



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

*Precondicionamiento farmacológico en el músculo esquelético:
modulación de la homeostasis del calcio y participación de las
especies reactivas de oxígeno*

**Tesis que presenta la
M. en C. María del Rosario Solís Pancoatl
para obtener el grado de
Doctora en Ciencias
en la especialidad de
Farmacología**

**Directores de Tesis:
Dra. María del Carmen García García
Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez**

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Farmacología bajo la tutoría de la Dra. María del Carmen García García y del Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez mediante el apoyo del CONACYT a través de la beca N° 206896 y con el apoyo del CONACYT donativo 0102100.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen García García y al Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme a siempre tener la mente abierta ante nuevas ideas, a buscar la excelencia en mi trabajo y estar siempre dispuesta a nuevos retos. Todas sus enseñanzas enriquecieron enormemente mi formación científica. También les agradezco que no sólo me brindaron su apoyo en el aspecto académico sino también en el ámbito personal, por todo su apoyo les estaré inmensamente agradecida.

A mis sinodales el Dr. Benjamín Florán Garduño, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza y Dr. José Antonio Terrón Sierra por todas sus opiniones que enriquecieron el proyecto.

A la Dra. Elba Carrilo por brindarme su apoyo en la realización de los experimentos de biología molecular y por todas sus opiniones acertadas que me permitieron tener una manera más amplia de abordar diferentes cuestiones científicas.

A la Q.F.B. Ascención Hernández por todo su apoyo durante las diferentes etapas experimentales del proyecto. También quiero agradecerle porque más allá de lo profesional me apoyó siempre como sólo lo hacen los verdaderos amigos.

A la Enf. Eva Delgado Sandoval por su apoyo técnico para la realización de diferentes experimentos y sobre todo apoyarme durante mi estancia en el laboratorio gracias por brindarme tu amistad.

Al Sr. Oscar Ramírez por su apoyo técnico en la realización de este proyecto, así como por brindarme su amistad

DEDICATORIAS

A Dios por haberme regalado un día la vida y permitirme acercarme a la ciencia y descubrir la maravilla que es la vida.

A mí mamá Teresa que aunque ya no estás conmigo siempre serás parte de todos mis logros, sólo tú podrías entender lo importante que era para mí estudiar mi doctorado. Gracias por ser mi motivación en la vida.

A Yasmin que me ha acompañado en diferentes etapas de este maravilloso viaje que es la vida, gracias por ser mi pilar en momentos difíciles.

A mi papá Virgilio que me ha apoyado en mis decisiones y a mis hermanas, Lupita, Estela, Aurora y a mi hermano Efraín que siempre han creído en mí y me han brindado su cariño de manera incondicional.

ÍNDICE

Resumen

Summary

Introducción

1. Fisiología del músculo esquelético	11
1.1 Músculo esquelético.....	11
1.2 Ión Ca ²⁺ en el músculo esquelético.....	11
1.3 Mecanismo del acople excitación-contracción en el músculo esquelético.....	12
1.4 Proceso de relajación del músculo esquelético y la bomba SERCA.....	14
1.5 Parvalbúmina en la relajación del músculo esquelético.....	15
2. Fisiopatología de la isquemia – reperfusión en el músculo esquelético	17
2.1 Lesiones producidas durante la isquemia.....	18
2.2 Cambios en la homeostasis de los iones por la isquemia.....	19
2.3 Lesiones producidas en la reperfusión.....	20
2.4 Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.....	21
2.5 Especies Reactivas de Oxígeno.....	22
3. Precondicionamiento isquémico	24
3.1 Precondicionamiento en el músculo esquelético.....	26
3.2 Segunda ventana de protección del precondicionamiento.....	27
4. Precondicionamiento farmacológico	28
5. Mecanismos de protección del precondicionamiento	29
5.1 Canales de potasio dependientes de ATP en la mitocondria (mK _{ATP}).....	30
5.2 Especies Reactivas de Oxígeno.....	31
5.3 Efecto protector de la Parvalbúmina.....	32

6. Justificación	34
7. Hipótesis	34
8. Objetivo general	35
9. Objetivos particulares	35
10. Materiales y métodos	36
10.1 Animales y preparación de músculos.....	36
10.2 Cultivo de células C2C12.....	36
10.3 Análisis de las corrientes de Ca ²⁺ en la línea celular C2C12.....	36
10.4 Protocolos de tratamiento para estudiar el preconditionamiento.....	37
10.5 Daño por isquemia y reperfusión.....	38
10.6 Estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno.....	39
10.7 Determinación de la viabilidad celular por el ensayo MTT.....	41
10.8 Disociación de fibras musculares.....	41
10.9 Protocolo de estimulación.....	42
10.10 Medición de transitorios de Ca ²⁺	42
10.11 Calibración de las señales de Fluo-3.....	44
10.12 Análisis por <i>western blot</i>	44
10.13 Análisis estadístico.....	45
11. Resultados	46
11.1 Cultivo de células C2C12.....	46
11.2 Efecto del preconditionamiento farmacológico temprano sobre los transitorios de Ca ²⁺	48
11.2.1 Registros electrofisiológicos y transitorios de Ca ²⁺ en la línea celular C2C12 tratada con diazóxido.....	48
11.2.2 Transitorios de Ca ²⁺ en fibras disociadas tratadas con diazóxido.....	51

11.3 Efecto del preconditionamiento farmacológico tardío sobre los transitorios de Ca^{2+}	52
11.4 Transitorios de Ca^{2+} y la bomba SERCA.....	53
11.5 Análisis de la fase de caída de las señales de Ca^{2+} en el preconditionamiento farmacológico tardío	55
11.5.1 Fase de caída de los transitorios de Ca^{2+} después de un estímulo simple....	55
11.5.2 Fase de caída de los transitorios de Ca^{2+} después de una estimulación repetitiva.....	56
11.6 Aumento de la expresión de la parvalbúmina.....	58
11.7 Segunda ventana de protección del preconditionamiento farmacológico.....	60
11.7.1 Estrés oxidativo con H_2O_2 en músculos EDL.....	60
11.7.2 Hipoxia y reoxigenación en músculos FBD.....	60
11.8 Especies reactivas de oxígeno (ROS) en el preconditionamiento.....	62
11.8.1 Efecto protector del preconditionamiento y las ROS.....	62
11.8.2 Parvalbúmina y las ROS.....	64
11.8.3 Participación de las ROS en el preconditionamiento sobre las señales de calcio.....	65
12. Discusión	67
12.1 Efecto agudo del diazóxido sobre los transitorios de Ca^{2+}	68
12.2 Señales de calcio en la segunda ventana de protección.....	69
12.3 Evidencia de la importancia de la parvalbúmina en el preconditionamiento tardío...	70
12.4 Preconditionamiento farmacológico con diazóxido.....	71
12.5 Las ROS en el preconditionamiento.....	73
12.6 Mecanismo de protección inducido por el preconditionamiento en el músculo esquelético durante la segunda ventana de protección.....	74

13. Conclusiones	76
14. Perspectivas	77
15. Bibliografía	78
16. Anexos	87

Resumen

Murry y cols (1986) describieron el proceso de preconditionamiento, un mecanismo endógeno de protección que se ponía de manifiesto exponiendo al corazón a periodos breves de isquemia y de reperfusión antes de someterlo a un periodo prolongado de isquemia. El resultado fue una reducción del 70 % en la zona infartada del corazón producida por la isquemia prolongada. El preconditionamiento es un fenómeno bifásico, es decir, inicialmente se produce una primera fase de protección que tiene una duración de 2 h a 3 h, y una segunda fase de protección que aparece entre 12 h y 24 h después del estímulo preconditionante y tiene una duración de 3 a 4 días. El preconditionamiento se puede imitar por fármacos como el diazóxido, el cual produce la apertura de los canales de potasio mitocondriales sensibles a ATP (mitoK_{ATP}). A este fenómeno se le ha llamado preconditionamiento farmacológico (PF).

Algunos cambios en el Ca²⁺ intracelular durante la primera fase del preconditionamiento han sido descritos en cardiomiocitos. Sin embargo, no existe información sobre los posibles cambios en el Ca²⁺ intracelular durante la primera y segunda fase de protección del preconditionamiento en fibras de músculo esquelético.

En el presente trabajo en fibras disociadas de músculos de ratón se midieron las señales intracelulares de Ca²⁺ con el indicador Fluo-3 48 h después de administrar diazóxido (PF tardío). Por *western blot* se determinaron los niveles de la proteína parvalbúmina. Para medir la protección producida por el PF tardío los músculos se sometieron a un daño por isquemia–reperfusión y a un daño por estrés oxidativo. Se midió la viabilidad por medio del ensayo de MTT.

El PF tardío produjo una disminución en el curso temporal de las señales de Ca²⁺ durante la sacudida simple y por estimulación repetitiva. Este fenómeno se vio acompañado de un incremento de 30 % en los niveles de la parvalbúmina. Asimismo, el PF tardío produjo un aumento modesto de la viabilidad celular en los dos modelos de daño celular. El tiron, un atrapador de las especies reactivas de oxígeno revirtió tanto el efecto protector del diazóxido como la disminución del curso temporal de las señales de Ca²⁺; además evitó de manera parcial el aumento en la expresión de la parvalbúmina.

Estos resultados sugieren que una disminución en la duración de las señales de Ca^{+2} por la sobreexpresión de la parvalbúmina puede tener un efecto protector en el músculo esquelético en condiciones de isquemia al disminuir la sobrecarga de calcio.

Summary

In 1986, Murry et al., reported that brief periods of myocardial ischemia could confer resistance to subsequent long-lasting periods of ischemia in the same tissue bed. The volume of an experimentally induced myocardial infarct was 70 % smaller in preconditioned hearts as compared with controls. This canine experiment was quickly reproduced in other animal models and different organ systems, including skeletal muscle. Preconditioning was found to be a biphasic phenomenon, with an early phase of protection that develops within minutes from the initial ischemic insult and lasts 2 to 3 hours and a late phase that becomes apparent 12 to 24 hours later and lasts 3 to 4 days. Ischemic preconditioning can be mimicked by pharmacological agents like diazoxide, which, among other activities, opens mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. This phenomenon has been referred to as pharmacological preconditioning (PPC).

During the early phase of preconditioning some effects on Ca^{2+} homeostasis have been described in cardiomyocytes, but no information is available regarding intracellular Ca^{2+} changes in skeletal muscle fibers during the early and late phase of preconditioning.

Intracellular Ca^{2+} signals were measured in single fibers of adult mouse skeletal muscle with fluorescent probes 48 h after administration of diazoxide. Parvalbumin levels in the myofibers were quantitated by western blot. Protection by diazoxide against peroxide-induced damage and ischemic-reperfusion damage was assessed using MTT assay.

Diazoxide-induced of late PPC was confirmed by partial protection of muscles from peroxide-induced damage and ischemic-reperfusion damage. This protection was blocked by the reactive oxygen species (ROS) scavenger tiron. Late PPC was associated with a significant decrease in the duration of Ca^{2+} signals during single twitches and tetanus with no changes in peak values. This effect was prevented by tiron. Late PPC was accompanied by a 30 % increase in parvalbumin levels, and this effect was partially blocked by tiron.

In conclusion, we found that the late phase PPC in skeletal muscle involves overexpression of parvalbumin in a ROS-dependent manner. Overexpression of parvalbumin increases the rate of Ca^{2+} removal from myoplasm during action potentials, and this may therefore protect the muscle from injury.

INTRODUCCIÓN

1. FISIOLOGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

1.1 Músculo esquelético

En los mamíferos el músculo esquelético constituye cerca del 40 % de la masa total y cerca del 25 % del gasto metabólico. Aproximadamente la mitad de la masa muscular está compuesta de fibras lentas y la otra mitad de fibras rápidas (fibras tipo I y fibras tipo II respectivamente). Una pequeña cantidad de fibras súper-rápidas y verdaderas-lentas se encuentra en músculos especializados como son los del ojo y de la mandíbula (véase revisión por Baylor y Hollingworth 2012)

Las fibras lentas se caracterizan por ser más resistentes a la fatiga en comparación con las fibras rápidas, esto se debe a que contienen una mayor cantidad de mitocondrias y una alta actividad de enzimas oxidativas. La principal diferencia entre los dos tipos de fibras está relacionada con su cinética de contracción. Por ejemplo, en una sacudida simple el tiempo al pico y el tiempo entre el pico y la mitad de la relajación es de 3 a 5 veces más largo en músculos lentos como el *sóleo* en comparación con músculos rápidos como el *extensor digitorum longus (EDL)* (véase revisión por Baylor y Hollingworth 2012). Parte de las diferencias en la cinética de contracción se deben a la mayor expresión de la bomba SERCA (*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*) en fibras rápidas en comparación con las fibras lentas (véase revisión por Westerblad et al., 2010). Además, las fibras rápidas expresan la proteína parvalbúmina (PV) que actúa como una de las principales proteínas en el proceso de relajación (Heizmann et al., 1982).

1.2 Ión Ca^{2+} en el músculo esquelético

El ion Ca^{2+} es un segundo mensajero intracelular muy importante en las células eucariotas, está involucrado en procesos celulares como la motilidad celular, el acople excitación-contracción, la transmisión de impulsos nerviosos, la liberación de neurotransmisores, la permeabilidad de la membrana, y los procesos secretorios. Además, también participa en la regulación de genes, ya sea indirectamente a través de vías de

señalización que dependen de Ca^{2+} /CaM cinasa, o por su acción directa sobre proteínas transcripcionales como DREAM.

La concentración de Ca^{2+} en el citoplasma en condiciones de reposo es muy baja, alrededor de 50 nM, mientras que en el medio extracelular está en el orden de 1 mM. Dentro de las células eucariotas existen organelos que almacenan grandes cantidades de Ca^{2+} como son el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias. Cuando las células son estimuladas, el Ca^{2+} es movilizado ya sea del espacio extracelular o de los almacenes intracelulares hacia el citoplasma, como resultado las concentraciones de Ca^{2+} se elevan y provocan una respuesta celular (véase revisión por Endo 2006).

La homeostasis del Ca^{2+} y su señalización esta mediada por diferentes mecanismos entre los que se encuentran aquéllos que conllevan a un incremento en la concentración intracelular y aquéllos que tienden a disminuirla, estos mecanismos involucran una gran diversidad de bombas, canales iónicos y transportadores que se localizan en la membrana plasmática y en organelos intracelulares, como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria (véase revisión por Gissel 2005). La homeostasis también es mantenida gracias a proteínas citosólicas que unen Ca^{2+} como la PV.

1.3 Mecanismo de acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético

En los músculos estriados, los mecanismos de contracción y relajación están regulados por cambios en la concentración del Ca^{2+} libre citoplásmico. El fenómeno de acoplamiento excitación-contracción representa una comunicación rápida entre los eventos eléctricos que ocurren en la membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, que lleva a la contracción muscular.

El acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético, cuya representación esquemática se muestra en la figura 1 involucra: (1) la iniciación y propagación de un potencial de acción a lo largo de la membrana plasmática y del sistema de túbulos transversos o túbulos T; (2) la detección de los cambios en el potencial de membrana por parte de los receptores de dihidropiridinas (DHPR); (3) la transmisión de la señal a los receptores de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico; (4) la liberación de Ca^{2+} del

retículo sarcoplásmico; (5) el aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma; (6) la activación transitoria del sistema amortiguador de Ca^{2+} y del aparato contráctil; (7) finalmente la recaptura del Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (Fig. 1).

El inicio de un potencial de acción en las fibras musculares empieza por la acción del neurotransmisor acetilcolina liberado en la placa motora por una motoneurona inferior, que origina una despolarización de la membrana. En condiciones de reposo el potencial de membrana es de alrededor de -80 mV de modo que cuando la célula sufre una despolarización éste alcanza un potencial de membrana de +30 mV; esta despolarización es seguida por una repolarización. En la despolarización participan principalmente los canales de Na^+ dependientes del voltaje, mientras que en la repolarización están involucrados los canales de K^+ dependientes del voltaje. El potencial de acción generado en la membrana plasmática se propaga longitudinalmente a lo largo de la fibra y transversalmente a través de los túbulos T, mediante un proceso regenerativo y dependiente de sodio (véase revisión por MacIntosh et al., 2012). Los túbulos T son invaginaciones de la membrana plasmática que se extienden transversalmente en las fibras musculares y sirven como medio para llevar información eléctrica desde la superficie hasta el interior de la fibra muscular, particularmente hacia la membrana del retículo sarcoplásmico. En los túbulos T, específicamente en los segmentos asociados con el retículo sarcoplásmico, se encuentran los DHPRs, cuya función es regulada por el potencial de membrana, razón por la que se conocen como sensores de voltaje. El cambio de voltaje induce en estos receptores cambios conformacionales que se transmiten a los receptores de rianodina localizados en el retículo sarcoplásmico, siendo el resultado de esta interacción la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico al citoplasma (Tanabe et al., 1988; Beam y Horowicz, 2004). Una vez liberado, el Ca^{2+} se difunde en milisegundos, llegando a interactuar con la troponina C. La interacción del Ca^{2+} con la troponina C suspende la inhibición que la troponina I y la tropomiosina ejercen sobre la interacción actina-miosina, lo que permite el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos y la generación de tensión (véase revisión por Endo 2006).

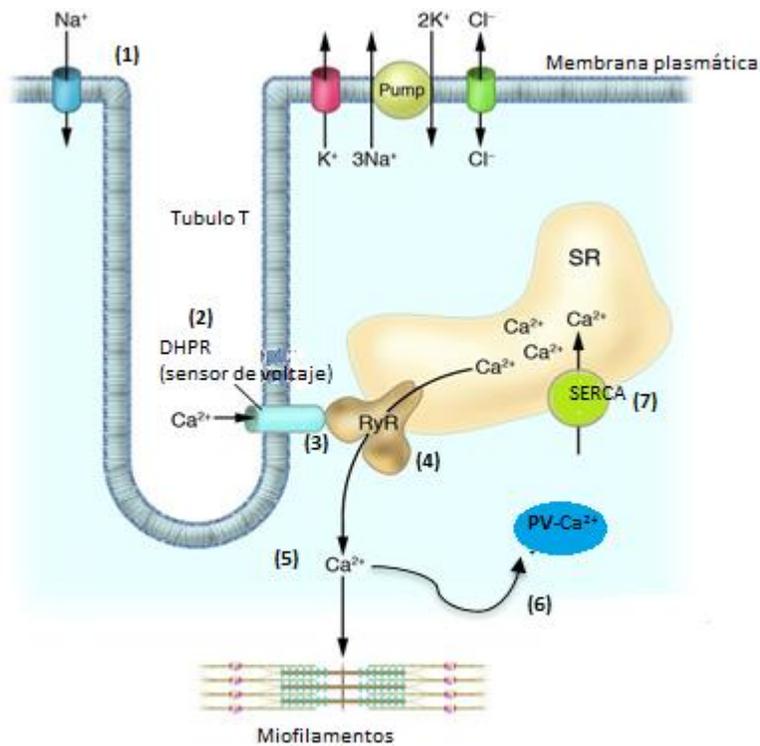


Figura 1. Esquema representativo del acople excitación-contracción del músculo esquelético. Véase el texto para su descripción.

1.4 Proceso de relajación del músculo esquelético y la bomba SERCA

Para que la relajación se lleve a cabo es necesario que las concentraciones de Ca^{2+} regresen a su estado basal. Inicialmente el aumento del Ca^{2+} es amortiguado por las proteínas parvalbúmina y calmodulina para luego ser recapturado por la bomba SERCA. Mientras que las proteínas citosólicas amortiguan el Ca^{2+} de manera transitoria con una cinética rápida, el transporte de Ca^{2+} por la bomba SERCA hacia el interior del retículo sarcoplásmico ocurre con una cinética más lenta (véase revisión por Tupling 2009).

La bomba SERCA es una proteína de 110 kDa ubicada básicamente en la región longitudinal del retículo sarcoplásmico. Los mecanismos de su expresión y función son bastante complejos, incluyen el incremento en la concentración de Ca^{2+} , el pH, las hormonas tiroideas y las proteínas fosfolambano y sarcolipina. La interacción de la proteína

fosfolambano con la bomba SERCA inhibe su actividad, pero la fosforilación de fosfolambano (PLN) en la Ser¹⁶ por la proteína cinasa dependiente del AMP-cíclico (PKA), y en la Thr¹⁷ por la proteína cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII), produce la disociación de fosfolambano de la bomba SERCA, de manera que se revierte la función inhibitoria del fosfolambano (MacLennan y Kranias 2003). La proteína sarcolipina tiene funciones similares al fosfolambano.

Existen cambios conformacionales de los dominios citoplásmicos de la bomba SERCA que intervienen en el paso del Ca²⁺ del citoplasma al interior del retículo sarcoplásmico en contra de su gradiente de concentración, por lo que se requiere la energía del ATP. De esta manera los niveles de Ca²⁺ citoplásmico disminuyen a valores en el orden nanomolar en periodos de milisegundos, asegurando así una rápida relajación del músculo esquelético (véase revisión por Tupling 2009).

1.5 Parvalbúmina en la relajación del músculo esquelético.

La PV es una proteína que une Ca²⁺, la cual se ha encontrado en altas concentraciones en fibras musculares rápidas (fibras tipo II) (Heizmann et al., 1982). La concentración de PV se encuentra elevada por lo general en animales como la rata, ratón y peces los cuales tienen altas velocidades de contracción y relajación, por otro lado la PV se encuentra en bajas concentraciones en mamíferos como caballos o en el ser humano en los cuales la velocidad de contracción y relajación es baja en comparación de los primeros (Heizmann et al., 1982).

La PV es una proteína de bajo peso molecular (10-12.5 kDa) que tiene alta-afinidad por el Ca²⁺ (dos iones de Ca²⁺ por molécula). Estructuralmente está formada por dos motivos hélice-asa-hélice cada uno formado por una secuencia de 30 aminoácidos (motivo EF-hand). Los motivos EF-hand confieren una estructura estable a la proteína (Arif, 2009) (Fig. 2A). Genéticamente las PVs se dividen en dos categorías las α - y β - PVs (Goodman et al., 1979). Las α -PVs contienen menos residuos de aminoácidos ácidos que las β -PVs, motivo por el cual el punto isoeléctrico de las α -PVs es más alto que el de las β -PVs. Existen también diferencias en la afinidad que presentan ambas PVs a los cationes Mg²⁺ y Ca²⁺; las

β -PVs tienen un 16 % de mayor afinidad por Mg^{2+} y un 200 % mayor afinidad por Ca^{2+} en comparación con las α -PVs (Rodenbaugh et al., 2007). En músculos de rata y ratón se expresa la PV- α , mientras que en los músculos de peces se expresa principalmente la isoforma β .

En fibras musculares rápidas se ha sugerido que la PV es una de las principales proteínas que facilita el proceso de relajación, al amortiguar el aumento en la concentración de Ca^{2+} después de un potencial de acción (Carroll et al., 1997) (Fig. 2B). La función de la PV en el proceso de relajación de fibras musculares rápidas se ha demostrado en ratones *knockout* a PV (PV $-/-$) (Schwaller et al., 1999). Los músculos *EDL*, aislados de ratones *knockout* mostraron una disminución en la concentración de Ca^{2+} después de 20 ms de estimulación en comparación con los músculos de ratones silvestres (la constante de caída de Ca^{2+} fue 33 % menor en músculos *EDL* de ratones *knockout* en comparación con el testigo). Esta disminución en la caída tiene como consecuencia un incremento en el tiempo de relajación. Además, debido a la alta concentración de Ca^{2+} en el músculo, la fuerza generada durante una sacudida simple fue 40 % más alta en ratones PV ($-/-$) comparado con ratones PV ($+/-$) y PV ($+/+$).

La estimulación repetitiva del músculo tiende a saturar a la PV disponible por lo que disminuye su capacidad de unirse al Ca^{2+} para removerlo del citoplasma y de esta manera contribuir a la relajación del músculo (Raymackers et al., 2000). La constante de disociación de la PV al Ca^{2+} determina qué tan rápido puede recuperarse la PV de la saturación.

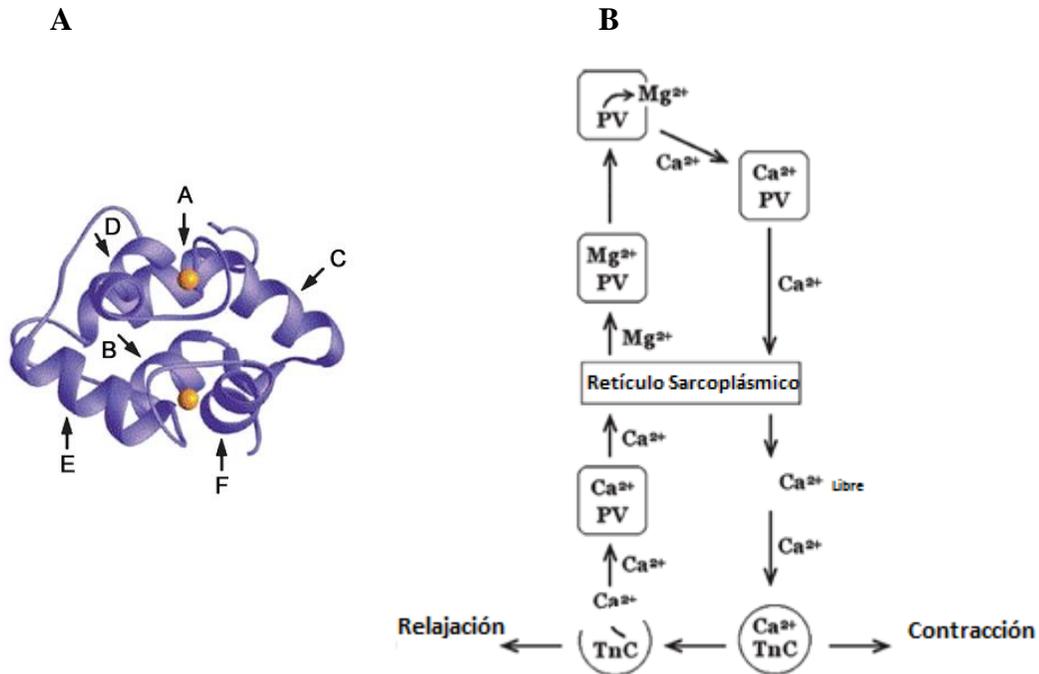


Figura 2. La parvalbúmina facilita el proceso de relajación. (A) Molécula de parvalbúmina que contiene seis hélices α llamadas A, B, C, D, E y F que forman dos motivos EF-hand. En amarillo se esquematiza la unión de dos iones de Ca^{2+} . (B) Diagrama de flujo que muestra el transporte de Ca^{2+} durante el ciclo de contracción-relajación en fibras musculares rápidas. PV: parvalbúmina; TnC: troponina C. Tomado de Arif 2009.

2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA – REPERFUSIÓN EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El calcio como ya se mencionó participa en diferentes funciones dentro de la célula, por lo que su concentración intracelular debe ser finamente controlada. Altas concentraciones dentro de la célula pueden desencadenar diferentes procesos patológicos como necrosis, apoptosis, generación de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), entre otros (véase revisión por Gissel 2005). En un proceso de isquemia-reperfusión (I/R) se ha demostrado que existe un aumento del calcio citosólico y mitocondrial que produce la activación de diferentes vías de señalización que conducen al daño de la célula (véase revisión por Murphy 2008).

Existen numerosas situaciones en las que puede ocurrir isquemia en un órgano. La isquemia se caracteriza por la falta o disminución del flujo sanguíneo y del aporte de O₂ y nutrientes al órgano. Aunque el restablecimiento del flujo sanguíneo al órgano isquémico es importante, la reperfusión genera nuevos cambios que producen un mayor daño al órgano afectado, es decir, daño por reperfusión. El conocimiento de los mecanismos de daño en el proceso de I/R es de gran interés, ya que éstos participan en la fisiopatología de varias situaciones clínicas como el infarto miocárdico, el accidente cerebrovascular, los traumatismos mayores, y en cirugías del musculo esquelético, entre otras.

Durante una I/R las células principalmente afectadas son aquellas en las que el metabolismo depende de oxígeno, como es el caso del corazón, del músculo esquelético, del cerebro, del hígado, del riñón, y del intestino (véase revisión por Pasupathy et al., 2005). En estas células la demanda energética es suministrada principalmente por el proceso de fosforilación oxidativa que ocurre dentro de las mitocondrias.

En el músculo esquelético el daño ocasionado por un proceso de I/R es inevitable en muchos traumas vasculares, como es el caso de la transferencia de tejido libre durante las cirugías reconstructivas y en el trasplante de órganos.

Existen diferentes cascadas de señalización que se ven activadas durante el desarrollo de la I/R en el músculo esquelético. Entre éstas tenemos la activación del complemento, la biosíntesis de eicosanoides, citocinas y óxido nítrico (NO), además de la formación de radicales libres, y alteraciones en el citoesqueleto, en el metabolismo del Ca²⁺ y de los fosfolípidos, así como disfunción endotelial (véase revisión por Rubin 1996).

2.1 Lesiones producidas durante la isquemia

Durante la isquemia el daño principal se produce por la falta de oxígeno. La carencia de oxígeno produce una disminución en la producción de energía en forma de ATP vía la fosforilación oxidativa, lo que resulta en una disminución en el contenido de ATP celular (véase revisión por Murphy 2008). La carencia de energía produce diferentes alteraciones intracelulares, como cambios en la homeostasis iónica, activación de hidrolasas, e incremento de la permeabilidad de las membranas celulares, así como disminución del pH

citoplasmático. La disminución en el pH se debe al aumento de la glicólisis durante la isquemia, el cual provoca la acumulación de ácido láctico. Los cambios en el pH posiblemente también se deben a la liberación de iones H^+ por los lisosomas dañados. Todas estas alteraciones llevan finalmente a la muerte celular por necrosis (véase revisión por Groot y Rauen 2007)

2.2 Cambios en la homeostasis de los iones por la isquemia

La disminución en el pH genera, entre otras cosas, disminución de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, lo que resulta a su vez en un incremento en la $[Na^+]$ intracelular. Esto tiene como consecuencia una reducción de la capacidad de la célula para restaurar el pH. El aumento en la $[Na^+]$ puede causar que la célula se hinche por cambios en la osmolaridad, lo cual puede contribuir a la ruptura de la membrana plasmática (véase revisión por Groot y Rauen, 2007).

En el músculo cardíaco se ha demostrado que existe un incremento en la $[Ca^{2+}]$ intracelular debido a la inhibición del antiporte Na^+/Ca^{2+} que usualmente bombea el Ca^{2+} fuera de la célula; se ha observado que en condiciones de isquemia este mecanismo se encuentra inhibido o incluso su función es revertida (véase revisión por Murphy, 2008). Un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} puede activar hidrolasas, como las fosfolipasas (especialmente la fosfolipasa A_2 , PLA_2) y proteasas (como las calpainas entre otras). La activación de la PLA_2 daña a los fosfolípidos de la membrana, lo que resulta en la liberación de lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. Los lisofosfolípidos pueden dañar la organización de los lípidos de la membrana, mientras que los ácidos grasos libres pueden tener una acción tipo detergente, causando daño a la membrana. Entre los ácidos grasos libres que se liberan está el ácido araquidónico, el cual produce ROS en la mitocondria. Por otro lado, las calpainas tienen una gran variedad de sustratos, entre los que se encuentran proteínas de la membrana plasmática, del citoesqueleto y de los miofilamentos; la ruptura de estas proteínas tiene como consecuencia una pérdida de la estructura del músculo esquelético y de su función (véase revisión por Gissel, 2005).

A nivel mitocondrial el Ca^{2+} tiene efectos positivos al activar enzimas de la fosforilación oxidativa; sin embargo, una sobrecarga de este ión debido a sus altas concentraciones en el citoplasma (lo que favorece su recaptura en las mitocondrias) tiene como consecuencia el desacople de la fosforilación oxidativa, exacerbando así el bajo suministro de energía. Las altas concentraciones de Ca^{2+} también pueden provocar la apertura del poro de transición de la permeabilidad, fenómeno que ha sido asociado a la activación de apoptosis vía mitocondrial o a necrosis debida al daño de las mitocondrias (véase revisión por Feissner et al., 2009).

2.3 Lesiones producidas en la reperfusión

En el periodo de reperfusión se han descrito daños muy importantes a nivel sistémico, entre los que se encuentran la formación de edema, la disfunción de la microvasculatura y la necrosis muscular. La reperfusión desencadena principalmente una respuesta inflamatoria que empeora la lesión producida por la isquemia. El daño que ocurre en las etapas iniciales de la reperfusión ha sido asociado a las alteraciones intracelulares que ocurren durante el periodo de isquemia, debido a que cuando se produce la restauración del flujo sanguíneo al tejido isquémico se vierten al torrente circulatorio los metabolitos producidos localmente durante la isquemia. Se ha demostrado que la sangre venosa procedente de un miembro isquémico tiene un alto contenido de potasio, un pH ácido y un alto contenido de mioglobina procedente del músculo isquémico.

En el proceso inflamatorio que ocurre durante la reperfusión se encuentran involucrados macrófagos, células endoteliales, neutrófilos, linfocitos, plaquetas, y células parenquimales, así como elementos no celulares, que incluyen el sistema del complemento, la cascada de coagulación sanguínea, las ROS, el óxido nítrico, y las citosinas pro y antiinflamatorias, además de otros mediadores. La respuesta inflamatoria puede ser iniciada por los restos de las células dañadas o por las células endoteliales y los macrófagos que se encuentran intrínsecamente activados por el proceso de I/R.

Durante este proceso de inflamación se liberan ROS y citosinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y de altas concentraciones de óxido nítrico (NO), todo lo cual produce citotoxicidad y exacerbación del daño celular (véase revisión por Groot y Rauen, 2007).

Entre las vías de señalización que se encuentran activadas durante el periodo de reperfusión, se encuentra la de la familia de proteína cinasas activadas por mitógenos, como c-Jun N-terminal cinasa (JNK) o el factor nuclear- κ B (NF- κ B). La activación del receptor de muerte celular y la vía de señalización apoptótica mediada por las mitocondrias (incluyendo la activación de caspasas y los miembros de la familia Bcl-2), se encuentran también activadas en el periodo de reperfusión (véase revisión por Groot y Rauen, 2007).

2.4 Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial

La estructura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP, por sus siglas en inglés) no está del todo clara. Se propone que está compuesto de diferentes proteínas de la mitocondria que se encuentran tanto en la membrana interna (el transportador de nucleótidos de adenina o ANT; por sus siglas en inglés), como en la membrana externa (el canal de aniones dependiente de voltaje o VDAC, por sus siglas en inglés). La asociación de estas proteínas junto con una proteína soluble de la matriz ciclofilina D, formarían un canal de larga conductancia (véase revisión por Feissner et al, 2009). El poro se abre de manera breve bajo determinadas condiciones fisiológicas sirviendo así como una válvula de salida del Ca^{2+} para evitar una sobrecarga del ión en la mitocondria, que produciría daño en este organelo y muerte celular (Bernardi et al., 1994; Vergun et al 2004). Por lo general la apertura de este poro se da en condiciones patológicas.

La apertura del mPTP en condiciones patológicas produce una despolarización del potencial de membrana mitocondrial, $\Delta\psi$ y permite que solutos menores a 1.5 KDa se liberen de la mitocondria. También produce un aumento del volumen de la matriz mitocondrial, ruptura de la membrana externa y la liberación de citocromo *c* que activa diferentes caspasas que inician un proceso apoptótico; además puede desencadenar necrosis debido al daño en la mitocondria (Greed et al., 1998; Garrido et al., 2006; Ulivieri et al.,

2010; Toledo-Pereyra et al., 2004; Griffiths et al., 1995; Halestrap et al., 1999). Por otra parte, la despolarización del $\Delta\psi$ puede llevar a la pérdida de ATP, que conduce a la necrosis celular a través de mecanismos aún no definidos (Kin et al., 2003).

Durante la I/R uno de los principales mecanismos que desencadenan daño celular involucra la apertura del mPTP. En la isquemia, la reducción de la síntesis de ATP inhibe la Na^+/K^+ ATPasa, lo cual resulta en un incremento en las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} . El aumento en la glicólisis lleva a la acumulación de ácido láctico y a la reducción del pH. Sin embargo, la reperfusión causa un rápido incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular, el pH y en las ROS (Toledo-Pereyra et al., 2004) que resultan en la apertura del mPTP (Griffiths et al., 1995). Halestrap describió que la mayor causa de daño en la reperfusión es la apertura del mPTP, el cual se encuentra cerrado en condiciones fisiológicas e incluso en el periodo de isquemia, pero su apertura se da en la reperfusión (Halestrap et al., 1999).

En el músculo esquelético se ha encontrado una despolarización del $\Delta\psi$ mitocondrial y la liberación de citocromo *c* durante un proceso I/R (Wang et al., 2010). De igual manera, se ha demostrado que un periodo prolongado de isquemia seguido de reperfusión no sólo causa necrosis celular, sino que también acelera la apoptosis celular en el músculo esquelético (Wang et al., 2008).

2.5 Especies reactivas de oxígeno

Las células musculares continuamente generan ROS así como especies reactivas de nitrógeno (RNS). Entre estas especies se encuentra el ión superóxido (O_2^-), los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se considera que las mitocondrias son las principales fuentes de ROS dentro de la célula. Dentro de los complejos I y III de la cadena respiratoria de electrones se forma principalmente el anión O_2^- , por la reducción del O_2 . El superóxido es un radical muy inestable y reacciona rápidamente con las moléculas cercanas; este radical puede ser dismutado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) para formar H_2O_2 (Mn SOD en la matriz mitocondrial y Cu/ZnSOD en el citosol y espacio intermembranal), el cual es una molécula permeable en la membrana por lo que puede tener diferentes blancos de acción (Fig.3). Otra fuente de superóxido se encuentra en

la xantina oxidasa y el citocromo P450 oxidasa (Reid, 2001) (Fig. 3).

La homeostasis de estas especies es mantenida a través del balance entre la producción de ROS y RNS y su amortiguación por el sistema de antioxidantes. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la SOD que cataliza la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual es convertido a su vez en agua a través de otras dos enzimas, la catalasa (CAT), el sistema tioredoxin peroxidasa o glutatión peroxidasa (Reid, 2001) (Fig 3).

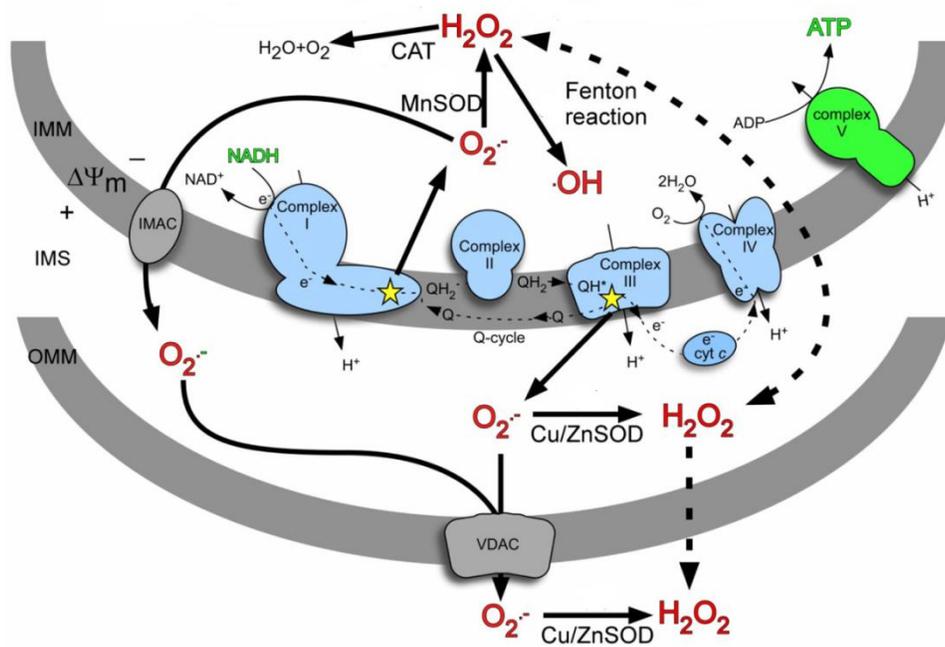


Figura 3. Generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria y sistemas antioxidantes. IMM, membrana mitocondrial interna; OMM membrana mitocondrial externa; MnSOD magnesio superóxido dismutasa; Cu/ZnSOD cobre/zinc superóxido dismutasa; CAT, catalasa. Tomado y modificado de Feissner et al., 2009.

La existencia de un desequilibrio entre la producción y la eliminación de las ROS y RNS, como ocurre en una isquemia-reperfusión, tiene como resultado la acumulación de O_2^- , H_2O_2 , y NO^\cdot , que podrían producir estrés oxidativo (Rubin, 1996). Durante el estrés oxidativo, la acumulación de O_2^- y H_2O_2 puede dar lugar a la oxidación de muchas

macromoléculas, como son ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas; además, el H_2O_2 puede reaccionar con metales de transición como el hierro, para formar radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que presentan una alta reactividad (Dröge, 2002; Reid, 2001). El NO también puede reaccionar con el exceso de O_2^- para formar el anión peroxinitrito (ONOO^-), que también es un potente oxidante y puede reaccionar con una gran variedad de moléculas biológicas (Lee et al., 2000; McCord 2000; Dröge, 2002). La oxidación de uno o más aminoácidos puede dañar la estructura secundaria o terciaria de las proteínas, lo cual puede provocar su agregación y la pérdida de su función (Goldberg 2003).

Se sugiere que entre los mecanismos que llevan a un aumento en las ROS durante la isquemia-reperfusión se encuentra una sobrecarga de Ca^{2+} dentro de las mitocondrias y citoplasma. En condiciones fisiológicas la entrada de calcio a las mitocondrias contribuye a la síntesis de ATP; el calcio activa enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico, como son la isocitrato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa (McCormack et al., 1993). Sin embargo, una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria produce la apertura del mPTP que se ha sugerido induce cambios conformacionales en el complejo I de la cadena transportadora de electrones, lo que puede inhibirla y así generar ROS; además se ha demostrado el efecto inhibitorio del Ca^{2+} de manera directa sobre la actividad del complejo I en presencia de NO; altos niveles de NO y Ca^{2+} causan una inhibición irreversible de la respiración celular iniciada por los sustratos del complejo I (Jekabsone et al., 2003). El Ca^{2+} también puede activar la sintasa de óxido nítrico y de esta manera generar NO el cual inhibe al complejo IV de la cadena transportadora de electrones conduciendo así a la producción de ROS en el complejo III (Cleeter et al., 1994). Una sobrecarga en el citoplasma produce activación de la enzima xantina oxidasa, que es una fuente de ROS.

3. PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO

En general el músculo esquelético tiene una alta tolerancia a la isquemia, como se ha observado en estudios donde se muestra que un daño irreversible del músculo esquelético empieza después de 3 horas de isquemia (Blaisdell et al., 2002 y Vignaud et al., 2010).

Sin embargo, cuando el músculo se somete a una isquemia prolongada puede tener complicaciones graves, incluyendo necrosis y apoptosis. Uno de los principales tratamientos de la isquemia es la restauración rápida del flujo sanguíneo (reperfusión) hacia el área dañada. Sin embargo, el restablecimiento de la circulación arterial, aunque es esencial para prevenir la necrosis causada por la ausencia de oxígeno, puede resultar en un daño mediado por procesos inflamatorios y en el desarrollo de estrés oxidativo dando lugar a la formación de radicales libres, como ya ha sido mencionado (Grisotto et al., 2000; Primeau et al., 2002; Hallström et al., 2002).

En 1986, Murry et al., describieron el proceso de preconditionamiento isquémico (PI), que resultó ser uno de los mecanismos más potentes para minimizar las lesiones producidas por la I/R. Murry et al., demostraron en el corazón, que cuatro episodios consecutivos de isquemia y perfusión de 5 minutos cada uno, lejos de agravar la depleción de ATP y la necrosis en el corazón, confería una protección cuando éste se sometía a una isquemia de 40 minutos y cuatro días de perfusión. Con el preconditionamiento la zona de infarto del corazón se reducía en un 70 % después del periodo de isquemia en comparación con el corazón no preconditionado. El preconditionamiento se ha observado en otros tejidos como el músculo esquelético (Pang et al., 1995), el intestino (Ishida et al., 1997), el riñón (Bonventre 2002) y el cerebro (Wegener et al., 2004), entre otros.

La efectividad del PI en pocos minutos sugería que sus efectos obedecían a mediadores preformados dentro de la célula. Se demostró que los agonistas liberados localmente (adenosina, bradicinina, catecolaminas y opioides) desencadenaban una respuesta protectora a través de diversos receptores de la superficie celular acoplados a proteínas G (Cohen et al., 2000).

Entre las vías de señalización que se encuentran activadas, tenemos la vía de la PI3K, que a través de la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1) activa proteínas como Akt y p70S6K; además, se encuentra también la vía de las cinasas reguladas extracelularmente (ERK). Las cinasas, como la proteína cinasa C (PKC), la tirosin cinasa y la MAP-cinasa (proteína activada por mitógenos) p38 también participan en los mecanismos que activan las señales de protección (véase revisión por Murphy 2008).

3.1 Precondicionamiento en el músculo esquelético

El estudio del precondicionamiento en el músculo esquelético no ha sido tan extenso como el que se ha llevado a cabo en el corazón. A pesar de que el precondicionamiento ocurre en varios tejidos, éste no necesariamente involucra los mismos mecanismos, pues ello depende de la maquinaria propia de cada célula y su capacidad para desencadenar un efecto protector.

Algunas de las vías de señalización que se encuentran activadas como parte de los mecanismos de protección del músculo cardiaco son similares en el músculo esquelético.

El PI puede proteger al músculo esquelético al promover el ahorro de energía o al reducir la producción de ATP en condiciones anaeróbicas durante periodos de isquemia. La primera evidencia del efecto protector del PI en músculo esquelético fue reportada en los músculos *latissimus dorsi* y *gracilis* del cerdo (Pang et al., 1995). La aplicación de tres ciclos de 10 min de I/R por medio de la obstrucción del pedículo vascular de estos músculos produjo una reducción de la zona infartada de un 44 % y 62 %, respectivamente, cuando estos músculos eran sometidos a 4 horas de isquemia y 48 horas de reperfusión. Esta protección estuvo asociada con un alto contenido de fosfatos de alta energía y una baja acumulación de lactato después del periodo de isquemia en los músculos precondicionados, indicando una baja demanda energética.

Además de reducir la zona infartada, también se ha reportado que el PI en el músculo esquelético de rata atenúa la disfunción vascular (Lake, 1996) y la trombosis capilar (Wang et al., 2002). Por otra parte, también se ha demostrado que el PI mejora la fuerza muscular, la contractilidad y la resistencia después de un periodo de isquemia; en este caso no se observó la preservación de fosfatos de alta energía con respecto a los músculos no precondicionados (Gürke, 1996)

El efecto protector del PI se extiende tanto a fibras musculares rápidas como a lentas (Mattei, 2000). Se ha demostrado también que el músculo esquelético humano se puede precondicionar pues Kharbanda et al. (2001) demostraron que el PI reduce la disfunción

endotelial y la activación de neutrófilos en los brazos de voluntarios sanos sometidos a un torniquete para producir daño por un proceso de I/R.

3.2 Segunda ventana de protección del preconditionamiento

El preconditionamiento isquémico es un fenómeno bifásico, con una primera fase de protección que se desarrolla minutos después del estímulo preconditionante y dura de 2 a 3 horas. Esta etapa es seguida por una segunda fase o segunda ventana de protección, que aparece de 12 a 24 horas después del estímulo preconditionante y tiene una duración de 3 a 4 días. Aunque la segunda fase es mucho más larga que la primera, la protección que ofrece es más débil que la que produce la primera fase. Además, existe en esta etapa la expresión de nuevas proteínas (Bolli, 2000).

Dentro de las moléculas involucradas en la segunda fase de protección en el músculo esquelético, se ha encontrado que la adenosina y el óxido nítrico contribuyen a iniciar la protección en la microvasculatura de los músculos *cremaster* que son expuestos a una I/R (Wang et al., 2001). Se ha propuesto, de igual manera, que las ROS generadas pueden también ser iniciadoras de la segunda fase de protección. Sin embargo, cuando se producen grandes cantidades de ROS, éstas pueden inducir daño a las células musculares (Grisotto et al., 2000). Las moléculas iniciadoras pueden activar diferentes vías de señalización, como la PKC, principalmente la isoforma nPKC en el caso del músculo esquelético (Hopper et al., 2000), y factores de transcripción que regulan la transcripción de genes para la síntesis de proteínas efectoras de la protección.

Contrario a lo que sucede en la primera ventana de protección en donde la célula utiliza las proteínas existentes, en la segunda ventana existe la expresión de nuevas proteínas a las que se ha atribuido un papel en la protección. Entre estas tenemos a la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la aldosa reductasa, las enzimas antioxidantes (Mn SOD), y las proteínas de choque térmico (HSPs). También se ha sugerido la participación de los canales de potasio dependientes de ATP mitocondriales (mK_{ATP}) (Bolli, 2000).

Se ha demostrado que en la segunda ventana de protección generada por el PI se produce también una mayor expresión de las proteínas óxido nítrico sintasa (eNOS e iNOS), tanto a

nivel del RNA mensajero como de la proteína, lo que tiene como consecuencia un efecto positivo en la microvasculatura del músculo *cremaster* (Wang et al., 2004). Otra de las proteínas cuya expresión aumenta son las proteínas de choque térmico, Hsp70, las cuales tienen la habilidad de estabilizar la estructura y función de las proteínas por lo que confieren a la célula una mayor resistencia ante un estímulo estresante, como puede ser la I/R (Tupling et al., 2008). De manera similar, la expresión de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, se encuentra aumentada al doble en los músculos *EDL* provenientes de ratas que habían recibido un protocolo de PI (Badhwar et al., 2004).

4. PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO

A pesar del efecto protector del preconditionamiento, éste no es generalmente aceptado por cirujanos porque requiere un mayor tiempo de operación y, lo más importante, existe siempre el riesgo de dañar el pedículo vascular debido a los ciclos repetidos de oclusión. De esta manera, surge la necesidad de utilizar fármacos que sean capaces de activar las vías de señalización responsables del preconditionamiento. Entre los agentes farmacológicos que han demostrado efectividad para desencadenar el fenómeno del preconditionamiento se encuentran los agonistas de los receptores a opioides, los donadores de NO, los anestésicos como el isoflurano, y los abridores de los canales de K_{ATP} (Magill et al., 2009).

Se ha demostrado que los abridores de los canales mK_{ATP} , como el diazóxido, reproducen el efecto protector agudo del PI en el músculo esquelético del cerdo (Pang et al., 1997). Además, utilizando una línea celular de músculo esquelético en su estado diferenciado, también se ha demostrado el efecto protector de diazóxido cuando las células son sometidas a un proceso isquémico, observándose una mayor viabilidad de las células tratadas con diazóxido, así como una menor liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Minners 2001 y 2007). Por otra parte, se ha demostrado que la infusión de adenosina produce un efecto protector en el músculo *tibialis anterior*, mostrando un 3.2 % de sitios dañados (1.6 a 4.0) comparado con 59.1 % (51.9 a 70.7) en músculos testigo (Bushell et al., 2002).

De igual manera, los agonistas de los receptores a adenosina A_1 (2-cloro- N^6 -ciclopentiladenosina), A_{2A} (2-*p*-(2-carboxietil)fenetilamino-5'-*N*-etilcarboxamidoadenosina) y A_3 (2-cloro- N^6 -(3-iodobenzil)adenosina-5'-*N* metiluronamida) ejercen un efecto protector del daño producido después de un periodo de I/R en el músculo *gastrocnemio*, como lo demuestra el bajo contenido de creatina cinasa y la baja positividad del tejido en la tinción con azul de Evans (colorante que sólo tiñe al músculo cuando está dañado) (Zheng et al., 2007).

Otro de los fármacos que han mostrado su efectividad para imitar el preconditionamiento es el nitroprusiato de sodio (SNP) (donador de NO), cuya administración 24 horas antes de someter al músculo *cremaster* a un proceso de I/R crea una protección en la microvasculatura (Wang et al., 2001).

5. MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO

Con el desarrollo de varios modelos de I/R, se ha avanzado en el entendimiento de algunos de los mecanismos involucrados en la protección mediada por el PI. Existen diferentes vías de señalización que se encuentran activadas durante el preconditionamiento, las cuales confieren protección al músculo durante un proceso de I/R. Las primeras moléculas identificadas como activadoras del preconditionamiento fueron la adenosina, la bradicidina, los opioides, y la noradrenalina (Magill et al., 2009). Estas moléculas activadoras desencadenan una cascada de señalización que activa otros efectores de la señal, entre los que se encuentran los canales de mK_{ATP} , y enzimas como la PKC. Se cree que el efecto final del PI es limitar el daño producido por la reperfusión, el cual ocurre principalmente a nivel de las mitocondrias como consecuencia de un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial durante la reperfusión produciéndose finalmente ruptura de la membrana y por consiguiente la liberación de proteínas apoptóticas (Magill et al., 2009).

Durante el preconditionamiento farmacológico inducido en la línea celular C2C12 se demostró que en condiciones de preconditionamiento las células presentan una disminución en el potencial de membrana mitocondrial con respecto al control, además de

niveles bajos de ATP y un incremento en el consumo de oxígeno, es decir, las células mantienen un estado energético bajo antes de someterse a un periodo prolongado de isquemia, lo que sugiere una mayor resistencia a un daño letal (Minners et al., 2001)

5.1 Canales de potasio dependientes de ATP en la mitocondria

Los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), se encuentran distribuidos tanto en la membrana plasmática como en la membrana de las mitocondrias de las células del corazón, músculo esquelético y músculo liso. Son complejos hetero-octaméricos compuestos por la subunidad Kir6.1 o Kir6.2 que forma el poro del canal, junto con la subunidad regulatoria, SUR1 o SUR2; el ensamblaje diferente de estas subunidades en los diferentes tejidos da lugar a una regulación tejido-específica tanto fisiológica como farmacológica. De manera general su actividad es inhibida fisiológicamente por el ATP y es activada por MgADP; farmacológicamente, su actividad puede ser modulada por las sulfonilureas, como la glibenclamida y por los abridores de los canales de potasio, como el diazóxido y el pinacidil (Flagg et al., 2010). Los canales de K_{ATP} que se expresan en las fibras rápidas muestran una sensibilidad al fármaco diazóxido.

De manera similar a lo que ocurre en el músculo cardiaco, los canales de K_{ATP} en el musculo esquelético permanecen cerrados en reposo y no contribuyen a la actividad eléctrica de la célula a menos que el músculo esté en una condición de estrés (Hussain et al., 1994).

En el preconditionamiento se ha propuesto que uno de los principales efectores de la protección son los canales de K_{ATP} que se encuentran en la mitocondria. En el corazón existe suficiente evidencia del papel que desempeñan en la protección ante una isquemia; se sugiere que la apertura de estos canales permite la entrada de K^+ a la matriz mitocondrial produciendo una despolarización parcial del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (aproximadamente de +10 a +24 mV) que tiene como consecuencia disminuir la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria que ocurre durante la I/R (Ardehali y O'Rourke, 2005). También se ha sugerido que la apertura de este canal produce un aumento del volumen de la mitocondria que se ha asociado con un aumento de la fosforilación oxidativa (Yellon y

Downey 2003; Kowaltowski et al., 2001; Debska et al., 2002; Dos Santos et al., 2002). Finalmente, la apertura de los canales mK_{ATP} incrementa la producción de ROS durante el preconditionamiento, las cuales producen la activación de PKC que genera a su vez mecanismos que conducen a la protección; durante la etapa de reperfusión la apertura de estos canales produce una disminución en la producción de ROS (Ardehali y O'Rourke, 2005).

En un modelo de animal completo se demostró que la inducción del preconditionamiento en músculo esquelético vía la activación de los canales mK_{ATP} por el agonista BMS-191095, reduce el daño producido por una I/R en el músculo *gracilis* de perro y *latissimus dorsi* del cerdo durante la primera ventana de protección (Grover et al., 2003; Moses et al., 2005a). El aumento en la protección en el músculo *latissimus dorsi* se ha asociado con un incremento en el contenido de ATP al final del periodo de isquemia y al inicio de la reperfusión y con una baja actividad de los neutrófilos al principio de la reperfusión. Como ya se mencionó, al inicio de la reperfusión existe una acumulación de neutrófilos los cuales generan ROS que pueden ocasionar daño al tejido por lo que una disminución en su actividad o en su acumulación parece reducir el daño ocasionado por un proceso de I/R.

5.2 Especies Reactivas de oxígeno

La generación de pequeñas cantidades de ROS participa de manera importante en el inicio de la protección inducida por el preconditionamiento en ambas ventanas de protección. Sun et al. (1996) demostraron que la administración de los antioxidantes SOD, catalasa y *N*-2 (mercaptopropionil) glicina (MPG) al inicio de la isquemia, evita la protección brindada por el PI en el corazón durante la segunda ventana de protección. En una línea celular proveniente de músculo esquelético se demostró también que la administración concomitante de diazóxido y el antioxidante MPG bloquea la protección que ejerce el fármaco durante un proceso isquémico (Minners et al., 2007).

En cultivos de neuronas corticales se demostró que el diazóxido induce la segunda ventana de protección previniendo el daño ocasionado por la privación de oxígeno y

glucosa. Se demostró en estos cultivos que el mecanismo de protección involucra una despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de radicales libres como el anión superóxido (Kis, 2003)

Utilizando músculo cardiaco, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el incremento de ROS inducido por el preconditionamiento farmacológico con diazóxido durante la primera ventana de protección, desempeña un papel importante en el mecanismo por el cual el fármaco genera protección ante un proceso isquémico. Se demostró que el efecto protector del diazóxido se evita cuando se administra concomitantemente con el antioxidante, *N*- acetilcisteína (NAC) (González et al., 2010). En este trabajo también se demostró que el preconditionamiento con diazóxido genera una disminución de los niveles de la proteína α_{1C} , la principal subunidad formadora del canal de calcio tipo L, efecto que fue revertido por el antioxidante, NAC. La disminución de la proteína α_{1C} generó una disminución en la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} . González et al. (2010) sugirieron que una menor concentración de Ca^{2+} durante un proceso isquémico contribuiría a una mayor sobrevivencia de las células.

5.3 Efecto protector de la parvalbúmina

Por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que la parvalbúmina no sólo se expresa en fibras musculares, sino también en tejidos no musculares como los huesos, los dientes, la piel, el cerebro, la próstata, las vesículas seminales, los testículos, y los ovarios de ratas. De manera particular, en el sistema nervioso se ha encontrado que el soma y las neuritas de neuronas GABAérgicas contienen altos niveles de PV. Las PVs parecen actuar como un amortiguador de Ca^{2+} y pueden afectar la amplitud y el curso temporal del Ca^{2+} intracelular después de un potencial de acción, de esta manera, pueden regular la plasticidad sináptica en corto plazo (Caillard et al., 2000).

Se ha demostrado que la expresión aumentada de la PV protege a las motoneuronas de un daño excitotóxico al aumentar la capacidad de las neuronas para amortiguar una sobrecarga de Ca^{2+} producida por un daño con ácido kaínico (Van Den Bosch et al., 2002). Además, se ha encontrado también que al inducir la expresión de la PV las motoneuronas

adquieren cierta resistencia a los efectos producidos por daño al nervio ciático en ratas neonatas (Dekkers et al., 2004).

Así tenemos que la PV no sólo acelera el proceso de relajación en músculos rápidos, sino que también puede proteger a las células de una sobrecarga de Ca^{2+} al unirse al Ca^{2+} libre y de esta manera reducir el contenido de este ión intracelularmente. Una mayor capacidad de la célula para amortiguar eventuales sobrecargas de Ca^{2+} sería importante durante el daño ocasionado por procesos de I/R.

6. JUSTIFICACIÓN

Durante la realización de procesos ortopédicos rutinarios y de cirugías de la periferia vascular el músculo esquelético está sujeto a periodos prolongados de isquemia que tienen como consecuencia complicaciones intraoperatorias y postoperatorias impredecibles. Un periodo excesivo de isquemia puede causar necrosis del músculo, y si el grado de infarto de éste es grande pueden producirse complicaciones sistémicas como acidosis, hiperkalemia, mioglobinuria y daño renal.

El preconditionamiento farmacológico ofrecería una forma de evitar esas complicaciones producidas por una isquemia prolongada, por lo que resulta de vital importancia estudiar los mecanismos moleculares que desencadena, en especial los que llevan a la generación de la segunda ventana de protección que, como ya se mencionó, es de una duración mucho mayor en comparación de la primera.

Es de nuestro interés estudiar el efecto protector del diazóxido en el músculo esquelético, el cual involucra mecanismos de regulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

7. HIPÓTESIS

En el músculo esquelético la segunda ventana de protección inducida por el preconditionamiento farmacológico con diazóxido involucra una mayor remoción del Ca^{2+} intracelular durante el proceso de I/R, con la consecuente disminución del daño celular.

8. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en el manejo del Ca^{2+} intracelular y la participación de las ROS durante el acondicionamiento farmacológico del músculo esquelético.

9. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto del acondicionamiento farmacológico con diazóxido sobre las señales de Ca^{2+} en el músculo esquelético.
- Estudiar el efecto protector del acondicionamiento farmacológico después de someter al músculo esquelético a un proceso de I/R o de estrés oxidativo.
- Determinar la participación de las ROS en el acondicionamiento farmacológico utilizando el *scavenger* de especies reactivas de oxígeno, tiron.
- Analizar la participación de la bomba SERCA y de la proteína PV en la regulación de la concentración del calcio citosólico durante el acondicionamiento farmacológico.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Animales y preparación de músculos

El manejo de los animales fue aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV-IPN. Se utilizaron ratones adultos de la cepa BALB/c, de 8 a 10 semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para posteriormente aislar los músculos *flexor digitorum brevis* (FDB), *interóseo* y *extensor digitorum longus* (EDL) de las patas del ratón.

10.2 Cultivo de células C2C12

La línea celular C2C12 es un subclón de la línea celular miogénica murina C2, establecida a partir de células satélite de músculo esquelético de la extremidad posterior de ratón C3H adulto (Yaffe y Saxel, 1997). Esta línea se diferencia rápidamente y produce miotubos contráctiles que expresan características de músculo esquelético.

Los cultivos celulares de mioblastos C2C12, (American Type Culture Collection), se mantuvieron en medio de crecimiento: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (SBF) en un ambiente con 5 % CO₂ a 37 °C hasta alcanzar una confluencia de 60 ó 70 %. La diferenciación a miotubos se realizó cambiando el medio de crecimiento por un medio de diferenciación el cual contiene medio DMEM suplementado con 2 % de suero de caballo (HS) (Minners et al., 2007). El cultivo de células diferenciadas se mantuvo en este medio por diez días.

10.3 Análisis de las corrientes de Ca²⁺ en la línea celular C2C12

Para medir las corrientes de calcio en la línea celular C2C12 se utilizó la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa. El potencial de mantenimiento fue de -80 mV. Para restar los componentes lineales se aplicaron pulsos hiperpolarizantes de -20 mV. Las corrientes de calcio se obtuvieron aplicando a la célula pulsos despolarizantes a partir del potencial de mantenimiento de -80 mV e incrementando en pasos de 10 mV hasta +60 mV. La duración de los pulsos fue de 150 ms. La solución

extracelular contenía 145 mM TEA-Cl, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES (pH 7.4 con TEOH). La solución interna contenía 110 mM CsCl, 10 mM EGTA, 3 mM Mg-ATP, 10 mM HEPES, 0.6 mM GTP (pH 7.2 con CsOH). Se utilizaron pipetas con una resistencia de 3-5 MΩ. Los registros se realizaron utilizando el amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA), los datos fueron analizados usando pCLAMP 8.0 (Axon Instruments).

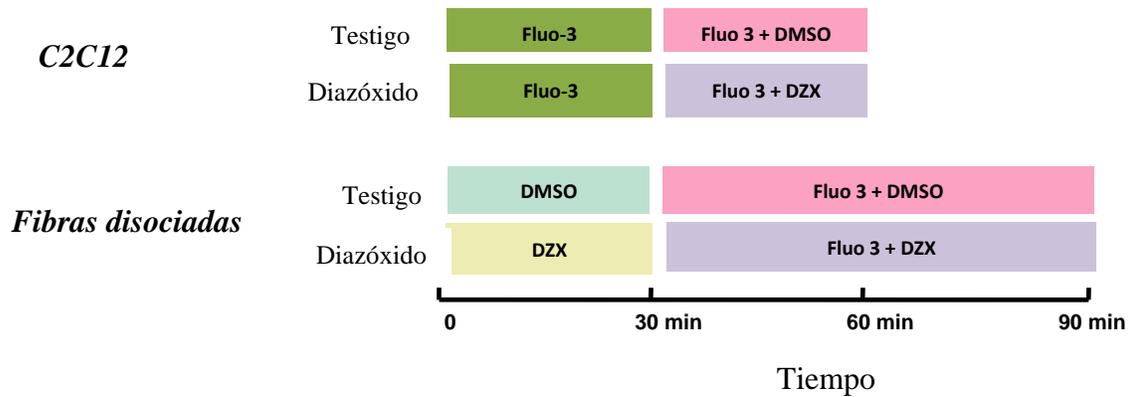
10.4 Protocolos de tratamiento para estudiar el preconditionamiento

La segunda fase del preconditionamiento farmacológico fue inducida por la administración intraperitoneal de diazóxido (7mg/Kg), (Weid et al., 2005), 48 horas antes de someter a los músculos a hipoxia, o estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En los ratones testigo se inyectó el vehículo, el cual contenía 0.9 % de NaCl, alcalinizado con 0.001 N de NaOH.

Para evaluar el efecto de los ROS en el preconditionamiento se inyectó, 10 min antes del tratamiento con diazóxido, el atrapador o *scavenger* (en inglés) de ROS tiron (4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-ácido disulfónico) (1200 mg/Kg) en solución salina 0.9 % NaCl. Se repitió la dosis de tiron 24 horas después.

Se evaluó la actividad de la bomba SERCA en el preconditionamiento por medio de la inhibición de dos cinasas (CaMKII y PKA) que actúan regulando la actividad de la bomba SERCA. El inhibidor de CaMKII, KN-93 (1μM/Kg) se inyectó de manera i.p por 7 días, en el día 5 se administró diazóxido más KN-93. Para evaluar la participación de PKA en la señalización del calcio intracelular el inhibidor de PKA, H-89, se adicionó (3 μM) a las fibras disociadas 10 min antes de medir los transitorios de calcio. Se mantuvo el inhibidor H-89 durante todo el experimento.

Tratamientos agudos con diazóxido



Tratamiento con diazóxido (48 hrs)

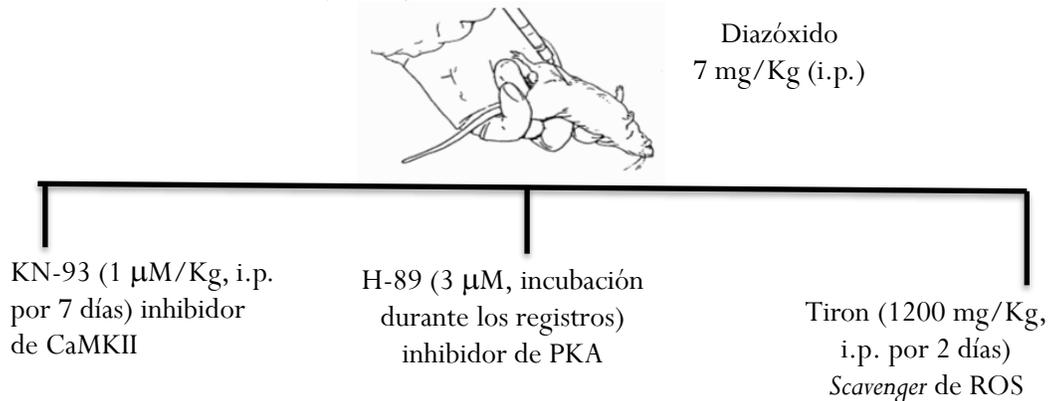


Figura 4. Protocolos que se ocuparon para medir los transitorios de Ca^{2+} . Véase texto para mayor detalle.

10.5 Daño por isquemia – reperfusión

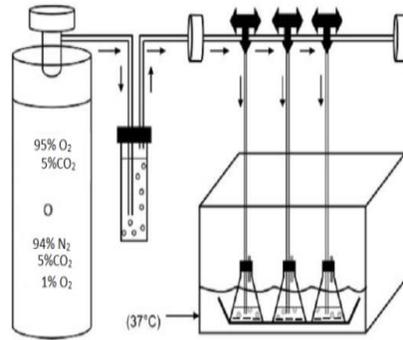
Para simular un proceso de isquemia-reperfusión se utilizó un modelo *in vitro*. Las condiciones aeróbicas e isquémicas se simularon por condiciones normóxicas e hipóxicas, respectivamente, como ya ha sido descrito (Martou et al., 2006), con pequeñas modificaciones. Durante las condiciones normóxicas se utilizó el buffer Krebs-Helseleit-HEPES (KHH) el cual contiene 118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 27.2 mM NaHCO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES. El buffer KHH fue suplementado con 10 mM de glucosa, 10 % de suero bovino fetal (SBF) y 0.25 U/ml de insulina y fue burbujeado con

una mezcla de 94 % O₂-5 % CO₂. Para simular la isquemia, las condiciones hipóxicas fueron creadas al burbujear el buffer KHH sin suplementar con una mezcla de 94 % N₂, 5% CO₂, 1 % O₂. El buffer KHH en condiciones hipoxicas no contenía SBF, glucosa, ni insulina para simular las condiciones isquémicas en las cuales el músculo se vería privado del plasma circulante, sus nutrientes y factores endocrinos. La solución stock del buffer KHH se preparó a una concentración 2X y se almacenó como máximo por una semana a 4°C. El equipo que se utilizó para crear las condiciones de isquemia-reperfusión, consistió en una baño de agua a 37 °C con agitación al cual se le adaptaron dos tanques de gas uno con la mezcla de 94 % O₂-5 % CO₂ y el otro con la mezcla 94 % N₂, 5 % CO₂, 1 % O₂. Los músculos se incubaron inicialmente en condiciones normóxicas por 30 min a 37 °C, periodo al que se le llamo de equilibrio. Al final de este periodo los músculos se incubaron bajo condiciones hipóxicas por 2 horas, seguidas por una hora de perfusión bajo normoxia. Los experimentos control se realizaron incubando a los músculos por 3 horas y media en condiciones de normoxia. Al final del experimento se midió la viabilidad de los músculos en las diferentes condiciones de tratamiento por medio del ensayo de Metiltiazolildifenil Tetrazolium (MTT) (ver más adelante).

10.6 Estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno

Con la finalidad de simular un estrés oxidativo los músculos se incubaron con peróxido de hidrógeno (McArdle et al., 2004). Los músculos se incubaron inicialmente con solución Ringer normal por 30 min a 37 °C para equilibrarlos, posteriormente se incubaron por otros 30 min a 37°C en solución Ringer normal con 3 mM de H₂O₂. Los experimentos testigo se realizaron incubando los músculos por el mismo periodo de tiempo pero solamente con solución Ringer normal. Al final del periodo de incubación se midió la viabilidad de los músculos control, con peróxido con y sin tratamientos por medio del ensayo de Metiltiazolildifenil tetrazolium (MTT). La solución de Ringer normal contiene: 146 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 11 mM Glucosa, 10 mM HEPES, pH 7.4.

A. Modelo de isquemia-reperfusión



B. Modelo de estrés oxidativo

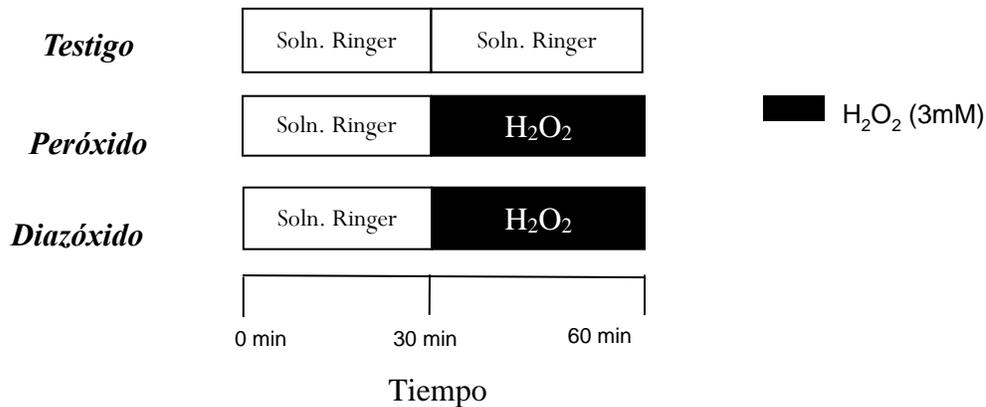


Figura 5. Modelos de daño celular para evaluar el efecto protector del preconditionamiento farmacológico con diazóxido. A. Modelo de isquemia-reperfusión modificado de Martou et al 2006. B. Modelo de estrés oxidativo (modificado de McArdle et al.2004).

10.7 Determinación de la viabilidad por el ensayo de MTT

La viabilidad de los músculos se midió por medio del ensayo de Metiltiazolildifenil tetrazolium (MTT). En este ensayo el MTT es reducido a azul de formazán por las mitocondrias de aquellos músculos que conservan su viabilidad. Al final de cada protocolo de daño celular al cual se sometieron los músculos se les quitó el exceso de humedad con ayuda de un papel filtro para posteriormente pesarlos. Finalmente los músculos se colocan en un tubo eppendorf que contiene 3 mM de MTT en buffer salino de fosfatos (PBS). Los músculos se incuban por 60 min a 37 °C, transcurrido este tiempo se secan y se pasan a un eppendorf que contiene DMSO, donde los músculos son cortados finamente con la ayuda de unas tijeras. Finalmente las muestras se incuban por 30 min a 37°C para permitir la completa disolución del azul de formazán. El sobrenadante de las muestras se midió en un espectrómetro “Spectrophotometer, SmartSpec™ 3000 Bio Rad” a una longitud de onda de 550 nm. Los resultados son expresados como a absorbancia a 550 nm por gramo de peso de músculo.

10.8 Disociación de las Fibras Musculares

Para obtener las fibras musculares se realizó una disociación enzimática. Se utilizaron los músculos *flexor digitorum brevis* e *interóseo* del ratón, los cuales se sometieron a una disociación enzimática con colagenasa. Los músculos se colocaron en una cámara con una base de un polímero transparente (Sylgard) en donde fueron incubados a 36.5 °C, 30 min en una solución Ringer con bajo contenido de calcio (1 mM CaCl₂) y colagenasa (tipo 2, 327 U/mg, Worthington) con la finalidad de separar las fibras del tejido conjuntivo circundante. Al final de la incubación los músculos se lavaron con solución Ringer normal y se disociaron de manera mecánica con el uso de pipetas pulidas de distintos diámetros. Se verificó la integridad de la fibra de manera visual, observando su respuesta ante un estímulo eléctrico.

10.9 Protocolo de Estimulación

Los transitorios de Ca^{2+} fueron inducidos mediante estímulos eléctricos, producidos por electrodos de platino que se encuentra en lados opuestos de la cámara experimental donde se colocan los cubreobjetos silanizados que contienen las fibras dissociadas. La cámara experimental contiene la solución extracelular. El generador de pulsos (modelo DS2A, Digitimer, Hertfordshire, Inglaterra) produce estímulos con duración y amplitud a seleccionar. Para la generación de sacudidas simples se dieron pulsos de 2 ms de duración y una amplitud aproximadamente 3 veces el umbral. Se repitió la estimulación a una frecuencia muy baja (0.3 Hz) y con una duración aproximada de 20 s para posteriormente promediar las señales obtenidas. En el protocolo de estimulación tetánica, se produce primero una sacudida simple, después de 200 ms sigue la estimulación repetitiva la cual tuvo una duración variable (36.5 a 400 ms), con una frecuencia de 100 Hz. Sólo se consideraron a aquellas fibras que no presentaron *run-down*, es decir, se dio un último pulso después de la estimulación repetitiva y si no mostraban una caída con respecto a la primera sacudida se consideraron para el análisis.

10.10 Medición de los Transitorios de Ca^{2+} .

Los registros de los transitorios de Ca^{2+} obtenidos con indicadores fluorescentes presentan características cinéticas que están relacionadas principalmente con la liberación del Ca^{2+} y con la recaptura del Ca^{2+} , modificadas a su vez por las características intrínsecas del indicador fluorescente que se utilice.

Se obtuvieron registros en condiciones testigo y en fibras que se obtuvieron de músculos provenientes de ratones que habían sido inyectados 48 horas antes con diazóxido para producir el acondicionamiento farmacológico. Además, se realizaron registros para evaluar el efecto agudo del diazóxido (100 μM) tanto en las células C2C12 en su estado de diferenciación y en las fibras musculares dissociadas. La duración del tratamiento fue de 30 min para la línea celular C2C12 diferenciada y de 90 min para las fibras dissociadas.

Los cambios producidos en los transitorios de calcio por los diferentes tratamientos se analizaron utilizando el siguiente protocolo: las células inicialmente fueron cargadas con el indicador fluorescente Fluo-3 AM (Molecular Probes). El indicador permea a la membrana plasmática por medio de los grupos acetoxi-metil-éster; una vez en el citoplasma, este grupo es hidrolizado por las esterasas, quedando el indicador en su forma ácida, es decir, con la capacidad de unir Ca^{2+} y emitir luz. Este indicador presenta una baja compartimentalización (Thomas et al., 2000). Las células fueron incubadas con 5 μM de Fluo-3 AM en solución Ringer por 60 min en oscuridad a temperatura ambiente. Al final de la incubación se lava el indicador con Ringer y se incuba por 30 min más para permitir que el indicador se convierta en su forma sensible al Ca^{2+} .

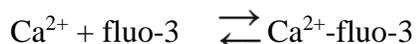
En el caso de las fibras disociadas una vez cargadas se colocan sobre un cubreobjetos que ha sido previamente silanizado con la finalidad de que se adhieran y así minimizar los artefactos de movimiento. Para las células C2C12 no fue necesario este procedimiento ya que éstas se hacen crecer sobre cubreobjetos.

El cubreobjetos se coloca dentro de una cámara de registro la cual está sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon, Tokyo, Japón). Las células son iluminadas con una luz monocromática de 485 nm, la luz emitida se filtra para obtener la longitud de onda de emisión de 535 nm, la cual es detectada por un fotodiodo que se encuentra acoplado al microscopio. La señal fue digitalizada utilizando una interfase (Digidata 1322 con una resolución de 16 Bit, Axon Instruments).

La fluorescencia emitida por las células se registró; el valor promedio de los primeros 200 ms anteriores al estímulo eléctrico, fluorescencia basal (F), fue utilizado para calcular la señal de Ca^{2+} como $\Delta F/F$, es decir el cambio de la fluorescencia con respecto a la basal, dividida sobre la basal, este procedimiento minimiza los posibles efectos producidos por los cambios en la concentración del indicador sobre las señales de calcio (Vergara y Di Franco, 1991; Shirokova et al., 1998). También se analizó la anchura media de la señal, es decir, el intervalo entre el 50% de la magnitud máxima de la fase de ascenso y la de descenso. Los datos fueron analizados utilizando los programas pCLAMP 8.0 (Axon Instruments) y SigmaPlot 10 (Systat Software Inc.).

10.11 Calibración de las señales de fluo-3

Con la finalidad de analizar los cambios en la concentración de calcio intracelular a partir de las señales fluorescentes de Ca^{2+} obtenidas con el indicador fluo-3, empleamos el procedimiento utilizado por Caputo et al. (1994). Considerando que la reacción entre el calcio y fluo-3 está dada por la siguiente reacción:



Caputo et al. (1994) demostraron que la concentración libre de calcio en el citoplasma bajo condiciones dinámicas puede ser calculada por la siguiente relación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{IR}(F_{max} - F_{rest})K_+ + \Delta F K_- + dF/dt}{(F_{max} - F_{rest} - \Delta F)K_+} \quad (1)$$

Donde $[\text{Ca}^{2+}]_{IR}$ es la concentración de Ca^{2+} en reposo (estimada en 100 nM), y k_+ , k_- son las constantes de la asociación y disociación del calcio al indicador, respectivamente. Los valores que se usaron para estos parámetros fueron: $30 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y 120s^{-1} , respectivamente (Caputo et al., 1999). En la ecuación (1) dF/dt es la relación de cambio de la señal de fluorescencia, ΔF es el cambio de la fluorescencia con relación a F_{rest} , F_{max} es el máximo valor de fluorescencia y F_{rest} es el valor de fluorescencia en reposo. La F_{max} fue evaluada de acuerdo a Cheng et al. (1993).

10.12 Análisis por western blot

Se detectó por *western blot* la proteína parvalbúmina y como normalizador se utilizó la proteína estructural actina. Los tejidos musculares fueron homogeneizados con buffer frío (50 mM Tris HCl, 2.5 % dodecil sulfato de sodio), 10 mM de ditriitol, 5% glicerol y una mezcla de inhibidores de proteasas) e incubados a 100 °C por 5 min. Después se centrifugaron a 10 000 x g, 10 min a 4 °C, los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -80°C (Weiss et al., 2010). Se determinó el contenido de proteína usando el kit de ensayo Pierce BCA. Cantidades iguales de proteína (10 μg) para parvalbúmina y

actina fueron separadas por un gel de electroforesis dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4° C con los anticuerpos contra parvalbúmina (1:10,000, Abcam, Cambridge, MA, EUA) o actina (1: 1000, Sigma). Después de varios lavados las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 30 000), o anti-ratón (1: 40 000) conjugados con peroxidasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). La quimioluminiscencia fue detectada usando Immobilon Western (Millipore Co., Billerica, MA, EUA).

La densidad de las bandas de parvalbúmina y actina se midió de la siguiente manera: las placas se escanearon a 600 dpi y se invirtió su contraste. El promedio de la intensidad y el área de cada banda se midieron con Photoshop (CS3), y se determinó el valor de la densidad absoluta como el producto entre la intensidad y el área de la banda. Para normalizar, la densidad absoluta de la banda de parvalbúmina se dividió entre la densidad de la banda correspondiente de α -actina. La densidad relativa se calculó como la relación entre la densidad normalizada de parvalbúmina de los músculos tratados y la densidad normalizada de la banda de parvalbúmina de los músculos en condiciones testigo; ambos experimentos se realizaron en paralelo.

10.13 Análisis estadístico

Los datos son presentados como el promedio \pm error estándar (S.E). La diferencia entre los promedios de dos muestras poblacionales se analizó por medio de una prueba *t* de Student. La diferencia significativa entre los promedios de más de dos poblaciones fue evaluada por una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunn. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

11. RESULTADOS

11.1 CULTIVO DE LAS CÉLULAS C2C12

La línea celular C2C12 de origen mioblástico se diferencia rápidamente y produce miotubos contráctiles que expresan características de músculo esquelético por lo que es un modelo frecuentemente utilizado para estudiar lo que ocurre en el músculo esquelético a nivel molecular, es por ello que inicialmente llevamos a cabo experimentos en esta línea celular. Como primer paso establecimos las condiciones adecuadas de crecimiento y de diferenciación de la línea celular C2C12.

La línea celular C2C12 se hizo crecer en medio DMEM suplementado con 10 % de SBF hasta que alcanzara una confluencia del 60 -70% (Día 0). La morfología de las células no diferenciadas, es decir, en su forma de mioblastos, se caracterizó por su forma estrellada, y por la presencia de un sólo núcleo. Para lograr la diferenciación, el medio de crecimiento se cambió por medio de diferenciación, es decir, medio que contenía 2 % de HS, en estas condiciones observamos cambios morfológicos importantes a partir de las 24 horas, las células empiezan a agruparse y a fusionarse (Día 1). En el día 4 y 5 de diferenciación, la formación de miotubos es evidente, las células adquieren una forma alargada y multinucleada.

Finamente podemos observar un aumento en la formación de miotubos en los días 6, 7, y 8 de diferenciación (Fig. 6). Ocasionalmente logramos observar contracción de los miotubos en los últimos días de diferenciación. A partir del día 9 de diferenciación se empieza hacer evidente la muerte celular de los miotubos (datos no mostrados). Similares cambios morfológicos de la línea celular C2C12 durante su diferenciación ya han sido descritos (Curci et al., 2008).

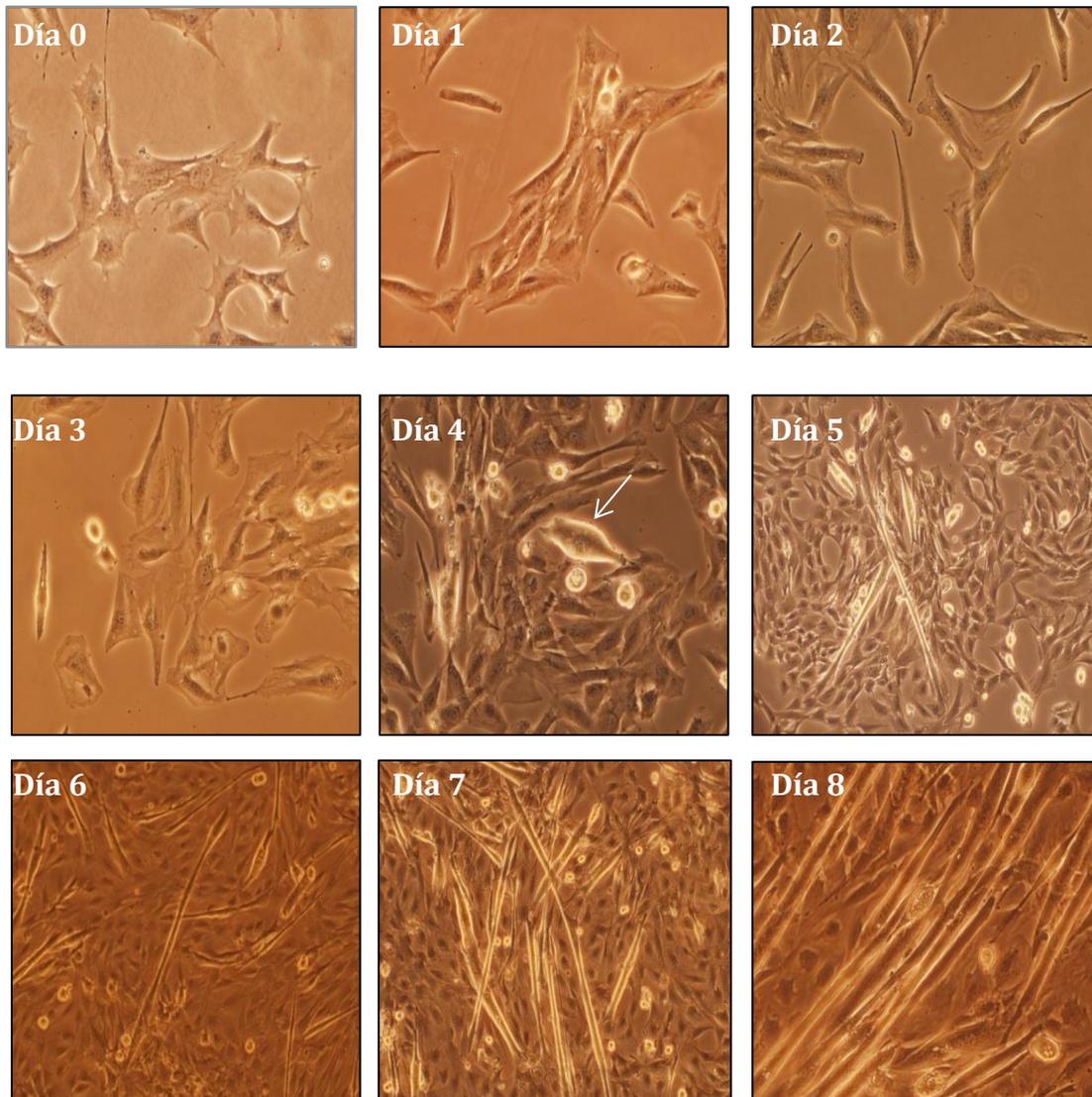


Figura 6. Cambios morfológicos de la línea celular C2C12 durante su diferenciación a miotubos. *Día 0* estado no diferenciado o mioblástico. *Día 1-8* línea celular C2C12 en condiciones de diferenciación. A partir del día 4 es evidente la formación de miotubos, es decir, células alargadas y multinucleadas. En los días 5-8 de diferenciación el número de miotubos ha aumentado de manera considerable.

11.2 EFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO TEMPRANO SOBRE LOS TRANSITORIOS DE Ca²⁺

Debido a que una reducción en la sobrecarga de calcio por el preconditionamiento se ha sugerido como uno de los principales mecanismos que conducen a la protección de los tejidos (véase revisión por Murphy, 2008), nosotros nos propusimos como primer paso estudiar el efecto del preconditionamiento farmacológico con diazóxido sobre los transitorios de calcio generados por un potencial de acción, tanto en la línea celular C2C12 diferenciada, como en fibras disociadas de músculos de ratón. El diazóxido es un fármaco que se ha utilizado ampliamente para imitar el preconditionamiento en diferentes tejidos, entre ellos tenemos el corazón (Liu et al., 1998), músculo esquelético (Weid et al., 2005) y en la línea celular C2C12 (Minners et al., 2007). En el músculo esquelético se ha estudiado principalmente la primera ventana de protección producida por este fármaco.

11.2.1 Registros electrofisiológicos y transitorios de Ca²⁺ en la línea celular C2C12 tratada con diazóxido.

La línea celular C2C12 en su estado diferenciado, fue incubada con diazóxido 100 μ M, por un periodo de 30 min, dosis que se ha demostrado tiene un efecto protector ante un proceso isquémico durante la primera ventana de protección (Minners et al., 2007)

Considerando que se ha encontrado la expresión de la proteína α_{1S} del canal de calcio Cav 1.1 a partir del día 3 y 5 de diferenciación, proteína indispensable en el acople excitación-contracción del músculo esquelético (Bidaud et al., 2006), decidimos analizar las corrientes y los transitorios de calcio a partir del día 4 de diferenciación, donde en nuestras condiciones de cultivo era clara la formación de miotubos.

En los registros de calcio analizados por medio de la técnica de fijación de voltaje en las células C2C12 no encontramos cambios en la amplitud máxima de las corrientes de calcio generadas por el protocolo de estimulación. Por ejemplo, encontramos que el valor promedio de la amplitud de las corriente de calcio en el día 5 de diferenciación a +30 mV fue de -3.38 ± 1.58 pA.pF⁻¹ ($n = 5$) en condiciones testigo y de -3.68 ± 0.33 pA.pF⁻¹

($n = 2$) en condiciones de tratamiento con diazóxido (100 μM , 30 min); en el día 8 de diferenciación encontramos de manera similar que el tratamiento con diazóxido no afectaba la amplitud de las corrientes de calcio el valor promedio en condiciones testigo fue de $-3.83 \pm 1.37 \text{ pA.pF}^{-1}$ ($n = 6$) y de $-2.9 \pm 0.86 \text{ pA.pF}^{-1}$ ($n = 6$) en condiciones de tratamiento; en general no encontramos cambios en la cinética de los registros de calcio. Es importante resaltar que estos resultados nos daban indicio que en el acondicionamiento con diazóxido en el músculo esquelético no se veía afectado el acople de la excitación-contracción muscular a nivel de los canales de calcio tipo L.

Aunque no encontramos cambios a nivel de las corrientes de calcio, no necesariamente implica que no existan cambios a nivel de la regulación del calcio intracelular después de un potencial de acción es por ello que también analizamos los transitorios de calcio en la línea celular C2C12 en condiciones de acondicionamiento y testigo, determinamos la amplitud de la señal ($\Delta F/F$), tiempo al pico de la señal y el curso temporal de la misma, (anchura media) en los diferentes días de diferenciación (Tabla 1). Encontramos en todos los días de diferenciación analizados una disminución en la amplitud de la señal de calcio ($\Delta F/F$) en condiciones de tratamiento con diazóxido con respecto al testigo, también observamos una disminución en el curso temporal de la señal en condiciones de tratamiento con diazóxido en el día 8 de diferenciación. No observamos cambios en el tiempo al pico de la señal de calcio que nos indicaba nuevamente que la etapa inicial del acople excitación-contracción del músculo no se encontraba afectada durante el acondicionamiento, sino que los cambios eran posteriores.

Tabla 1. Efecto del Diazóxido sobre los transitorios de Ca²⁺ en la línea celular C2C12

	$\Delta F/F$	Anchura media (ms)	Tiempo al pico (ms)	<i>n</i>
Día 4 de diferenciación				
Testigo	3.15 ± 0.110	127.68 ± 12.2	130.82 ± 13.18	37
Diazóxido	2.38 ± 0.117*	95.84 ± 11.86	94.75 ± 11.42	16
Día 5 de diferenciación				
Testigo	2.48 ± 0.060	144.80 ± 16.14	105.86 ± 8.84	53
Diazóxido	2.24 ± 0.076*	112.90 ± 14.02	91.57 ± 9.67	23
Día 6 de diferenciación				
Testigo	2.51 ± 0.069	153.12 ± 13.80	104.52 ± 7.55	50
Diazóxido	2.24 ± 0.047*	147.79 ± 14.41	103.57 ± 9.60	40
Día 7 de diferenciación				
Testigo	2.64 ± 0.067	209.41 ± 17.56	82.64 ± 4.51	51
Diazóxido	2.40 ± 0.072*	180.77 ± 28.10	91.54 ± 11.80	42
Día 8 de diferenciación				
Testigo	2.85 ± 0.067	188.55 ± 13.38	94.2 ± 4.73	72
Diazóxido	2.61 ± 0.080*	142.25 ± 16.70*	89.65 ± 7.80	33

* *p* < 0.05

11.2.2 Transitorios de Ca^{2+} en fibras disociadas tratadas con diazóxido.

Al analizar el efecto del diazóxido sobre los transitorios de calcio en fibras disociadas de los músculos de ratón adulto, encontramos que el tratamiento con diazóxido por 30 min no tenía efecto en la cinética de las señales de calcio (datos no mostrados), contrario a lo que habíamos observado en los miotubos. Sin embargo, si observamos que el tratamiento con el fármaco por 90 min producía una disminución en el $\Delta\text{F}/\text{F}$ de las señales de calcio. El valor promedio del $\Delta\text{F}/\text{F}$ en condiciones testigo fue de 4.38 ± 0.18 y el valor promedio con diazóxido fue de 3.61 ± 0.16 , mostrando una diferencia significativa (Fig. 7A), no encontramos cambios significativos en la duración de la señal con el tratamiento con diazóxido, aunque podemos observar una tendencia a una disminución en su curso temporal (Fig. 7B).

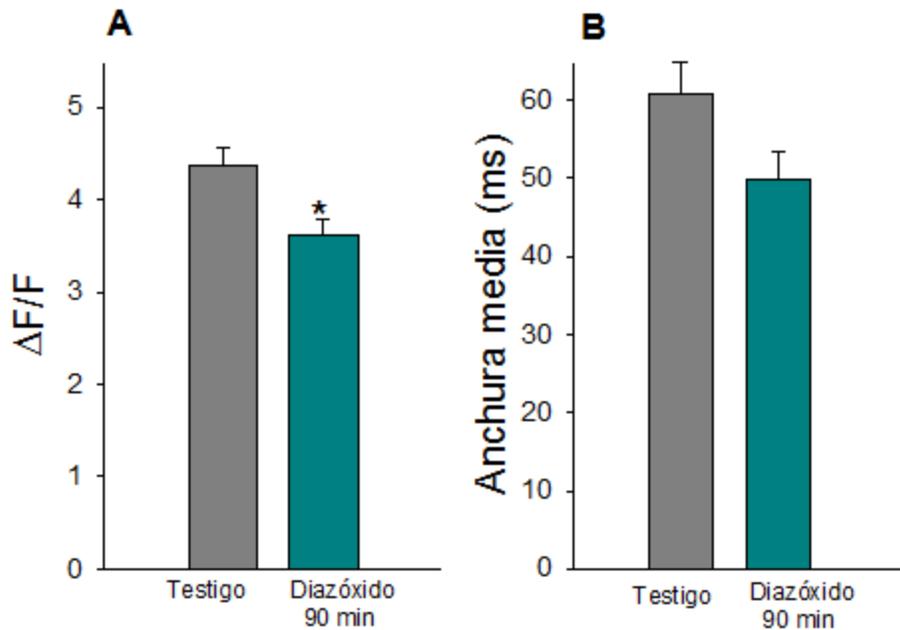


Figura 7. Efecto del diazóxido sobre el $\Delta\text{F}/\text{F}$ de las señales de calcio en fibras disociadas. **A.** Valores promedio del $\Delta\text{F}/\text{F}$ de las señales de calcio ($\pm\text{S.E}$). **B.** Valores promedio de la anchura media de la señal ($\pm\text{S.E}$). Condiciones testigo $n= 61$, diazóxido $n= 27$. * $p < 0.05$.

11.3 EFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO TARDÍO SOBRE LOS TRANSITORIOS DE Ca^{2+}

Para analizar los mecanismos involucrados en la protección que brinda el diazóxido en la segunda ventana de protección, realizamos registros de los transitorios de Ca^{2+} de fibras provenientes de músculos de ratones testigo y de fibras provenientes de ratones que habían sido inyectados 48 horas antes con diazóxido para producir el preconditionamiento tardío (PF tardío).

Los registros generados a partir de un pulso despolarizante suficiente para producir un potencial de acción, tanto en condiciones testigo como de tratamiento, se muestran en la Fig. 8. Se observa que en condiciones de PF tardío las señales que se generan tienen un curso temporal más breve (Fig. 8B) con respecto al testigo (Fig. 8A). Se puede observar de manera más clara la disminución en el curso temporal, cuando los trazos de A y B son normalizados y superpuestos (Fig. 8C). No se observaron cambios en la amplitud del $\Delta F/F$ de las señales de Ca^{2+} , como se había demostrado por el tratamiento agudo con diazóxido tanto en la línea celular C2C12, como en las fibras disociadas. Sin embargo, sí se observaron cambios en la anchura media de la señal. Se encontró una disminución en un 22 % en la duración de la anchura media con respecto al testigo (Tabla 2).

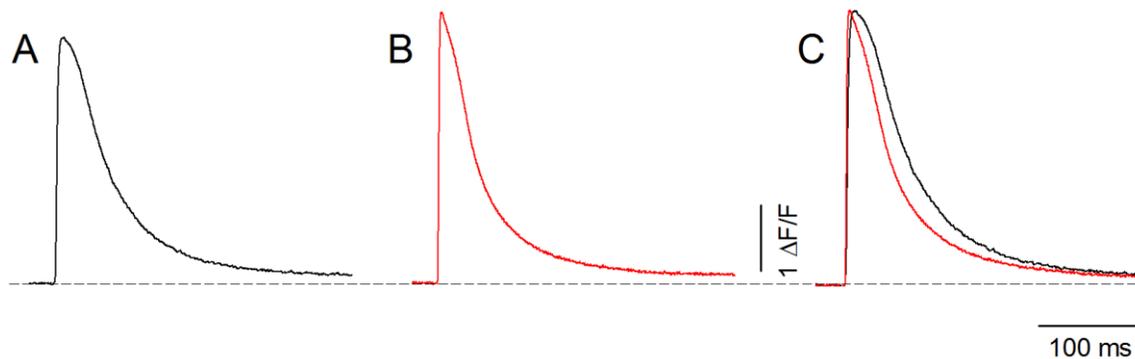


Figura 8. El preconditionamiento farmacológico con diazóxido en la segunda ventana de protección reduce la duración de las señales de Ca^{2+} . A, Señales fluorescentes de Fluo-3 expresadas como el $\Delta F/F$ en respuesta a un estímulo extracelular, fibras testigo (A), PF tardío (B). C, trazos normalizados de A y B.

Tabla 2. Efecto del PF tardío sobre los transitorios de Ca²⁺				
	$\Delta F/F$	Anchura media (ms)	Tiempo al pico (ms)	<i>n</i>
Testigo	4.82 ± 0.14	58.17 ± 1.9	8.72 ± 0.50	122
Diazóxido	5.19 ± 0.19	45.26 ± 1.5 *	7.37 ± 0.48	72

* $p < 0.05$

11.4 TRANSITORIOS DE CALCIO Y LA BOMBA SERCA

La disminución en la anchura media de las señales de calcio por el tratamiento con diazóxido puede estar relacionada con una mayor recaptura del calcio por la bomba SERCA, o por una mayor capacidad para amortiguar un aumento del calcio después de un potencial de acción.

Con la finalidad de evaluar si existía una mayor actividad de la bomba SERCA, debido al acondicionamiento farmacológico, utilizamos inhibidores de PKA (H-89) y de CaMKII (KN-93), dos cinasas importantes que actúan fosforilando a PLN con lo cual provocan la activación de la bomba SERCA.

Los transitorios de calcio obtenidos al tratar las fibras con H-89 no presentaron cambios ni en la amplitud ni en la duración de la señal (valor promedio del $\Delta F/F$ en condiciones testigo: 4.82 ± 0.14, $n=122$; con H-89 (3 μM): 5.11 ± 0.26, $n=17$). El tratamiento concomitante de KN-93 + diazóxido, o de H-89 + diazóxido no revirtió la disminución en el curso temporal de la señal de calcio producido por el acondicionamiento con diazóxido, expresada como la anchura media de la señal (Fig. 9B-C). También podemos notar que el tratamiento con KN-93 produce por sí solo una disminución en la anchura media de la señal.

Estos datos sugieren que la disminución en la duración de las señales de calcio por el acondicionamiento farmacológico con diazóxido no está relacionada con una mayor actividad de la bomba SERCA.

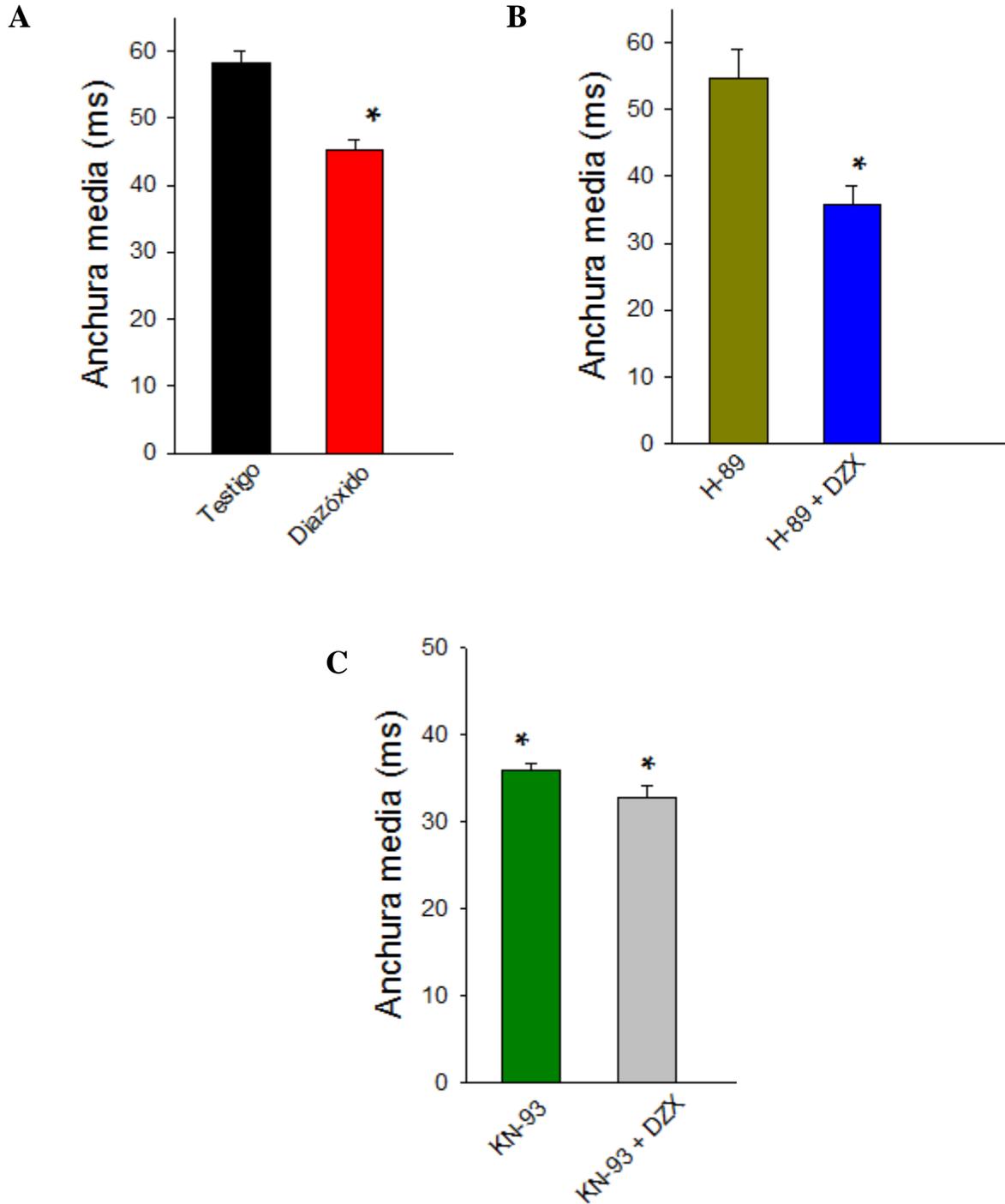


Fig. 9. Efecto de las cinasas PKA y CaMKII sobre el curso temporal de las señales de calcio en el preconditionamiento farmacológico con diazóxido. Duración de los transitorios de calcio en condiciones de preconditionamiento (A), preconditionamiento e inhibición de la cinasa PKA (B), preconditionamiento e inhibición de CaMKII (C) * $p < 0.05$ con respecto al testigo.

11.5 ANÁLISIS DE LA FASE DE CAÍDA DE LAS SEÑALES DE Ca^{2+} EN EL PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO TARDÍO

11.5.1 Fase de caída de los transitorios de calcio después de un estímulo simple

Para analizar los cambios en la concentración del Ca^{2+} intracelular las señales fluorescentes obtenidas con el indicador Fluo-3, fueron transformadas matemáticamente empleando la ecuación 1, en donde se consideran diferentes parámetros como son la constante de asociación y disociación del indicador al calcio así como la primera derivada del cambio en la fluorescencia, entre otros.

El análisis del curso temporal en la fase de caída de la concentración de calcio intracelular mostró una diferencia entre las condiciones testigo y de preconditionamiento. La velocidad de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ calculada a partir del ajuste de una exponencial simple a la fase de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de un pulso despolarizante (línea verde) fue considerablemente más rápida en fibras obtenidas de ratones tratados con diazóxido, PF tardío, (Fig. 10B) que en fibras testigo (Fig. 10A).

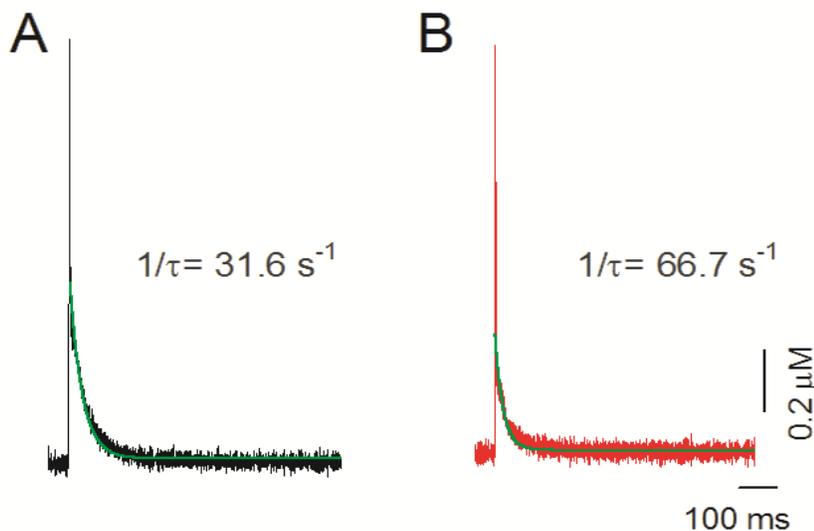


Figura 10. Análisis de los transitorios de calcio a partir de la ecuación 1. El ajuste de una exponencial simple a la fase de caída de la señal de Ca^{2+} se muestra con una línea verde, se indica también la constante de caída en cada trazo. **A.** señal de calcio en condiciones testigo. **B** señal de calcio en condiciones de PF tardío.

11.5.2 Fase de caída de los transitorios de calcio después de una estimulación repetitiva

Una manera de estudiar si la capacidad de amortiguar un aumento en la concentración del calcio citosólico está afectada en las fibras musculares es realizando protocolos de estimulación repetitiva a una frecuencia alta. A mayor duración de la estimulación tetánica menor será la capacidad de amortiguar calcio debido a una saturación de la PV. Así en nuestros experimentos cuando se aplicaron trenes de potenciales de acción con una frecuencia de 100 Hz y una duración de 50 ms, también se observó que los transitorios de Ca^{2+} decaen mucho más rápido en fibras precondicionadas, que en fibras testigo (Fig. 11A). Sin embargo, la diferencia en la fase de caída después de una estimulación tetánica entre las fibras precondicionadas y testigo fue menos evidente conforme aumentaba la duración de los trenes de pulsos. En la figura 11B se resume el valor promedio de la velocidad de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los transitorios de calcio en respuesta a un estímulo simple y a una estimulación repetitiva con diferente duración. La velocidad de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye conforme incrementa la duración del estímulo. La mayor velocidad de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se observa después de un estímulo simple. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la mayor velocidad de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones de precondicionamiento está relacionada con el sistema de amortiguamiento del calcio.

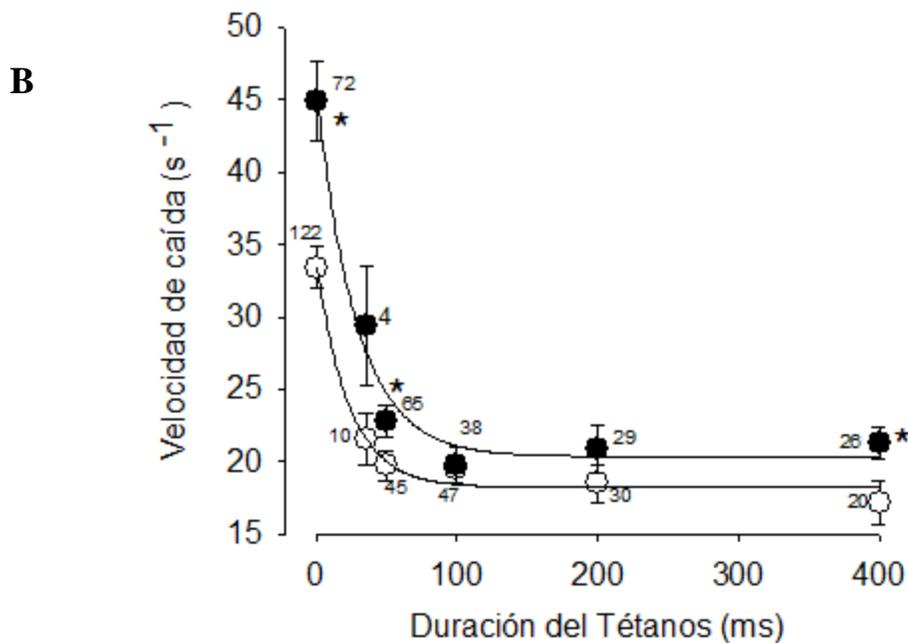
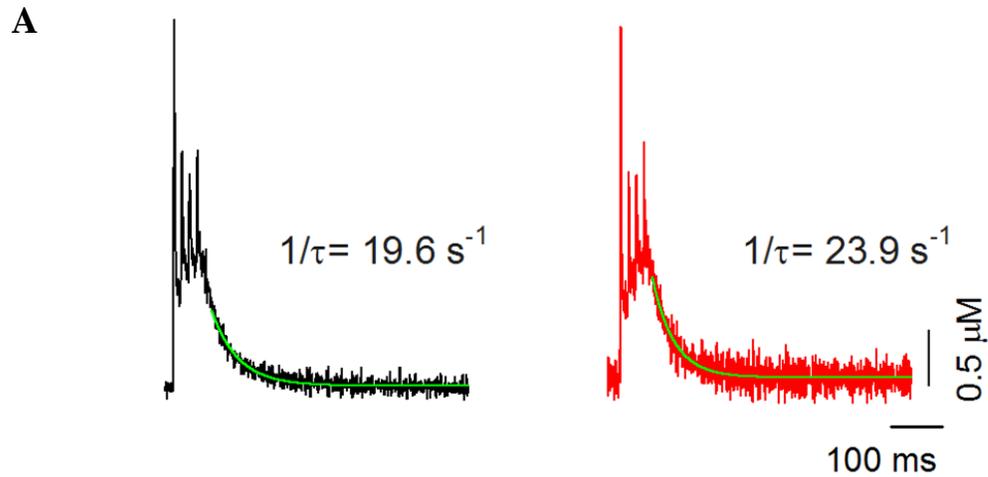


Figura 11. Efecto del PF tardío sobre las señales de Ca^{2+} producidas por una estimulación repetitiva. **A.** Señales de calcio en condiciones testigo (señal negra) y en PF tardío (señal roja) en respuesta a una estimulación a 100 Hz durante 50 ms. El ajuste de una exponencial simple a la fase de caída de la señal de Ca^{2+} se muestra con una línea verde. **B.** Valores promedio (\pm S.E.) de la velocidad de caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fibras testigo (círculos blancos) y de fibras en condiciones de PF tardío (círculos negros), con respecto a la duración de la estimulación tetánica. El número de experimentos se indica en cada punto. * $p < 0.05$.

11.6 AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE LA PARVALBÚMINA

Con base en los resultados de los experimentos de estimulación repetitiva, en donde se sugería una mayor capacidad de las células de amortiguar un aumento de calcio después de un potencial de acción en condiciones de preconditionamiento farmacológico con diazóxido, decidimos evaluar si existía un aumento de la expresión de la PV, proteína importante en los músculos rápidos para llevar a cabo la relajación muscular después de un potencial de acción. Por medio de estudios de *western blot* utilizando un anticuerpo anti-parvalbúmina logramos reconocer una banda de ~12 kDa, tamaño que corresponde a la PV del músculo (Arif, 2009).

Encontramos que los niveles de la proteína PV se incrementaron en el preconditionamiento tardío, en comparación con los niveles de la PV en condiciones testigo (Fig. 12A). El incremento de la PV en un 30 % fue consistente en 14 experimentos realizados de manera independiente. Los niveles de expresión de la proteína α -actina que utilizamos como normalizador no se modificaron por el preconditionamiento. En la figura 12B se muestra la densidad relativa de la expresión de la PV.

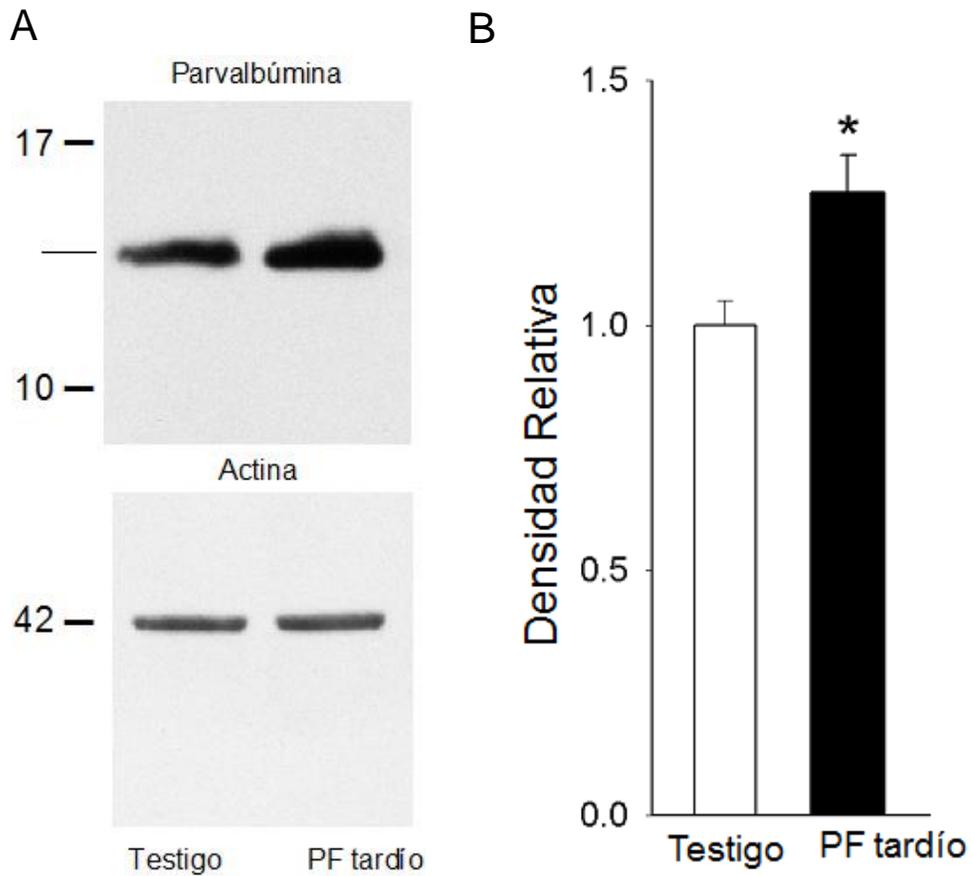


Figura. 12. Aumento de la expresión de la proteína parvalbúmina en el PF tardío.
A. panel superior, PV testigo y PV en PF tardío; panel inferior, actina.
B. Promedio del valor relativo de la densidad de las bandas de PV en condiciones testigo y de PF tardío (\pm S.D)
n = 7-14. * *p* < 0.05

11.7 SEGUNDA VENTANA DE PROTECCIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO

Para evaluar el efecto protector del diazóxido, los músculos *FDB* y *EDL* se sometieron a diferentes condiciones de daño: estrés oxidativo inducido por el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y daño por condiciones de hipoxia y reoxigenación para simular un proceso de I/R. El grado de daño celular fue determinado por medio del ensayo de MTT, en donde se analiza el número de células viables al medir la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales.

11.7.1 Estrés oxidativo con H_2O_2 en músculos *EDL*

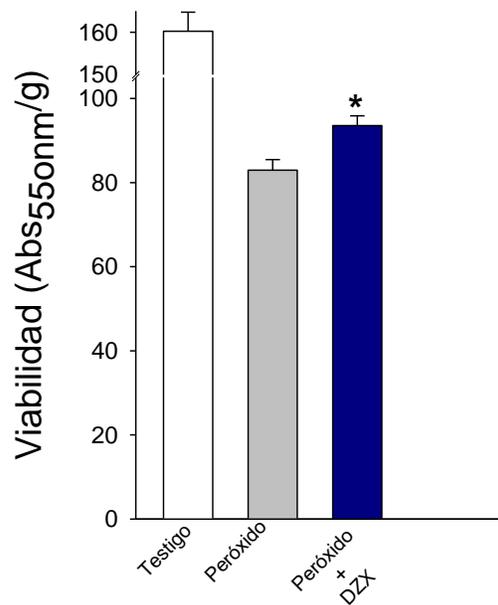
Se demostró una ligera protección por el preconditionamiento con diazóxido en los músculos *EDL* cuando éstos se sometieron a un estrés oxidativo con H_2O_2 (3mM) (Fig. 13 A). La viabilidad después del tratamiento con peróxido fue de 82.96 ± 2.5 ; $n=21$, mientras que en los músculos preconditionados con diazóxido fue de 93.54 ± 2.3 $n=32$. El estrés oxidativo con peróxido produjo una disminución en la viabilidad del 50 % con respecto al control.

11.7.2 Hipoxia y reoxigenación en músculos *FDB*

Por otra parte, los músculos *FDB* se sometieron a un estrés por hipoxia y reoxigenación. En estos experimentos se utilizaron los músculos *FDB* debido a que son mucho más pequeños y delgados que los músculos *EDL* por lo que la difusión de los gases es mejor. La viabilidad en hipoxia fue de 141.21 ± 14.21 , $n=6$, mientras que la viabilidad de los músculos de ratones que habían sido preconditionados fue de 188.54 ± 10.14 , $n=6$.

Como se puede observar el grado de protección que brinda el fármaco depende de las condiciones de estrés a la cual es sometido el músculo. Confirmamos también que el grado de protección es menos acentuado al reportado en la primera ventana de protección.

A. Músculos EDL



B. Músculos FDB

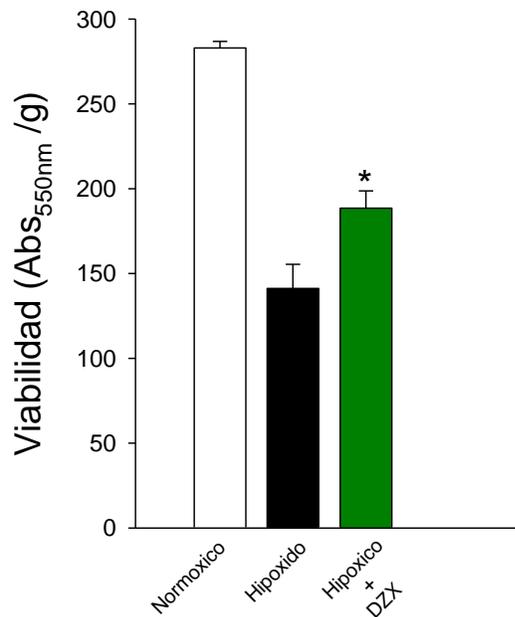


Figura 13. Efecto protector del acondicionamiento farmacológico en la segunda ventana de protección.

A. Viabilidad de los músculos *EDL* sometidos a un estrés con peróxido de hidrógeno.

B. Viabilidad de los músculos *FDB* sometidos a un proceso de hipoxia y reoxigenación.

* $p < 0.05$.

11.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL PRECONDICIONAMIENTO

Encontramos que el diazóxido genera un efecto protector en la segunda ventana del preconditionamiento en el músculo esquelético, el cual puede ser debido a un aumento en la expresión de la PV que produce una mayor capacidad de amortiguar un aumento de calcio y que se refleja en una fase de caída más rápida de las señales de calcio. Los mecanismos por los cuales el preconditionamiento con diazóxido ejerce un efecto protector no son del todo claros, algunos estudios han sugerido que el diazóxido tiene un efecto directo sobre el transporte de electrones en la mitocondria y de esta manera afecta la homeostasis energética de toda la célula (Schafer, 1969; Hanley, 2002; Dzeja, 2003). En neuronas se ha demostrado que el diazóxido induce el preconditionamiento tardío por la generación de ROS, en especial del anión superóxido (Kis et al., 2003).

Con el objetivo de investigar si las especies reactivas de oxígeno participaban en la generación de la segunda ventana de protección por el preconditionamiento farmacológico con diazóxido, realizamos experimentos con el *scavenger* de ROS tiron, el cual afecta principalmente la producción del anión superóxido. Evaluamos el efecto del tratamiento concomitante de diazóxido + tiron sobre la viabilidad celular, la expresión de la PV y finalmente sobre las señales de calcio.

11.8.1 Efecto protector del preconditionamiento y las ROS

En los experimentos de viabilidad celular el tratamiento concomitante de diazóxido + tiron revierte el efecto protector del diazóxido, tanto en músculos *EDL*, sometidos a un estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, como en los músculos *FDB*, sometidos a un estrés por hipoxia y reoxigenación (Fig. 14). Se observa también que el tratamiento con tiron no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular.

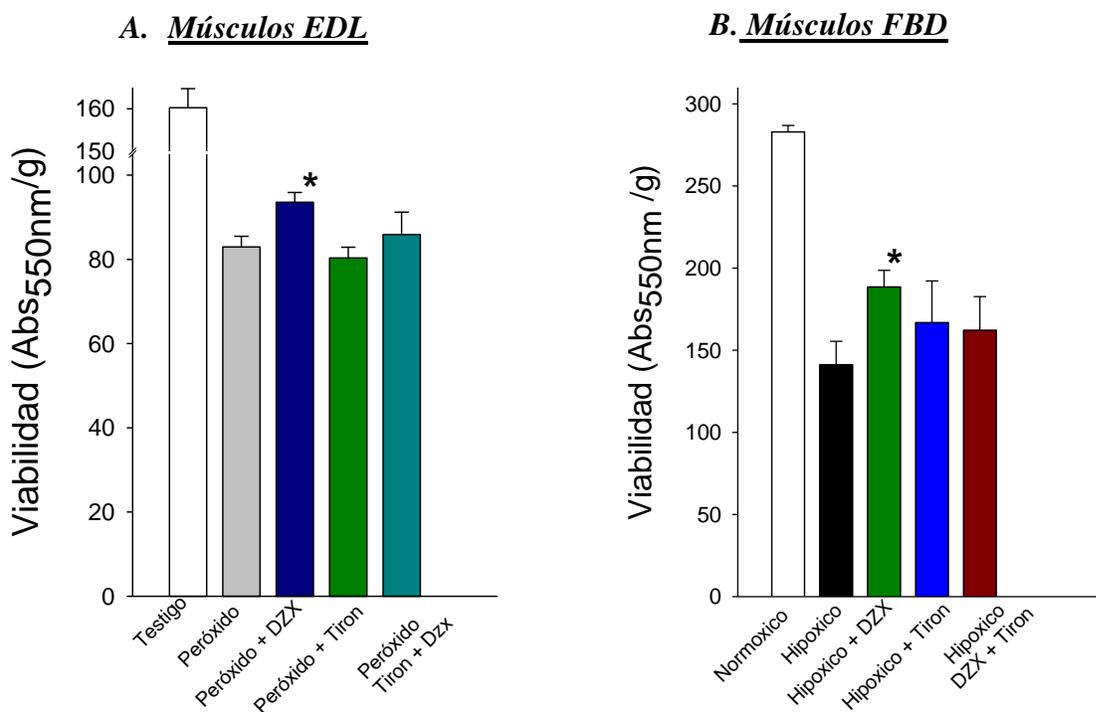


Figura 14. Inhibición del efecto protector del preconditionamiento con diazóxido por el *scavenger* tiron. Valores promedio (\pm S.E.) de la viabilidad celular en las condiciones indicadas. **A**, Músculos *EDL* sometidos a un estrés oxidativo, $n=13-32$. **B**, Músculos *FDB* sometidos a una hipoxia y reoxigenación, $n= 3-6$. * $p < 0.05$.

11.8.2 Parvalbúmina y las ROS

La inhibición de la protección que ofrece el diazóxido en la segunda ventana de protección por el tratamiento concomitante de tiron + diazóxido nos hizo pensar que si la expresión aumentada de la parvalbúmina era uno de los mecanismos que desencadenan la protección de manera tardía, su expresión también se vería afectada por el *scavenger* de ROS tiron. Encontramos que el tratamiento de tiron + diazóxido inhibe de manera parcial la expresión aumentada de la PV. En la fig. 15 se muestra la densidad relativa de la expresión de la parvalbúmina en las condiciones indicadas.

Expresión de la Parvalbúmina

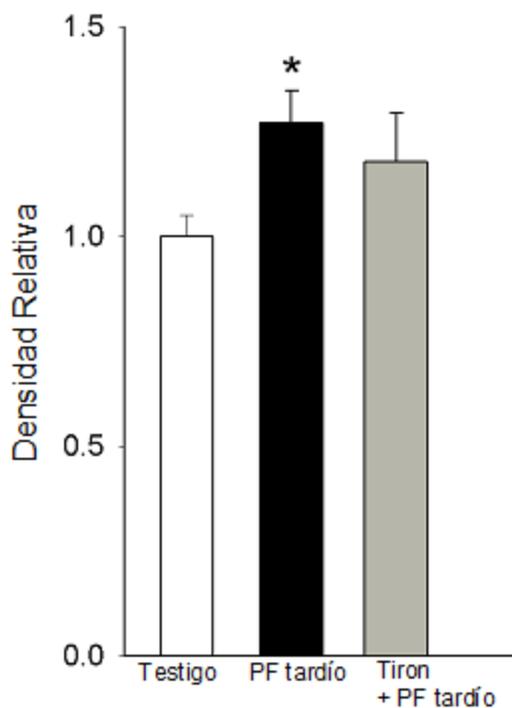


Figura 15. Efecto del *scavenger* de ROS tiron sobre la expresión de la parvalbúmina en el PF tardío. Valores promedio (\pm S.E.) de la densidad relativa de la expresión de la PV en las condiciones indicadas. * $p < 0.05$.

11.8.3 Participación de las ROS en los efectos del PF sobre las señales de calcio

De manera consistente con los resultados obtenidos con la expresión de PV mediante los experimentos de *western blot*, y los de viabilidad celular, el análisis de las señales de calcio mostró que el *scavenger* de ROS tiron bloquea el efecto del diazóxido en la fase de caída de los transitorios de calcio. Como ya se había descrito en el capítulo previo, la fase de caída es mucho más rápida en condiciones de PF tardío que en condiciones testigo (Fig. 16, A, B). Sin embargo, esta rápida caída no ocurre en fibras que fueron obtenidas de ratones a los cuales se les administró tiron antes de la inducción del PF tardío con diazóxido (Fig. 16C).

En resumen, tenemos que el valor promedio de la velocidad de caída en condiciones testigo fue de $33.4 \pm 1.4 \text{ s}^{-1}$ ($n = 122$), el valor promedio de la velocidad de caída en el PF tardío fue de $45.0 \pm 2.7 \text{ s}^{-1}$ ($n = 72$), y en condiciones de tiron + PF tardío el valor promedio de la velocidad de caída fue de $37.1 \pm 2.2 \text{ s}^{-1}$ ($n = 39$). El tratamiento con tiron por sí solo no tuvo efecto sobre la velocidad de caída de los transitorios de calcio, el valor promedio fue de $37.8 \pm 2.0 \text{ s}^{-1}$ ($n = 49$). Para visualizar el efecto del tiron de manera más clara, la fase de caída de los transitorios de calcio ilustrados en las figuras (16A-16C) se graficaron en una escala de tiempo expandida que abarca la fase de caída en el intervalo de 70 – 400 ms, como se muestra en la figura 16D el tiron bloquea el efecto del diazóxido.

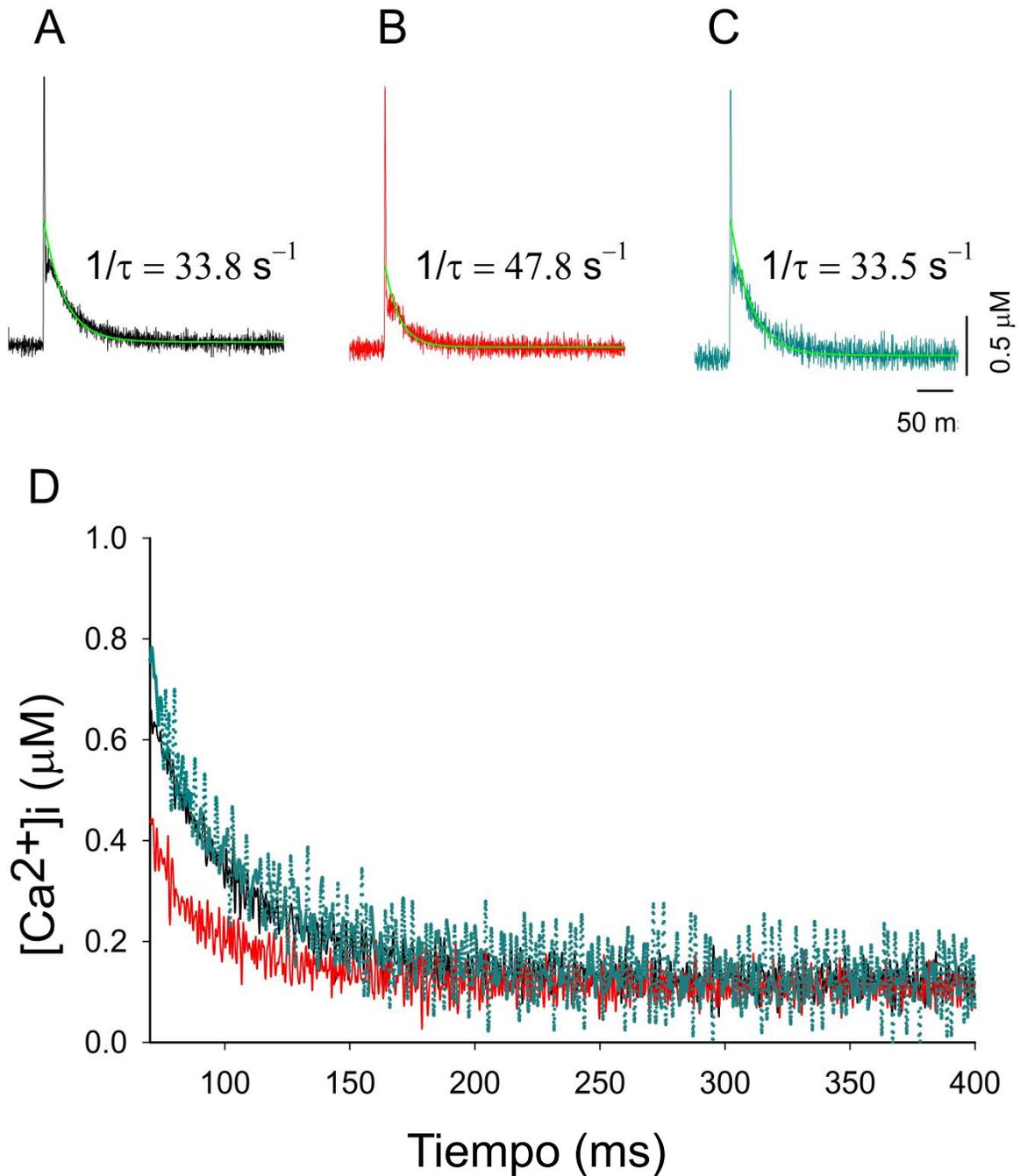


Figura 16. Efecto del *scavenger* de ROS tiron sobre la fase de caída de las señales de calcio. Tres experimentos independientes. Señal de calcio en condiciones testigo (A), en PF tardío (B), y de tirón + PF tardío (C) después de un sólo estímulo. Las líneas verdes indican el ajuste de una función exponencial simple a la fase de caída de las señales de Ca^{2+} . D, curso temporal de la caída de los transitorios de calcio mostrados en A-C en la escala de tiempo indicada.

12. DISCUSIÓN

Los abridores de los canales de potasio (KCOs, *potassium channel openers*), como el diazóxido y el pinacidil, han sido ampliamente estudiados por sus efectos protectores sobre la supervivencia celular en condiciones de isquemia y reperfusión. Se ha sugerido que el preconditionamiento farmacológico con estos fármacos induce protección a través de su acción sobre los canales de potasio dependientes de ATP que se encuentran en la mitocondria (mK_{ATP}) (Escande et al., 1992). La apertura de estos canales provocaría una mayor entrada de iones K^+ , por lo que el potencial de membrana mitocondrial disminuiría, incrementando así la tasa de respiración e induciendo un aumento en el volumen de la matriz mitocondrial, efectos que se han observado después de la administración de los abridores de los canales de potasio (Kowaltowski et al., 2001 y Debska et al., 2002). El mecanismo por el cual la modulación de la función mitocondrial por los KCOs participa en la protección no es del todo claro. Se ha propuesto que la protección es consecuencia de una modulación del volumen de la matriz mitocondrial (Dos Santos et al., 2002); una disminución de la recaptura de calcio por las mitocondrias debido a la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Facundo, 2005 y Sato et al., 2005); o por un ligero aumento de ROS de las mitocondrias que activarían vías de señalización de supervivencia celular (Samavati et al., 2002 y Sarre et al., 2005). Sin embargo, también ha sido cuestionado que la apertura de los canales mK_{ATP} sea el mecanismo protector de los KCOs. Se ha demostrado que el diazóxido en particular inhibe la succinato deshidrogenasa y se ha sugerido que induce la protección a través de vías independientes a la apertura de mK_{ATP} (Hanley et al., 2002).

El diazóxido es un fármaco que se ha utilizado ampliamente en muchos tejidos para estudiar la primera ventana de protección generada por el preconditionamiento farmacológico. La inducción de la segunda ventana de protección por el diazóxido se ha estudiado en neuronas y en corazón, pero no existe información acerca de su efecto protector en la segunda ventana de protección en el músculo esquelético.

En este trabajo nos enfocamos principalmente en la segunda ventana de protección por tener una duración mucho más larga. Además, optamos por el acondicionamiento farmacológico porque representa una estrategia poco agresiva en comparación con el acondicionamiento isquémico, el cual se induce principalmente por el uso de un torniquete.

12.1 Efecto agudo del diazóxido sobre los transitorios de Ca^{2+}

Se ha observado que el acondicionamiento farmacológico con diazóxido en el corazón mejora los niveles de síntesis de ATP y la respiración celular y que también disminuye la generación de ROS y evita la sobrecarga de calcio en las mitocondrias (Murata et al., 2001; Ozcan et al., 2002). Con la intención de investigar los mecanismos involucrados en la protección por el acondicionamiento farmacológico inducido con diazóxido en el músculo esquelético, en el presente estudio analizamos el efecto que tiene el tratamiento agudo con este fármaco en las células C2C12 y en fibras disociadas de músculos de ratón adulto sobre los transitorios de calcio generados después de un potencial de acción. Teníamos como antecedente que el diazóxido produce una disminución en las corrientes de calcio y una disminución en la amplitud de las señales de calcio a partir de una reducción en los canales de calcio tipo L en cardiomiocitos (Gonzalez et al., 2010), lo que sugiere fuertemente que el diazóxido puede modular de manera importante el manejo del calcio intracelular.

Inicialmente analizamos los transitorios de calcio generados en la línea celular C2C12 tratada con diazóxido. Demostramos que el tratamiento con diazóxido disminuye la amplitud de los transitorios de calcio generados a partir de un potencial de acción. Malinska et al., encontraron, en este mismo sentido, que hay una remoción de calcio más rápida en esta misma línea celular, pero con el abridor de los canales de potasio dependientes de ATP de la mitocondria BMS-191095 (Malinska et al., 2010). La incubación con BMS-191095 disminuyó la elevación del calcio citosólico inducida por un ionóforo (A23187).

A pesar de que la línea celular en su estado diferenciado es un modelo que ayuda a entender lo que ocurre en células musculares adultas no siempre logra ser una copia

fidedigna de los eventos que ocurren en células musculares adultas, es por ello que también analizamos el efecto del diazóxido sobre los transitorios generados por las fibras disociadas de músculos de ratón adulto. Encontramos que los transitorios generados después de un potencial de acción, en fibras que habían sido incubadas con diazóxido por 90 min, tenían una amplitud menor en comparación con el testigo.

Los transitorios que se generaron en la línea celular C2C12, fueron de menor amplitud (38 % menor el valor del $\Delta F/F$), comparados con los generados por las fibras disociadas.

Las diferencias observadas en la cinética de los transitorios de calcio entre la línea celular y las fibras disociadas pudieran deberse a diferencias en el contenido de calcio del retículo sarcoplásmico, así como a la eficiencia de los mecanismos responsables de la remoción del calcio del citosólico, es decir, la extrusión del calcio al medio extracelular, la recaptura del calcio hacia el retículo sarcoplásmico, y la recaptura hacia las mitocondrias que en la línea celular no estarían tan desarrollados.

12.2 Señales de calcio en la segunda ventana de protección

Encontramos que la inducción del preconditionamiento farmacológico con diazóxido genera transitorios de calcio en la segunda ventana de protección con un curso temporal menor duración que en condiciones testigo. Además, la velocidad de caída de la concentración del calcio intracelular aumentó significativamente en condiciones de preconditionamiento.

Estos cambios en la segunda ventana de protección podrían estar relacionados con una mayor recaptura del calcio intracelular por la bomba SERCA, y/o a una mayor capacidad de la célula de amortiguar el aumento del calcio intracelular después de un potencial de acción.

Para analizar la primera opción realizamos tratamientos concomitantes de diazóxido con dos inhibidores de las cinasas PKA (H-89) y CaMKII (KN-93). Estas cinasas actúan fosforilando al fosfolambano por lo que activan a la bomba SERCA. Encontramos que ninguno de los dos tratamientos, diazóxido + H-89 ni diazóxido + KN-93, revertían el

efecto del acondicionamiento farmacológico de disminuir el curso temporal de los transitorios de calcio.

Al analizar la velocidad de caída de la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones de estimulación repetitiva encontramos que el aumento de la velocidad de caída en el acondicionamiento era menos evidente conforme aumentaba la duración del tétanos. Estos resultados eran consistentes con la segunda opción de que la capacidad amortiguadora de la célula en condiciones de acondicionamiento se encontraba aumentada y que en condiciones de estimulación repetitiva empezaba a saturarse, es decir, la velocidad de caída disminuía (Carroll et al., 1997). Además, los experimentos en condiciones de estimulación repetitiva demuestran que la actividad de la bomba SERCA no participa de manera significativa en la remoción del calcio intracelular en este modelo de acondicionamiento farmacológico. Como podemos observar en la gráfica 11B la velocidad de caída del calcio intracelular después de la estimulación repetitiva que estaría mediada por la bomba SERCA, sólo mostró un ligero aumento en condiciones de acondicionamiento.

Teniendo en cuenta que la principal proteína amortiguadora en fibras rápidas es la PV, decidimos analizar la expresión de la proteína en el acondicionamiento farmacológico.

12.3 Evidencia de la importancia de la parvalbúmina en el acondicionamiento tardío

Encontramos mediante experimentos de *western blot* que la expresión de la proteína parvalbúmina aumentaba en su expresión en un 30 % en condiciones de acondicionamiento. Estos resultados sugerían fuertemente la participación de la PV como la proteína responsable del aumento en la velocidad de caída del calcio intracelular después de un estímulo simple que se observa en condiciones de acondicionamiento.

Existe suficiente evidencia que indica que la PV juega un papel importante disminuyendo el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ asociada con la actividad de fibras musculares rápidas. En primer lugar, existe una correlación entre la concentración de la PV y la velocidad de relajación de los músculos de mamíferos (Heizmann et al., 1982). Segundo, el tiempo de relajación y de caída del $[Ca^{2+}]_i$ asociado con la actividad de músculos obtenidos

de ratones *knockout* a la PV es mucho más lenta que en músculos de ratones silvestres (Schwaller et al., 1999; Raymackers et al., 2000). Además experimentos en los cuales se ha expresado la PV en músculos lentos que normalmente no la expresan han mostrado una reducción en el tiempo medio de relajación (Müntener et al., 1995; Chin et al., 2003)

12.4 Precondicionamiento farmacológico con diazóxido

Existen diferentes modelos de daño celular para estudiar la fisiopatología de una I/R, todos ellos se basan en los diferentes procesos patológicos que se desencadenan: el aumento de los niveles intracelulares de calcio, el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno y la disminución en la producción de ATP (véase revisión por Murphy, 2008).

Para estudiar la isquemia y reperfusión en el músculo esquelético una gran mayoría de trabajos han utilizado el músculo *gastrocnemio*, el cual es de gran tamaño, y el daño celular se ha producido principalmente por el uso de un torniquete que obstruye el flujo sanguíneo al músculo. Debido a que nuestro principal interés fue estudiar el efecto del precondicionamiento farmacológico y el manejo del calcio intracelular decidimos utilizar músculos más pequeños como el *FDB*, interóseo y *EDL*. Además, con estos músculos es posible obtener fibras aisladas que nos permiten medir los cambios en el calcio intracelular después de un potencial de acción con la ayuda de indicadores fluorescentes, cosa que no se puede hacer con el músculo *gastrocnemio*. Los músculos que sometimos a diferentes condiciones de daño celular fueron los músculos *EDL* y *FDB*, el modelo de daño celular al que se sometió cada músculo dependió de las características físicas de cada músculo. En los músculos *EDL* el daño celular fue inducido por el tratamiento con peróxido de hidrógeno y para los músculos *FDB* el daño se produjo por condiciones de hipoxia y reoxigenación. Ambos modelos de daño han sido utilizados para imitar los eventos responsables de un daño celular durante una I/R.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno se ha utilizado tanto en la línea celular C2C12 como en músculos *EDL* para imitar un estrés oxidativo (Malinska et al., 2010; McArdley et

al., 2004; Sandtröm et al., 2006). El peróxido de hidrógeno actúa principalmente causando un daño oxidativo a proteínas, lípidos y al DNA.

Por otra parte el daño por una I/R fue simulado por un modelo *in vitro* en el cual los músculos se someten a condiciones de hipoxia y reoxigenación, este método se ha utilizado para demostrar el preconditionamiento isquémico en muestras de biopsias de músculos de humanos (Martou et al., 2006). En este modelo se crean las condiciones de isquemia al limitar a los músculos de los nutrientes y del oxígeno, y la reperusión se imita al restablecer la incubación de los músculos en condiciones de oxigenación y nutrientes adecuadas. En este modelo se utilizaron los músculos *FDB*, considerando que son más delgados que los músculos *EDL* por lo que la difusión de los gases es adecuada.

En ambos modelos de daño celular encontramos que el tratamiento con diazóxido 48 horas antes de someter a los músculos de ratón a un estrés oxidativo o a un estrés por hipoxia–reoxigenación aumentó significativamente la supervivencia celular, medida como la viabilidad celular. A pesar de que la viabilidad disminuyó en un 50 % en ambas condiciones de estrés el grado de protección fue diferente. Se observó una mayor protección en los músculos *FDB* (16 % de aumento en la viabilidad con respecto al testigo) sometidos a una hipoxia y reoxigenación. También comprobamos que el grado de protección en la segunda ventana de protección es menos acentuado (Harralson et al., 2005) que el que se produce en la primera ventana de protección ya sea por el preconditionamiento isquémico o por el preconditionamiento farmacológico (Pang et al., 1995; Moses et al., 2005)

12.5 Las ROS en el preconditionamiento

Otro hallazgo importante es que nuestros experimentos sugieren fuertemente la participación de los ROS en el preconditionamiento tardío del músculo esquelético, ya que el tratamiento con el *scavenger* de ROS tiron bloquea su efecto protector ante un daño por estrés oxidativo o por un estrés por hipoxia y reoxigenación.

Además, los ROS también estarían implicados en el aumento de la expresión de la PV como lo demuestran los experimentos en los cuales el tratamiento concomitante de diazóxido + tiron bloquean de manera parcial el aumento de la expresión de la proteína.

Finalmente se demostró que la aplicación de tiron más diazóxido inhibe el incremento en la velocidad de caída de la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones de preconditionamiento tardío.

En el músculo cardíaco se ha demostrado de manera extensa la participación de los ROS en el preconditionamiento (Yellon y Downey, 2003), nuestros resultados apoyarían la idea de que los ROS participan también en el preconditionamiento del músculo esquelético en la segunda ventana de protección. Además, se ha propuesto que el diazóxido puede tener efecto sobre la producción de ROS dependiendo del estado metabólico de la célula y del potencial de membrana de la mitocondria. El diazóxido puede inhibir el complejo II de la cadena transportadora de electrones y promover la generación de ROS de manera transitoria en el complejo III durante el preconditionamiento, o puede atenuar la producción de ROS en el complejo I durante un proceso de I/R (Dröse et al., 2009).

Una modulación del manejo del calcio intracelular durante el preconditionamiento en la primera ventana de protección también ha sido demostrada en el corazón, en donde el principal mecanismo fue una disminución en la proteína α_{1C} , la principal subunidad formadora del canal de calcio tipo L (Gonzalez et al., 2010). De igual manera nuestros datos apoyarían la importancia de mantener una homeostasis adecuada en condiciones de estrés en el músculo esquelético durante la segunda ventana de protección al aumentar la expresión de la parvalbúmina que amortiguaría un aumento en el calcio intracelular originado por un daño celular.

Las células producen una amplia variedad de especies reactivas de oxígeno, pero es importante resaltar que el blanco de acción del tiron es el anión superóxido (Krishma et al., 1992). Sugerimos que el anión superóxido es una de las principales especies reactivas en el acondicionamiento tardío del músculo esquelético. En neuronas se ha demostrado también que uno de los mecanismos por el cual el diazóxido induce la segunda ventana de protección es por la generación de ROS, en especial por la producción del anión superóxido, en este mismo trabajo encontraron que el peróxido de hidrógeno no participa en dicha protección (Kis et al., 2003).

12.6. Mecanismo de protección inducido por el acondicionamiento en el músculo esquelético durante la segunda ventana de protección.

Los mecanismos moleculares que inducen la segunda ventana de protección en el músculo esquelético no se han establecido del todo. Nosotros sugerimos que en el músculo esquelético el aumento de la expresión de la PV juega un papel muy importante al disminuir el daño que se observa durante una I/R. Esta proteína ayudaría a bajar los niveles intracelulares de calcio que se encuentran aumentados en el daño del músculo durante una reperfusión, (Rubin, 1996), al aumentar la capacidad de la célula de amortiguar una sobrecarga de calcio.

Se ha demostrado que el aumento de la expresión de la PV en motoneuronas las protege de un daño excitotóxico al aumentar la capacidad de las neuronas de amortiguar una sobrecarga de Ca^{2+} (Van Den Bosch et al., 2002). Además, al inducir la expresión de la PV en las motoneuronas también se les confiere menor susceptibilidad a los efectos producidos por un daño al nervio ciático en ratas neonatas (Dekkers et al., 2004).

En nuestros experimentos con los inhibidores de PKA y CaMKII no encontramos una relación entre la disminución en el curso temporal de las señales de calcio y la bomba SERCA, por lo que se sugiere que la principal proteína responsable de una disminución en el curso temporal de las señales de calcio después de un potencial de acción es la parvalbúmina. Otra proteína que podría estar involucrada con la actividad de la bomba SERCA es la sarcolipina, esta proteína interactúa con la bomba SERCA y produce una

reducción en la acumulación de calcio en el retículo sarcoplásmico (Vandecaetsbeek et al., 2011). Así tenemos que una reducción en la expresión de la sarcolipina podría incrementar la actividad de la bomba SERCA y de esta manera generar transitorios de calcio rápidos. Sin embargo, en experimentos con fibras musculares rápidas provenientes de ratones *null* a sarcolipina no se encontraron cambios en la actividad de la bomba o en la relajación del músculo después de un potencial de acción (Tupling et al., 2011)

Entre los mecanismos que generan la segunda ventana de protección no descartamos que existan diferentes blancos de acción de las ROS, nosotros encontramos que el tiron revierte de manera total el aumento en la velocidad de caída del $[Ca^{2+}]_i$ de los transitorios de calcio en el acondicionamiento, mientras que el aumento de la expresión de la proteína parvalbúmina fue inhibido parcialmente.

13. CONCLUSIONES

El acondicionamiento farmacológico con diazóxido durante la primera ventana de protección produce una disminución de la amplitud de los transitorios de calcio tanto en la línea celular como en las fibras disociadas de músculos de ratones adultos. Contrario a lo que se había encontrado en músculo cardíaco la disminución en la amplitud de los transitorios de calcio no estuvo correlacionada con una disminución en las corrientes de calcio.

Este trabajo es el primero en explorar el acondicionamiento farmacológico con diazóxido en el músculo esquelético durante la segunda ventana de protección. Demostramos que el diazóxido induce la segunda ventana de protección protegiendo a los músculos en contra de un daño por I/R o por un estrés oxidativo.

Durante la segunda ventana de protección producida por el diazóxido los cambios en los transitorios de calcio estuvieron relacionados con una disminución en su curso temporal.

Nuestros hallazgos sugieren que el efecto protector del diazóxido en la segunda fase de protección en el músculo esquelético puede ser explicado por una mayor capacidad de la célula para mantener la homeostasis del calcio intracelular durante condiciones estresantes, como puede ser un daño a nivel oxidativo o por una I/R. El aumento de la proteína parvalbúmina favorece una mayor capacidad de la célula para amortiguar una sobrecarga de calcio.

Así mismo nuestros resultados sugieren que en la vía de señalización que conduce al aumento de la expresión de la proteína parvalbúmina por el acondicionamiento farmacológico con diazóxido participan las especies reactivas de oxígeno, en especial el anión superóxido.

14. PERSPECTIVAS

Los mecanismos que generan la segunda ventana de protección en el músculo esquelético no se han estudiado tan extensamente como en otros tejidos. Nuestro trabajo abre la posibilidad de estudiar el preconditionamiento por medio de fármacos como el diazóxido y la utilización de modelos *in vitro* para imitar los cambios que se dan durante una I/R en el músculo esquelético.

La demostración por primera vez de la participación de la parvalbúmina en el preconditionamiento deja todavía muchas preguntas por resolver entre ellas ¿cuáles son las vías de señalización que se encuentran activadas que producen un aumento de su expresión? Nuestros experimentos sugieren fuertemente la participación del anión superóxido dentro de la vía que conduce al aumento de su expresión. Por otra parte se ha demostrado que en ratones *knockout* para el cofactor transcripcional PCG-1 α (transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) se produce una reducción de la proteína parvalbúmina en neuronas GABAérgicas (Lucas et al., 2010). Sería, por lo tanto, interesante analizar si la expresión de la parvalbúmina está mediada por este cofactor transcripcional durante un proceso isquémico. Se tiene, además, evidencia que la modulación de este factor en el músculo esquelético puede estar mediada por las especies reactivas de oxígeno (véase revisión por Barbieri y Sestili 2011).

Finalmente, se podría estudiar la participación que pudiera tener la parvalbumina en la isquemia del cerebro, ya que se tiene evidencia que el aumento de la expresión de la parvalbúmina protege a las motoneuronas de un daño excitotóxico al aumentar la capacidad de las neuronas para amortiguar una sobrecarga de Ca²⁺ producida por un daño con ácido kaínico (Van Den Bosch et al., 2002).

BIBLIOGRAFÍA

Arif, S.H. 2009. A Ca²⁺-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *BioEssays* 31: 410–421.

Ardehali H and O'Rourke B. 2005. Mitochondrial K_{ATP} channels in cell survival and death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 39: 7-16

Badhwar A, Bihari A., Dungey A., Scott J. R., Albion C. D., Forbes T. L., Harris K. A., and Potter R. F. 2004. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 36, No. 3, pp. 371 – 379.

Barbieri E. and Sestili P. 2012 Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *Journal of Signal Transduction* 2012;2012:982794

Baylor S.M and Stephen Hollingworth S. 2012. Intracellular calcium movements during excitation contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *The Journal of General Physiology* Vol. 139 No. 4 261–272

Beam K.G., and P. Horowicz. 2004. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. In *Myology*. A.G. Engel and C. Franzini-Armstrong, editors. McGraw-Hill, New York. 257–280.

Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26(5):509–17.

Bidaud I, Monteil A., Narfeot J., and Lory P. 2006. Properties and role of voltage-dependent calcium channels during mouse skeletal muscle differentiation. *Journal of Muscle research and Cell Motility*. 27:75-81

Blaisdell FW. 2002. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardiovasc Surg*. 10:620.

Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000;87:972-983.

Bonventre JV. 2002. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens*.11: 43.

Bushell, A. J., Klenerman, L., Taylor, S., Davies, H., Grierson, I., Timothy R., et al. 2002. Ischaemic preconditioning of skeletal muscle. *Bone Joint. Surg*. 84:1184-1188.

Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M. R., et al. 2000. Role of the calcium binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 13372–13377.

Caputo, K. A. P. Edman, F. Lou and Y.-B. Sun. 1994. Variation in myoplasmic Ca^{2+} concentration during contraction and relaxation studied by the indicator fluo-3 in frog muscle fibres. *Journal of Physiology*. 478, 137-148.

Caputo, P. Bolaños and A. L. Escobar. 1999. Fast calcium removal during single twitches in amphibian skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 20: 555-567.

Carroll S.L., Klein M.G. and Schneider M.F. 1997. Decay of calcium transients after electrical stimulation in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*. 501, 573-588.

Cheng, H., Lederer W.J., Cannell M.B. 1993. Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle. *Science*. 262, 740-744.

Chin E.R., Grange R.W., Viau F., Simard A.R., Humphries C., Shelton J., Bassel-Duby R., Sanders R., Williams and Michel R.N. 2003. Alterations in slow-twitch muscle phenotype in transgenic mice overexpressing the Ca^{2+} buffering protein parvalbumin. *J Physiol*. 547, 649–663.

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. 1994. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*. 345(1):50–4.

Cohen MV, Baines CP, Downey JM. 2000. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol*. 62:79 –109.

Curci R., Battistelli M., Burattini S., D' Emilio A., Ferri P., Lattanzi D., Ciuffoli S., Ambrogini P., Cuppini R., Falcieri E. 2008. Surface and inner cell behaviour along skeletal muscle cell in vitro differentiation. *Micron* 39: 843-851.

Debska G, Kicinska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS. 2002. Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1556:97-105.

Dekkers J., Bayley P., Dick J.R.T., Schwaller B., M. W. Berchtold M.W., and Greensmith L. 2004. Over-expression of parvalbumin in transgenic mice rescues motoneurons from injury-induced cell death. *Neuroscience* 123, 459–466.

Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Garlid KD. 2002. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive $\text{K}(+)$ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283:H284-H295.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

Dröse S., Hanley P. J., Ulrich Brandt. 2009. Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 : 558–565

Endo M. 2006. Calcium Ion as a Second Messenger With Special Reference to Excitation-Contraction Coupling. *Journal of Pharmacological Sciences*. 100: 519 – 524

Escande D, Cavero I. 1992. K⁺ channel openers and ‘natural’ cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci*.13:269-272.

Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ.2005. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J. Bioenerg Biomembr*. 37:5-82.

Feissner R.F., Skalska J., Winston E. Gaum, and Shey-Shing Sheu. 2009. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Frontiers Biosci*. January 1; 14: 1197-1218.

Flagg T.P., Enkvetchakul D., Koster J.C., and Colin G. Nichols. 2010. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. *Physiol Rev* 90: 799–829.
Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 13:1423

Gissel H. 2005. The Role of Ca²⁺ in Muscle Cell Damage *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1066: 166–180

Goodman, M., Peche´ re, J. F., Haiech, J. and Demaille, J. G. 1979. Evolutionary diversification of structures and function in the family of intracellular calcium binding proteins. *J Mol Evol*. 13: 331–352.

Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426: 895-899.

González, G., Zaldívar, D., Carrillo, E.D., Hernández, A., García, M.C., Sánchez, J.A. 2010. Pharmacological preconditioning by diazoxide downregulates cardiac L-type Ca²⁺ channels. *British J.Pharmacol*. 161: 1172–1185.

Greed DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 81:1309.

Griffiths EJ, Halestrap AP. 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 307:93.

Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE. 2000. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 92:1-6.

Groot H, Rauen U. 2007. Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: A review. *Transplant Proc.* 39:481.

Grover G. J, Burkett D.E., Charles S. Parham, Robert J. Scalese, and Sadanaga K.K. 2003. Protective Effect of Mitochondrial KATP Activation in an Isolated Gracilis Model of Ischemia and Reperfusion in Dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 42: 790–792

Harralson T., Grossi FV., Quan E., Tecimer T., Perez-Abadia G., Anderson G., Barker JH., y Maldonado C. 2005. Ischemic Preconditioning of Skeletal Muscle Duration of Late-Phase Protection. *Ann Plast. Surg.* 55: 216-222

Halestrap AP. 1999. The mitochondrial permeability transition: Its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp.* 66:181.

Hallström S, Gasser H, Neumayer C, Fügl A, Nanobashvili J, Jakubowski A, et al. 2002. S nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release. *Circulation* 105:3032-8.

Hanley PJ, Mickel M, Löffler M, Brandt U, Daut J. 2002. K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5- hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol.* 542:735-741.

Heizmann C.W., Berchtold M.W., and Rowlerson A.M. 1982. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc. NatL Acad. Sci. USA.* 79, 7243-7247.

Hopper R.A., Forrest C.R., Xu H., Zhong A., Wei He, Rutka J., Neligan P., and Cho Y. Pang. 2000. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R666–R676

Hussain M, Wareham AC, Head SI.1994. Mechanism of action of a K_v channel activator BRL 38227 on ATP-sensitive K_v channels in mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 478: 523–532.

Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. 1997. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock.* Aug;8(2):86-94

Jekabsone A, Ivanoviene L, Brown GC, Borutaite V. 2003. Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release. *J Mol Cell Cardiol.* 35(7):803–9.

Kharbanda RK, Peters M, Walton B, et al.2001. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation.* 103:1624-1630.

Kin JS, He L, Lemasters JJ. 2003. Mitochondrial permeability transition: A common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:463.

Kis, B., Rajapakse, N.C., Snipes, J.A., Nagy, K., Horiguchi, T., Busija, D.W. 2003. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 87: 969–980.

Kohin S., Creed M. Stary, Richard A. Howlett and Michael C. Hogan. 2001. Preconditioning improves function and recovery of single muscle fibers during severe hypoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C142-C146.

Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. 2001. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H649 H657.

Krishna, C.M., Liebmann, J.E., Kaufman, D., DeGraff, W., Hahn, S.M., McMurry, T., et al. 1992. The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 294: 98-106.

Lee C, Liu X, Zweier JL. 2000. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275: 9369-9376.

Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. 1998. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: Novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97:2463–2469.

Lucas E., Markwardt SJ., Gupta S., Meador-Woodruff JH., Lin D., Overstreet-Wadiche L., and Cowell R. 2010. Parvalbumin Deficiency and GABAergic Dysfunction in Mice Lacking PGC-1 α . *The Journal of Neuroscience.* 30(21):7227–7235.

MacIntosh B.R., Robert J. Holash R.J., and Jean-Marc Renaud. 2012. Skeletal muscle fatigue – regulation of excitation–contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. *Journal of Cell Science* 125:2105–2114

MacLennan, D.H., and Kranias, E.G. 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 566–577.

Malinska D., Kulawiak B., Wrzosek A., Wolfram S. Kunz and Adam Szewczyk A. 2010. The Cytoprotective Action of the Potassium Channel Opener BMS-191095 in C2C12 Myoblasts is Related to the Modulation of Calcium Homeostasis. *Cell Physiol Biochem.* 26:235-246

Martou G., O'Blenes C.A., Huang N., McAllister S.E., Neligan P. C., Ashrafpour H., Pang C.Y., and Joan E. Lipa J.E. 2006. Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol.* 101, 1335-1342.

Magill T, Murphy D. J, Bouchier-Hayes K. J, Mulhall. 2009. Preconditioning and its clinical potential. *Ir J Med Sci* 178:129–134

McArdle, S, Spiers, H, Aldemir, A, Vasilaki, A, Beaver, L, Iwanejko, A, McArdle and M. J. Jackson 2004. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J Physiol* 561.1:233–244

McCord JM. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108: 652-659.

McCormack JG, Denton RM. 1993. Mitochondrial Ca^{2+} transport and the role of intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci*.15(3–5):165–73.

Minners J., Lacerda L., McCarthy J., Meiring J.J., Yellon D.M., and Sack M.N. 2001. Ischemic and pharmacological preconditioning in Girardi cells and C2C12 myotubes induce mitochondrial uncoupling. *Cir. Res.* 89, 787-792.

Minners J., Lacerda L., Yellon D.M., H. Opie L., J. McLeod C and Sack M.N. 2007. Diazoxide induced respiratory inhibition a putative mitochondrial K_{ATP} channel independent mechanism of pharmacological preconditioning. *Molecular and cellular Biochemistry.* 294: 11-18

Moses, M.A., Addison, P.D., Neligan, P.C., Ashrafpour, H., Huang, N., Zair, M. et al. 2005a Mitochondrial K_{ATP} channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am. J. Physiol. Heart .Circ. Physiol.* 288: H559-H567.

Müntener M., Käser L., Weber J., and Berchtold M.W. 1995. Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 6504-6508.

Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marbán E. 2001. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 89:891-898.

Murphy E, Steenbergen C. 2008. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia reperfusion injury. *Physiol Rev* 88: 581–609

Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A. 2002. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:H531-H539.

Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. 1995. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 782.

Pang, CY, Neligan, P., Xu, H., He, W., Zhong, A., Hopper, R., et al. 1997. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am. J. Physiol.* 273: H44-H51.

Pasupathy S., Shervanthi Homer-Vanniasinkam. 2005. Surgical Implications of Ischemic Preconditioning. *Arch Surg.*140:405-409

Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA. 2002. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol.* 27:349-95.

Raymackers J.M., Gailly P., ColsonVan Schoor M., Pette D., Schwaller B., Hunziker W., Celio M.R. and Gillis J.M. 2000. Tetanus relaxation of fast skeletal muscles of the mouse made parvalbumin deficient by gene inactivation. *Journal of Physiology.* 527.2, 355-364.

Reid, M.B. 2001. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90: 724–731.

Rodenbaugh, D. W., Wang, W., Davis, J., Edwards, T., Potter, J. D., et al. 2007. Parvalbumin isoforms differentially accelerate cardiac myocyte relaxation kinetics in an animal model of diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 293: H1705–H1713.

Rubin Barri B, Alexander Romaschin, Paul M. Walker, Dean C. Gute, and Ronald J. Kosthuis. 1996 Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. *J. Appl. Physiol* 80 (2): 369-387

Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW, Hunninghake GW. 2002. Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C273-C281.

Sandström M.E., Zhang S, Bruton J., Silva JP, Reid M., Westerblad H., Katz A. 2006. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol* 575.1 pp 251–262

Sarre A, Lange N, Kucera P, Raddatz E. 2005. mitoKATP channel activation in the postanoxic developing heart protects EC coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H1611-H1619.

Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. 2005. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* 111:198-203.

Schwaller B., Dick J., Dhoot G., Carroll S., Vrbova G., Nicotera P., Pette D., Wyss A., Bluethmann H., Hunziker W. and Celio M.R. 1999. Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 276, C395-C403.

- Shirokova, N., García, J., and Rios, E. 1998. Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* **512**: 377–384.
- Stamler JS, Meissner G. 2001. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **81**: 209-237
- Tanabe T., Beam K.G., Powell J.A., and Numa S. 1988 . Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature.* **336**: 134 –139.
- Thomas, D., Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Lipp, P. 2000. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* **28**: 213–233.
- Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. 2004. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann Transplant.* **9**:81.
- Tupling A.R. 2009. The decay phase of Ca²⁺ transients in skeletal muscle: regulation and physiology. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **34**: 373–376
- Tupling, A.R., Bombardier, E., Gupta, S.C., Hussain, D., Vigna, C., Bloemberg, D., et al. 2011. Enhanced Ca²⁺ transport and muscle relaxation in skeletal muscle from sarcolipin-null mice .*Am J.Physiol. Cell Physiol.* **301**:C841-C849
- Olivieri C. 2010. Cell death: Insights into the ultrastructure of mitochondria. *Tissue and Cell.* **42**:339.
- Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vanoevelen, J. 2011. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**:a004184.
- Van Den Bosch L., Schwaller B., Vleminckx V., Meijers B., S. Stork S., Ruehlicke T., Van Houtte E., H. Klaassen, Celio M.R., Missiaen L., Robberecht W., and Berchtold M.W. 2002. Protective Effect of Parvalbumin on Excitotoxic Motor Neuron Death. *Experimental Neurology* **174**, 150–161.
- Vergara, J.L., Difranco, M., Compagnon, D., Suárez-Isla, B. 1991. Imaging of calcium transients in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* **59**: 12–24
- Vergun O, Reynolds IJ. 2004. Fluctuations in mitochondrial membrane potential in single isolated brain mitochondria: modulation by adenine nucleotides and Ca²⁺ *Biophys J.* **87**(5):3585–93.
- Vignaud A, Hourde C, Medja F, et al. 2010. Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *J Biomed Biotechnol*

Wang Weid Z., Xin-Hua Fang, Linda L. Stepheson, Kayvan T. Khiabani, Willarm A. Zamboni. 2004. NOS upregulation attenuates vascular endothelial dysfunction in the late phase of ischemic preconditioning in skeletal muscle. *Journal of Orthopaedic Research* 22: 578-585

Wang Weid Z., M.D., Shang Z. Guo, M.D., Gary L. Anderson, Ph.D., and Frederick N. Miller, Ph.D. 2001. The Initiating Factors of Late Preconditioning in Skeletal Muscle. *Journal of Surgical Research* 99, 92-99.

Wang Weid Z, Fang XH, Stephenson LL, et al. 2008. Ischemia/reperfusion- induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res.* 26:351.

Wang Weid Z, Fang XH, Stephenson LL, et al. 2010. Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J Surg Res.*

Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, et al. 2004. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 35:616-21.

Weid W, Fu-Chan Weid & Li-Man Hungd. 2005. Diazoxide ameliorates microcirculatory disturbances through PKC-dependent Pathway in I/R-injured rat cremaster muscles. *Journal of Biomedical Science.* 12:521–529

Weiss, N., Andrianjafiniony, N.T., Dupré-Aucputurier, S., Pouvreau,S., Desplanches, D., Jacquemond, V. 2010. Altered myoplasmic Ca²⁺ handling in rat fast-twitch skeletal muscle fibres during disuse atrophy. *Pflügers Arch. Eur. Physiol.* 459: 631-644.

Westerblad H., Bruton J.D., Katz A. 2010. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Experimental Cell Research* 316: 3093 – 3099

Yaffe D, Saxel O. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-727.

Yellon D.M. and Downey J.M. 2003. Preconditioning the Myocardium: From Cellular Physiology to Clinical Cardiology. *Physiol Rev.* 83, 1113–1151.

Zheng J., Wang R., Zambraski E., Wu D., Jacobson K. A., and Bruce T. Liang. 2007. Protective roles of adenosine A1, A2A, and A3 receptors in skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3685-H3691.

Anexos

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology



Canadian Journal of
Physiology and Pharmacology
Revue canadienne de
physiologie et pharmacologie

Parvalbumin is overexpressed in the late phase of pharmacological preconditioning in skeletal muscle

Journal:	<i>Canadian Journal of Physiology and Pharmacology</i>
Manuscript ID:	cjpp-2013-0113.R1
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Solis, Rosario; Cinvestav, Pharmacology Carrillo, Elba; Cinvestav, Pharmacology Hernandez, Ascension; Cinvestav, Pharmacology Garcia, Maria; Cinvestav, Pharmacology Sanchez, Jorge; Cinvestav, Pharmacology
Keyword:	Pharmacological preconditioning, skeletal muscle, parvalbumin, ROS, diazoxide

SCHOLARONE™
Manuscripts

----- Forwarded Message -----

From: Jorge Sanchez <dr_jorge_sanchez@hotmail.com>

To: Maria Garcia <maria_c_garcia@yahoo.com>; Rosario Solis <solischayo@yahoo.com.mx>;

Elba Carrillo <elbad70@yahoo.com.mx>

Sent: Tuesday, July 2, 2013 7:57 AM

Subject: FW: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology - Decision on Manuscript ID cjpp-2013-0113.R1

Date: Tue, 2 Jul 2013 08:54:15 -0400

From: cjpp@nrcresearchpress.com

To: Dr_Jorge_Sanchez@hotmail.com

CC: cjpp@nrcresearchpress.com

Subject: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology - Decision on Manuscript ID cjpp-2013-0113.R1

02-Jul-2013

Dear Prof. Sanchez:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Parvalbumin is overexpressed in the late phase of pharmacological preconditioning in skeletal muscle" in its current form for publication in the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The Editorial Office will be in contact shortly regarding file requirements for publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Drs. Grant Pierce & Donald Smyth

Editors in Chief, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

General

Thank you for your responses to my comments. They have addressed my concerns.

Reviewer: 2

General

The authors have adequately addressed the concerns and comments raised with their original manuscript. There are no other concerns regarding the revised manuscript.