemales durante la isquemia, con la consiguiente disminución de la duración del potencial de acción, protegían al miocardio disminuyendo la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  [22-23]. Este mecanismo, respaldado por la inhibición de la protección con glibenclamida [24-25] fue posteriormente cuestionado debido al hallazgo de preconditionamiento farmacológico sin que hubiera reducción de la duración del potencial de acción [26], desplazando la atención hacia los KATP mitocondriales como agentes de protección [27]. Merced al descubrimiento de las sulfotioureas, HMR1833 y su sal sódica HMR1098 [28] como inhibidores selectivos de los KATP sarcolemales, se pudo luego comprobar la participación de ambos tipos de canales en el mecanismo de defensa del preconditionamiento [29-31].

No obstante, en relación a la participación de los KATP sarcolemales en la protección contra las arritmias, diversos estudios de isquemia sin preconditionamiento en corazón aislado de rata [32], de protección por ejercicio antes de una isquemia reversible en conejos [33] o ratas [34] o de estimulación intermitente antes de un episodio prolongado de isquemia en corazón embrionario de pollo [35] han hallado que el cierre de estos canales protege en lugar de inhibir las alteraciones eléctricas. Estos resultados contrastan con los obtenidos en ovejas conscientes, donde la inhibición de los KATP con glibenclamida promovió el desencadenamiento de arritmias de reperusión luego de una isquemia de 12 min de duración [17]. Por otra parte, Light y col. [30] encontraron que la inhibición de los KATP

sarcolemas con HMR1089 producía un incremento pronunciado del Ca<sup>2+</sup> intracelular en miocitos aislados luego de un período de hipoxia inducida por fármacos, y este aumento podría estar vinculado al desencadenamiento de arritmias [36-37].

Los resultados obtenidos en este trabajo se podrían atribuir al uso de una especie animal diferente, al protocolo experimental en animales conscientes, o a las dosis y/o falta de especificidad de las drogas utilizadas para inhibir los KATP. En el caso del 5-HD, para comprobar si la falta de un mayor bloqueo de las arritmias se debía a una dosis insuficiente, se hicieron pruebas piloto a una dosis de 10 mg/kg, con resultados similares (no publicados) a los obtenidos con 5 mg/kg, que es la dosis usada corrientemente en otros estudios, lo que permite descartar un efecto limitante de la dosis como explicación de la falta de respuesta de los KATP mitocondriales frente al 5-HD. Asimismo, existen evidencias que indican que el 5-HD también podría actuar sobre los KATP sarcolemas [38], indicando una especificidad relativa de este inhibidor. En el caso del HMR1098, la dosis de 12 mg/kg fue la logró inhibición total de los KATP sarcolemas aunque la dosis de 3 mg/kg utilizada en la mayoría de los trabajos es capaz de inhibir la protección por acondicionamiento contra el atontamiento [19].

### CONCLUSIONES.

El presente estudio ha contribuido a demostrar la participación de los KATP sarcolemas como efectores de la protección contra las arritmias en un modelo de mamífero grande consciente, lo que sugiere que las drogas inhibitorias utilizadas clínicamente, como por ejemplo la glibenclamida, deberían ser usadas con prudencia.

### RECONOCIMIENTOS.

Los autores agradecen al Dr Goegelein de Aventis Pharma, la generosa donación del HMR-1098. Este trabajo se realizó con el apoyo del subsidio Préstamo BID PICT-2008-0340.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen MV, Guang S, Liu GS, et al. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation* **1991**; 84: 341-349.
2. Li YW, Whittaker P, Kloner RA. The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J* **1992**; 123: 346-353.
3. Mosca SM, Gelpi RJ, Cingolani HE. Dissociation between myocardial relaxation and diastolic stiffness in the stunned heart: its prevention by ischemic preconditioning. *Mol Cell Biochem* **1993**; 129: 171-178.
4. Qiu Y, Tang XL, Park SW, et al. The early and late phases of ischemic preconditioning. A comparative analysis of their effects on infarct size, myocardial stunning, and arrhythmias in conscious pigs undergoing a 40-minute coronary occlusion. *Circ Res* **1997**; 80: 730-742.
5. Gelpi RJ, Morales C, Cohen MV, et al. Xanthine oxidase contributes to preconditioning's preservation of left ventricular developed pressure in isolated rat heart: developed pressure may not be an appropriate end-point for studies of preconditioning. *Basic Res Cardio* **2002**; 197: 40-46.
6. Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol* **1987**; 22: H1470-H1476.
7. Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Protective effects of preconditioning of the ischemic myocardium involve cyclooxygenase products. *Cardiovasc Res* **1990**; 24: 1020-1023.
8. Vegh A, Komori S, Szekeres L, et al. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res* **1992**; 26: 487-495.
9. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* **1995**; 92: 1064-1065
10. Papadopoulos CE, Karvounis HI, Gourasas, IT, et al. Evidence of ischemic preconditioning in patients experiencing first non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI). *Int J Cardiol* **2003**; 92: 209-217.
11. Solomon SD, Anavekar NS, Greaves S, et al. Angina pectoris prior to myocardial infarction protects against subsequent left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* **2004**; 43: 1511-1514.
12. Papadopoulos CE, Zioutas DG, Giannakoulas GA, et al. Beneficial effect of ischemic preconditioning on post-infarction left ventricular remodeling and global left ventricular function. *Cardiovasc Revasc Med* 2011; 12 (5):286-291.
13. Okazaki Y, Kodama K, Sato H, et al. Attenuation of increased regional myocardial oxygen consumption during exercise as a major cause of warm-up phenomenon. *J Am Coll Cardiol* **1993**; 21: 1597-1604.
14. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhalafi AM, et al. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* **1997**; 77: 314-318.
15. Qiu Y, Tang XL, Park SW, et al. The early and late phases of ischemic preconditioning. A comparative analysis of their effects on infarct size, myocardial stunning, and arrhythmias in conscious pigs undergoing a 40-minute coronary occlusion. *Circ Res* **1997**; 80: 730-742.
16. Lascano EC, Negroni JA, del Valle HF, et al. Left ventricular systolic and diastolic function in conscious sheep undergoing ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* **1999**; 41: 77-86.
17. del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA, et al. Glibenclamide affects reperfusion-induced malignant arrhythmias and left ventricular mechanical recovery from stunning in conscious sheep. *Cardiovasc Res* **2001**; 50: 474-485.
18. Negroni JA, Lascano EC, del Valle HF, et al. ATP-sensitive potassium channels do not have a main role in mediating late preconditioning protection against arrhythmias and stunning in conscious sheep. *Basic Res Cardio* **2002**; 97: 55-64.
19. 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.

20. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, et al. The Lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction and reperfusion. *Cardiovasc Res* **1988**; 22: 447-455.
21. Das B, Sarkar C, Karanath KS. Selective mitochondrial KATP channel activation results in antiarrhythmic effect during experimental myocardial ischemia/reperfusion in anesthetized rabbits. *Eur J Pharmacol* **2002**; 437: 165-171.
22. Cole WC, Mc Pherson CD, Sontag D. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* **1991**; 69: 571-581.
23. Shigematsu S, Sato T, Abe T, et al. Pharmacological evidence for the persistent activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in early phase of reperfusion and its protective role against myocardial stunning. *Circulation* **1995**; 92: 2266-2275.
24. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* **1992**; 70: 223-233.
25. Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol* **1994**; 267: H1341-H1352.
26. Yao Z, Gross GJ. Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* **1994**; 89: 1769-1775.
27. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* **2004**; 94: 420-432.
28. Englert HC, Gerlach U, Goegelein H, et al. Cardioselective K(ATP) channel blockers derived from a new series of m-anisamidoethylbenzenesulfonylthioureas. *J Med Chem* **2001**; 44 (7): 1085-1098.
29. Toyoda Y, Friehs I, Parker RA, et al. Differential role of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol* **2000**; 279: H2694-2703.
30. Light PE, Kanji HD, Manning Fox JE et al. Distinct myoprotective roles of cardiac sarcolemmal and mitochondrial KATP channels during metabolic inhibition and recovery, *FASEB J* **2001**; 15: 2586–2594.
31. Gross GJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol* **2003**; 285: H921–H930.
32. Matejková J, Ravingerová T, Pancza D, et al. Mitochondrial KATP opening confers protection against lethal myocardial injury and ischaemia-induced arrhythmias in the rat heart via PI3K/Akt-dependent and -independent mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol* **2009**; 87 (12):1055-1062.
33. Das B, Sarkar C. Is the sarcolemmal or mitochondrial K(ATP) channel activation important in the antiarrhythmic and cardioprotective effects during acute ischemia/reperfusion in the intact anesthetized rabbit model? *Life Sci* **2005**; 77 (11):1226-1248.
34. Quindry JC, Schreiber L, Hosick P, et al. Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *Am J Physiol* **2010**; 299 (1):H175-H183.
35. Bruchez P, Sarre A, Kappenberger L, et al. The L-Type Ca<sup>+</sup> and KATP channels may contribute to pacing-induced protection against anoxia-reoxygenation in the embryonic heart model. *J Cardiovasc Electrophysiol* **2008**; 19 (11):1196-1202.
36. Brooks WW, Conrad CH, Morgan JP. Reperfusion induced arrhythmias following ischaemia in intact rat heart: role of intracellular calcium. *Cardiovasc Res* **1995**; 29 (4): 536-542.
37. Katra RP, Laurita KR Cellular mechanism of calcium-mediated triggered activity in the heart. *Circ Res* **2005**; 96 (5): 535-542.
38. Bernardo NL, Okubo S, Maaieh MM, et al. Delayed preconditioning with adenosine is mediated by opening of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rabbit heart. *Am J Physiol* **1999**; 277: H128-H135.

Publicación: Marzo 2013