



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

“La participación de los Canales Cav1.2 en un modelo de Precondicionamiento Isquémico
Remoto en corazón de rata Wistar adulta.”

TESIS

Que presenta

M.V.Z. Rubén Moreno Cordero

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directora de tesis:

Dra. Ma. Del Carmen García García.

Ciudad de México

FEBRERO, 2020

AGRADECIMIENTOS.

Al CONACYT por la beca recibida durante toda mi maestría.

A la Dra. María del Carmen García García y al Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez por el apoyo y la confianza para realizar el proyecto.

La Q.F.B. Ascención Hernández Pérez por su apoyo profesional en el montaje de las técnicas realizadas en este proyecto y por su paciencia y enseñanza.

La Dra. Elba Dolores Carrillo Valero por las valiosas observaciones en este trabajo y realizar las técnicas de Western Blot

Al Dr. Raúl Sampieri Cabrera y al futuro maestro en ciencias Wilibaldo Orea López por su gran ayuda y paciencia para realizar esta investigación.

A mi familia por el apoyo incondicional en toda esta travesía.

A mis Padres

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Fisiopatología del daño al miocardio durante la isquemia y la reperfusión.....	3
2.2 Mecanismos de cardioprotección.....	4
2.2.1 Precondicionamiento isquémico (PI).....	5
2.2.2 Precondicionamiento Farmacológico (PF).....	5
2.2.3 Precondicionamiento Isquémico Remoto (PIR).....	6
2.3 2.Ventanas de cardioprotección.....	8
2.4 Mecanismos generales del precondicionamiento.....	9
2.4.1 Iniciadores del precondicionamiento.....	9
2.5 Mediadores del precondicionamiento (Vías de señalización).....	10
2.5.1 Proteínas cinasa C (PKC).....	11
2.5.2 Proteína cinasa G (PKG).....	12
2.5.3 Proteínas Tirosina cinasa (PTK).....	12
2.5.4 Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK).....	12
2.6 Mediadores del precondicionamiento tardío.....	13
2.7 Efectores finales del precondicionamiento.....	14
2.7.1 Poro transitorio de permeabilidad mitocondrial (mPTP).....	15
2.7.2 Los canales de potasio dependientes de ATP, mitocondrial (mKATP) y del sarcolema (sKATP).....	15
2.7.3 Conexina 43.....	16
2.7.4 Hipercontractura y ruptura del sarcolema.....	17

2.7.5 Estabilización del citoesqueleto.....	17
2.7.6 Apoptosis.	18
2.8 El Ca^{2+} y su participación en la isquemia/reperfusión.....	20
2.9 El canal de Ca^{2+} tipo L.....	21
2.9.1 El canal de Ca^{2+} tipo L en el acople excitación contracción.	22
2.9.2 Regulación del canal de Ca^{2+} tipo L.	23
2.9.3 Antecedentes inmediatos	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.	27
5. OBJETIVO GENERAL.	27
6. OBJETIVOS PARTICULARES.	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
7.1 Protocolo anestésico.	28
7.2 Protocolo de Precondicionamiento Isquémico Remoto (PIR).....	30
7.3 Medición del área de infarto.	31
7.4 Disociación de los cardiomiocitos	32
7.5 Medición de los transitorios de Ca^{2+}	34
7.6 Registro electrofisiológico de las corrientes de calcio.	35
7.7 Registros de la actividad mecánica.	36
7.8 Medición de la expresión de la proteína $\alpha 1c$	37
8. RESULTADOS.	38
8.1 El protocolo de PIR produjo protección frente a la isquemia-reperfusión.	38
8.2 El PIR produjo una disminución transitoria en la amplitud de las corrientes de Ca^{2+}	39
8.3 El PIR no modificó los transitorios de Ca^{2+}	40

8.4 El PIR no modifica la contractilidad de los miocitos cardiacos	42
8.5 Efectos del PIR sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1c$	43
8.6. La protección brindada por el PIR se mantiene después de 24 horas.....	44
8.7 Durante el PIR tardío no se producen cambios en las corrientes de Ca^{2+}	45
8.8 Durante el PIR tardío se modifica el curso temporal de la contracción	46
9. DISCUSIÓN.....	47
9.1 Efectos de PIR sobre la disminución del área de infarto (ventana temprana)	47
9.2 Efectos de PIR Tardío sobre la cardioprotección	48
9.3 Efectos de PIR temprano y tardío sobre las corrientes de Ca^{2+}	48
9.4 Los transitorios de Ca^{2+} en el PIR	49
9.5 El PIR y los efectos sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1c$	50
9.6 Efectos del PIR sobre la contractilidad de los cardiomiocitos en la ventana temprana de cardioprotección.....	50
9.7 Efectos de PIR tardío sobre la contractilidad de los cardiomiocitos	50
10. CONCLUSIONES.....	52
11. PERSPECTIVAS	53
11. BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

El Precondicionamiento Isquémico Remoto (PIR) es un mecanismo fisiológico que protege al corazón contra eventos isquémicos prolongados, el cual consiste en aplicar breves periodos de isquemia seguidos de reperfusión en un órgano, tejido o miembro el cual disminuye el área infartada. Existen dos ventanas de cardioprotección la llamada primera ventana, ventana temprana o ventana aguda relacionada con la activación de proteínas cinasas, y la segunda ventana llamada ventana tardía o crónica y que está relacionada con la síntesis de proteínas. El PIR tiene aplicaciones terapéuticas no invasivas y con resultados promisorios. En un trabajo previo en nuestro laboratorio se demostró el papel fundamental que juegan los canales Cav 1.2 en la cardioprotección producida mediante preconditionamiento farmacológico. Así, se encontró que la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ del canal Cav1.2 se regulaba a la baja, lo cual se tradujo en una disminución de las corrientes de calcio, así como en los transientes de calcio en cardiomiocitos tratados con diazóxido. El interés de este trabajo se centró en analizar el papel que juegan los canales Cav1.2 en la cardioprotección en un modelo de PIR. Se utilizaron corazones y miocitos cardiacos provenientes de ratas Wistar adulta tratadas y no tratadas con PIR dando 4 periodos de 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión en los miembros inferiores de una rata a la altura de la arteria femoral con ayuda de un baumanómetro de uso pediátrico, Para cuantificar el área de infarto se hicieron cortes de tejido cardiaco, en diversas condiciones experimentales, que fueron teñidos y fijados. En los cardiomiocitos aislados se midieron las corrientes a través de los canales de calcio tipo L, los transitorios de calcio y se obtuvieron extractos totales para estudios de Western blot; estas técnicas experimentales se realizaron tanto para la ventana temprana y tardía de la cardioprotección.

Los resultados obtenidos indican que el PIR confiere cardioprotección al disminuir el área de infarto en alrededor de un 52 % en la ventana temprana de cardioprotección con respecto al grupo con isquemia reperfusión (I/R). En el caso del PIR en la ventana tardía el área de infarto disminuyó un 47 % con respecto al grupo I/R. El PIR disminuyó la amplitud de las corrientes de calcio ~30 % comparado con el grupo control en la ventana temprana de cardioprotección, mas no así en la ventana tardía. La contractilidad no se vio afectada en la ventana temprana,

pero presentó cambios en la ventana tardía, el tiempo al pico de contracción fue un 33 % más breve que el grupo control, el tiempo de relajación fue en cambio 14% % más largo que el grupo control. Estudios de Western blot mostraron una regulación a la baja de la subunidad $\alpha 1c$ que es la formadora del canal.

Estos resultados pueden indicar que los canales Cav1.2 juegan un papel en la protección del miocardio en la ventana temprana del preconditionamiento remoto, probablemente no así en la ventana tardía donde parece que otros factores serían responsables de la cardioprotección.

SUMMARY

Remote Ischemic Preconditioning (PIR) is a physiological mechanism that protects the heart against prolonged ischemic insults. It is achieved by applying brief periods of ischemia followed by reperfusion in an organ, tissue or limb which decreases the infarcted area. There are two cardioprotection windows called the first window, early window or acute window related to the activation of protein kinases and the second window called late or chronic window and that is related to protein synthesis. PIR is a non-invasive technique with therapeutic applications and promising results. In a previous work from our laboratory, the fundamental role played by Cav 1.2 channels in cardioprotection produced by pharmacological preconditioning was demonstrated. Thus, it was found that the expression of the $\alpha 1c$ subunit of Cav1.2 channels was down-regulated resulting in a decrease in the amplitude of Ca^{2+} currents and Ca^{2+} transients in diazoxide-treated cardiomyocytes. The aim of this work focused on analyzing the role that Cav 1.2 channels play in cardioprotection in a PIR model.

Hearts and cardiac myocytes from adult Wistar rats were used. Control experiments were done with no pretreatment to rats and PPC treated rats involved the following protocol: Brief periods of ischemia (4) lasting 5 minutes to each were applied to a preselected limb, using a blood pressure cuff, followed by 5 minutes of reperfusion. Thereafter, hearts from control and IPC rats were subjected to prolonged ischemia to produce infarction. To quantify the infarction area, hearts were transversely cut in several slices, which were stained and fixed. Ionic currents through the L-type Ca^{2+} channels and Ca^{2+} transients were measured in isolated cardiomyocytes and total extracts were obtained for Western blot analysis studies. These experimental techniques were used to characterize both the early and late cardioprotection windows of IPC.

Results obtained indicate that RIP confers cardioprotection by decreasing the area of infarction by about 52% in the early cardioprotection window with respect to I / R group. During the late window of PIR the infarction area decreased by 46% with respect to I / R group. PIR decreased the amplitude of Ca^{2+} currents ~ 30% compared to the control group in the early cardioprotection window, but not in the late window. Contractility was not altered

in the early window, but there were changes in the late window, time to peak was 33% faster than that of the control group and relaxation time was 13% slower.. Western blot analysis showed down-regulation of the $\alpha 1c$ subunit, the main subunit of the Cav1.2 channel.

These results demonstrate that Cav1.2 channels are down-regulated by IPC in the early window of remote preconditioning, probably not in the late window where other factors would be responsible for cardioprotection.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de desórdenes del corazón y los vasos sanguíneos. Representan la primera causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2018. (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>)). En México la cardiomiopatía isquémica y el infarto al miocardio ocupan los primeros sitios como causa de muerte (INEGI, 2017). La isquemia es la disminución parcial o total de flujo sanguíneo a un tejido con la consecuente disminución del aporte de oxígeno, nutrientes y remoción de metabolitos. Con respecto al corazón, el flujo sanguíneo puede ser afectado de manera aguda o crónica (Moreu-Burgos & Macaya-Miguel, 2007), actualmente existen tratamientos farmacológicos y quirúrgicos para enfermedades coronarias como terapias para el restablecimiento del flujo sanguíneo, el éxito depende del tiempo en que se realice, por lo que es necesario implementar terapias que nos ayuden a proteger al corazón de eventos isquémicos prolongados.

El corazón tiene mecanismos endógenos que lo protegen contra la isquemia, como lo demostró Murry *et al.*, en 1986. Aplicando breves periodos de I/R en la arteria coronaria del corazón de un perro demostraron que había una clara disminución en las áreas de infarto confiriéndole protección cardiaca, a esto se le conoce como Precondicionamiento Isquémico (PI). El Precondicionamiento Farmacológico (PF) consiste en la administración de agentes farmacológicos que imitan al PI. Existe un tercer tipo de preconditionamiento el llamado Precondicionamiento Isquémico Remoto (PIR), éste consiste en dar breves periodos de isquemia reperusión en un órgano, tejido o miembro diferente al que se pretende proteger, y ha demostrado ser de fácil aplicación, repetible e imita al PI. Algunos modelos de PIR, al ser no invasivos, se han probado en la clínica humana obteniéndose resultados controversiales (Le Page & Prunier, 2015).

En células excitables, como son los cardiomiocitos, el Ca^{2+} cumple varias funciones celulares, una de ellas es en el acople excitación contracción. Ante una despolarización se abren los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje lo que permite la entrada de Ca^{2+}

que libera más Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS). Como resultado de la entrada y liberación del ión aumentan las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, el cual es utilizado por los miofilamentos sensibles a Ca^{2+} para la la contracción. La amplitud y duración de los transitorios afectan la fuerza de contracción (Bers, 2013). Una vez terminada la sístole comienza la relajación del músculo cardiaco llamada diástole, durante la cual los cardiomiocitos deben disminuir la concentración de Ca^{2+} , ya sea sacándolo de la célula a través de intercambiadores y bombas, o recapturándolo en sitios de almacenamiento como son el RS y la mitocondria. Ante un evento isquémico los mecanismos de regulación para este ion se ven alterados provocando una sobrecarga de Ca^{2+} . Se sabe que agentes farmacológicos como el diltiazem, el verapamilo y las dihidropiridinas, que son bloqueadores de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, confieren cardioprotección, incluso a dosis bajas han demostrado protección durante la isquemia y la reperfusión (Becker. & Mobert., 1999), por lo que los canales de Ca^{2+} tienen una participación fundamental en la cardioproteccion.

Aunque en nuestro laboratorio se ha analizado el papel que juegan los canales de Ca^{2+} Cav 1.2 en la cardioproteccion en un modelo de PF (González *et al.*, 2010) aún no se sabe nada sobre el papel de los canales de calcio tipo L en un modelo de PIR, por lo que este trabajo tiene como objetivo analizar la participación de los canales Cav1.2 en la cardioprotección.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Fisiopatología del daño al miocardio durante la isquemia y la reperfusión.

La isquemia es la disminución parcial o total de sangre a un tejido y es por ello que la llegada de oxígeno, de nutrientes, así como la remoción de metabolitos no se dan de una manera adecuada. El daño al miocardio depende del tiempo que dure la isquemia, entre mayor tiempo de isquemia, mayor depleción energética, por lo que la célula cambia su metabolismo aeróbico por un metabolismo anaeróbico, se acumula ácido láctico, el aporte de ácido pirúvico al ciclo de Krebs y la producción de ATP se disminuyen además de bajar el pH celular (García-Dorado, & Ruiz-Meana, 2009). La fosfocreatina que es la mayor reserva de energía también disminuye. El miocardio trata de generar energía a través de la utilización monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) que es degradado a adenosina más fósforo inorgánico (Pi) (Moreu-Burgos & Macaya-Miguel, 2007). Las bombas como la Na^+/K^+ ATPasa, Ca^{2+} -ATPasa, que es la bomba de calcio de la membrana plasmática, y la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) no funcionan adecuadamente por falta de ATP. El pH ácido activa al intercambiador Na^+/H^+ sacando protones y metiendo sodio el cual junto con el ácido láctico arrastran agua al interior de la célula provocando edema (Wu *et al.*, 2018). La célula trata de mantener las concentraciones adecuadas de sodio por lo que activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su forma inversa sacando sodio al medio extracelular y metiendo calcio aumentado así las concentraciones de calcio citoplasmáticas.(Férez *et al.*, 2004). El fosforo inorgánico más el pH intracelular bajo disminuyen la sensibilidad de los miofilamentos al calcio provocando cambios en el en la contractilidad (Bers, 2013).

Cuando se restablece el flujo sanguíneo a la zona isquémica, el hecho de que se recupere el equilibrio iónico y metabólico en la célula, depende en gran medida del tiempo en que se lleve a cabo. Una reperfusión tardía causa efectos deletéreos en el miocardio. La hipercontractilidad y destrucción de la membrana plasmática son consecuencias del daño por reperfusión (Garcia-Dorado *et al.*, 1992), la

hipercontractilidad se debe a un restablecimiento energético que promueve la producción de ATP y a un aumento en las concentraciones de calcio en la célula (García-Dorado & Ruiz-Meana, 2009), la destrucción de la membrana plasmática se debe a su vez a la fragilidad celular como consecuencia de la activación de proteasas dependientes del Ca^{2+} , como las calpaínas que se encuentran inhibidas por la acidosis y se activan al restablecerse el pH celular inmediatamente después de la reperfusión (Heusch & Gersh, 2017), desempeñando un papel crítico en la muerte de las células cardiacas y a la activación de lipasas dependientes del Ca^{2+} como la fosfolipasa A2 (PLA2) que tienen como sustratos los fosfolípidos de la membrana. (Agudelo & López, 2010). Al restablecerse el flujo sanguíneo, el aporte de oxígeno aumenta (Moreno & del Portillo, 2017), las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen a nivel mitocondrial, el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y los radicales oxidrilo (OH^\cdot) producen daño en la célula por peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y rotura del ADN. Los radicales libres son los causantes de la fragilidad celular (Férez *et al.*, 2004). Las ROS oxidan los receptores de rianodina tipo 2 (RYR2), los receptores de inositol trifosfato (IP3), y los canales de calcio lo que produce un incremento en las concentraciones de calcio citoplasmáticas (Görlach, *et al.*, 2015), así como oscilaciones de calcio en la célula llevando a cambios en su potencial de membrana que se traducen en despolarizaciones precoces lo que lleva a las arritmias cardiacas por reperfusión (Ruiz-Meana *et al.*, 2014)

2.2 Mecanismos de cardioprotección

Se sabe que el corazón tiene mecanismos endógenos que lo protegen de eventos isquémicos prolongados. Dando breves periodos subletales de isquemia seguidos de reperfusión se disminuye el área infartada del miocardio, lo que ha despertado el interés de muchos científicos en explicar cómo se establecen estos mecanismos de cardioprotección.

2.2.1 Precondicionamiento isquémico (PI)

Murry *et al* (1986) describieron por primera vez lo que hoy conocemos como el PI o precondicionamiento clásico. En un modelo de corazón canino aplicaron breves periodos de isquemia seguidos de breves periodos de reperfusión en la arteria coronaria de un perro para luego dar una isquemia sostenida de 40 minutos. Hicieron cortes histológicos y mediciones del área de infarto y lo compararon con corazones de perros que no habían sido sometidos a este protocolo de isquemia-reperfusión (grupo testigo). Los resultados del grupo de investigación mostraron una clara disminución del área de infarto, el grupo sometido a PI tuvo sólo un 7 % de área de infarto comparada con el 30% del grupo testigo (Murry *et al.*, 1986).

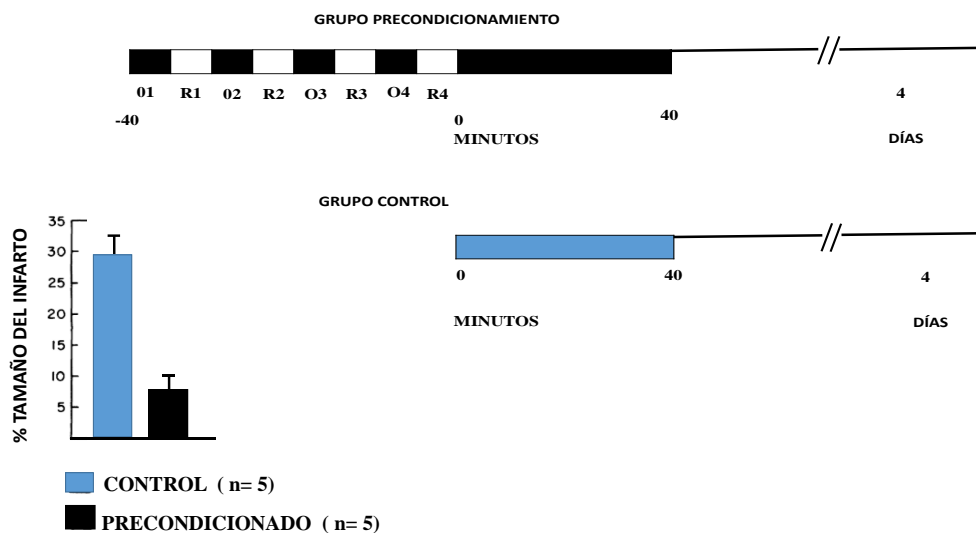


Fig.1 Protocolo experimental y medición del área de infarto. (tomado de Murry *et al* 1986).

2.2.2 Precondicionamiento Farmacológico (PF)

A partir de los resultados de Murry y colaboradores se desarrollaron y probaron fármacos que pudieran imitar al PI. Estos fármacos actúan como ligandos en receptores

de membrana que activan vías de señalización río abajo, como son los agonistas de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (bradicinina, opioides, catecolaminas, adenosinas); agonistas del canal mitocondrial de K^+ dependiente de ATP (mK_{ATP}) como son el diazóxido, el pinacidil (García-Rivas, 2006) y el nicoradil (Simonovic *et al.*, 2019); antagonistas del intercambiador Na^+/H^+ como son la amilorida (Kaur *et al.*, 1997) y el cariporide (Besse *et al.*, 2004), o los que actúan sobre la bomba Na^+/K^+ ATPasa como es la digoxina (Lanna & Pelluci 2010) y que se ha visto que producen cardioprotección. La ciclosporina, un fármaco ampliamente utilizado como inmunosupresor, actúa a través de la ciclofilina D inhibiendo el poro transitorio de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y el cual ha demostrado tener efectos cardioprotectores (Rosenberg *et al.*, 2018) Se están realizando estudios preclínicos sobre otras dianas, entre las que destacan las relacionadas con la vía de señalización de la insulina y el metabolismo energético. Entre las primeras, la aplicación precoz de soluciones con glucosa, insulina y potasio (soluciones GIK) que han mostrado cardioprotección en corazones caninos (Sodi-Pallares *et al.*, 1963; De Micheli, 2000). La trimetazidina ha mostrado ser un inhibidor parcial de la oxidación de los ácidos grasos por lo que aumenta la oxidación de la glucosa en el miocardio mostrando tener efectos cardioprotectores (Ruiz-Meana *et al.*, 2014).

2.2.3 Precondicionamiento Isquémico Remoto (PIR)

Actualmente se sabe que dando breves periodos de isquemia reperusión en algún órgano, tejido o miembro diferente al que se pretende proteger se puede conferir cardioprotección a distancia; fue Przyklenk *et al.*, 1993), quien por primera vez describió la cardioprotección remota, haciendo breves periodos de isquemia reperusión en la arteria circunfleja y posteriormente hacer una isquemia sostenida en la arteria anterior descendente mostraron cardioprotección en otra área no preconditionada. El estímulo preconditionante como es el PIR libera sustancias químicas que son ligandos y se unen de manera directa a receptores de membrana cardiacos; viajan por vía humoral o por vía neurogénica (vías neurohumorales) dando

cardioprotección a distancia (Donato *et al.*, 2016). Oxman *et al.*, (1997) haciendo breves periodos de I/R en los miembros inferiores de una rata mostraron una reducción de la incidencia de taquiarritmias en la cual estaba implicada la norepinefrina, una catecolamina involucrada en el mecanismo humoral de la cardioprotección. Posteriormente, Dickson *et al.*, (1999) encontraron una reducción del área de infarto posterior a una transfusión de sangre completa de un conejo sometido a PI a otro sin este preconditionamiento, lo que comprobó que la cardioprotección se puede transferir por medio de un componente humoral, comprobaron también que los dializados de sangre provenientes de conejos con PI y transfundidos a conejos sin PI mejoraban significativamente la función mecánica (Dickson *et al.*, 2000). En este fenómeno se encontró que estaban implicados la adenosina y los opioides (Tsibulnikov *et al.*, 2019). En un estudio más reciente por Grau *et al.*, (2016), produciendo 4 ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión en el brazo derecho de personas comprobaron un aumento de síntesis de óxido nítrico (NOS), la cual permite que el eritrocito tenga esa capacidad de deformarse a su paso por los vasos sanguíneos y hacer el intercambio gaseoso, lo cual se relacionó con un efecto cardioprotector (Grau *et al.*, 2016). En otro estudio (Arroyo-Martínez *et al.*, 2016) al producir tres ciclos de breves periodos de oclusión y de reperfusión de la arteria braquial se comprobó un aumento de NO en las arterias coronarias lo cual se relacionó con la disminución de la troponina-1 (cTn₁) una proteína de daño cardíaco. Otros estudios del preconditionamiento remoto ocluyendo la arteria mesentérica y la rena, en ratas, comprobaron también la participación de los mecanismos humorales (Kanoria *et al.* 2007).

Existen estudios que muestra que la cardioprotección tiene un componente neuronal. La vía neurogénica permite la liberación de moléculas que activan los nervios aferentes y permiten liberar señales de los nervios eferentes que promueven la cardioprotección. Donato *et al.*, (2016) mostraron que al dar 3 ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión en la arteria femoral de una rata Wistar adulta se disminuía el área de infarto, pero este efecto se veía revertido si seccionaban el nervio vago diafragmático, también Donato *et al.* (2017) mostraron que la resección del nervio vago derecho del corazón abolía la cardioprotección conferida por el preconditionamiento

remoto, cabe señalar que la molécula liberada es la acetil colina (ACh) la cual activa la vía de señalización PI3K- Akt, cGMP/PKG, y como efector final se encontró al mKATP (Donato *et al.*, 2017). Por otro parte, Ren *et al.*, (2018) encontraron que produciendo electro estimulación en la región umbilical de una rata disminuía el tamaño del área infartada a través de la activación de la fibra nerviosa tipo C de la piel. El mecanismo involucrado incluye los receptores de bradicinina, PKC α . La denervación renal disminuyó la cardioprotección conferida por el preconditionamiento remoto disminuyendo la eritropoyetina (EPO), y el factor inducible de hipoxia (HIF1 α) por la vía de JAK STAT (Oba *et al.*, 2015).

2.3 2.Ventanas de cardioprotección

Actualmente se sabe que el PI, el PF y el PIR tienen dos ventanas de cardioprotección (Yellon & Downey, 2003), la primera ventana, fase aguda o clásica se evoca en minutos y dura hasta dos o tres horas de terminado el estímulo preconditionante. La primera fase está relacionada con la activación de proteínas cinasas y vías de señalización río abajo, las cuales activan los mecanismos que protegen al corazón. Pasado este tiempo desaparece la cardioprotección durante un período de horas y reaparece de manera significativa a las 12 horas y puede durar de dos a tres días; esta reaparición de la cardioprotección se le caracteriza por una menor reducción del tamaño del infarto comparada con la ventana temprana, se le conoce también como segunda ventana de cardioprotección, fase tardía, ventana tardía o cardioprotección tardía, aunque protege contra el infarto también puede tener efectos benéficos sobre la contractilidad del miocardio, la disfunción endotelial o las arritmias (Bolli, 2000). Otra característica de la segunda ventana de cardioprotección es la síntesis de proteínas como la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), la aldosa reductasa (AldRed), la superóxido dismutasa (SOD), la cicloxigenasa 2 (COX-2), las proteínas de shock térmico (HSP27/170) (Yellon & Downey, 2003), y la Heme oxigenasa 1(HO-1) (Yu *et al* 2017).

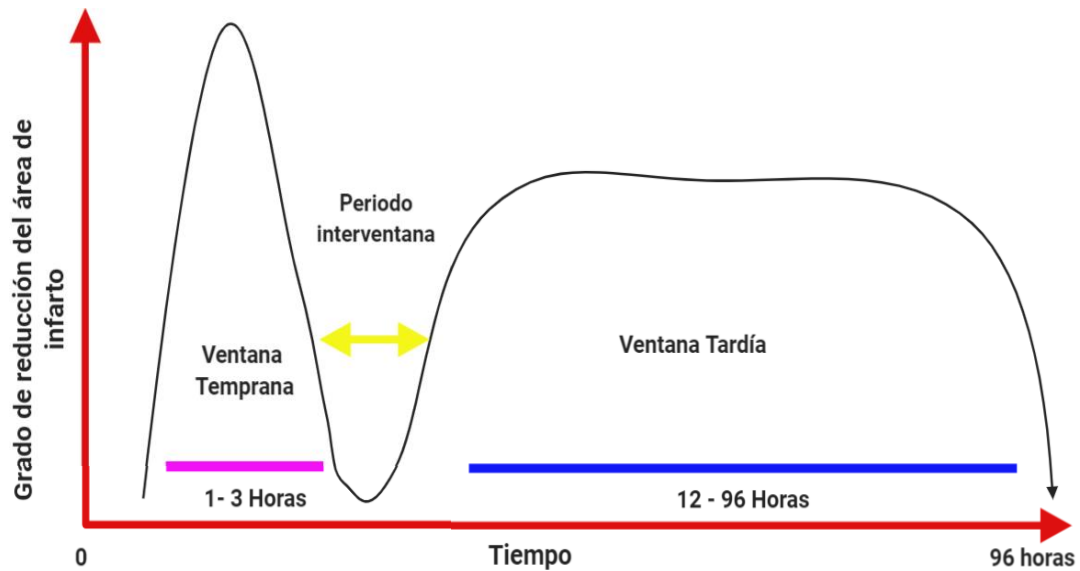


Fig.2 Diagrama representativo del curso temporal de la cardioprotección temprana y la tardía posteriores al estímulo preconditionante (basada y modificada de Yellon y Downey, 2003)

2.4 Mecanismos generales del preconditionamiento

Los estímulos preconditionantes tales como la hipoxia, la isquemia-reperfusión y otros (Heusch, 2015) liberan una serie de sustancias llamadas **iniciadoras** que transfieren la información a distancia por vía humoral o a través de la vía neurogénica, llegando a diferentes órganos, estas sustancias pueden actuar directamente o a través de receptores de membrana desencadenando procesos **mediadores** (vías de señalización) que son amplificados y llegan a los sitios efectores de la célula que son los responsables de la acción protectora llamados **efectores finales** de la cardioprotección (Parra, 2016).

2.4.1 Iniciadores del preconditionamiento

Breves periodos de isquemias subletales seguidos de perfusión directamente en el corazón, órgano, tejido o miembro liberan sustancias que viajan a través de la sangre y

son ligandos para receptores de membrana acoplados a proteínas G como son la adenosina (A_1 , A_3), agonistas alfa adrenérgicos (Oxman *et al.*, 1997), bradicinina (Schoemaker & van Heijningen, 2017), endotelinas (ET1) (Houde *et al.*, 2016), angiotensinas, opioides, (Randhawa & Jaggi, 2017) y la acetilcolina (M2) (Donato *et al.*, 2017).

El preconditionamiento también se puede iniciar sin tener que estar acoplado al receptor; estas sustancias pueden atravesar la membrana plasmática cuando provienen de otros sitios o producirse en la misma célula y tener efectos directos sobre la proteína cinasa C (PKC) (Yellon & Downey, 2003). Metabolitos como el óxido nítrico (NO) mostraron tener efectos benéficos sobre el miocardio, (Arroyo-Martínez *et al.*, 2016; Kiss *et al.*, 2014); las ROS también mostraron tener relación con la disminución del daño al miocardio al activar a PKC, sin embargo una concentración alta provoca efectos deletéreos a la célula cardíaca (Heusch, 2015).

Otro mecanismo de cardioprotección no acoplado a receptor fue el que demostraron Miyawaki & Ashraf, (1997) en un modelo aislado de corazón, al perfundir una solución sin calcio para luego perfundirla con una solución rica en calcio durante 5 minutos activando la PKC. También el ejercicio ha mostrado tener efectos en el preconditionamiento miocárdico iniciado por la entrada de Ca^{2+} a la célula, y su acción sobre NADPH oxidasa y sus efectos sobre el canal de mKATP (Parra, 2016).

2.5 Mediadores del preconditionamiento (Vías de señalización)

Los receptores unidos a su ligando activan proteínas cinasas que promueven vías de señalización río abajo, estas cinasas incluyen proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa G (PKG), proteínas de tirosina cinasa (PTK), las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), fosfoinositol 3 cinasa (PI3K)-Akt, y la vía de la JAK-STAT. Estas proteínas también son llamadas proteínas cinasas de supervivencia las cuales promueven cardioprotección cuando son activadas por breves periodos de isquemia

reperfusión o inmediatamente después del daño por reperfusión (Rossello & Yellon, 2018; Bell *et al.*, 2016).

2.5.1 Proteínas cinasa C (PKC)

Fue el primer mediador citosólico identificado en el preconditionamiento, y muchos iniciadores del mismo convergen en la activación de PKC, así mismo, los receptores acoplados a proteínas Gi (GPCRi) y también Gq/11, estos últimos pueden activar fosfolipasa C y D la cual lleva a la hidrólisis de fosfoinositol 4, 5-bifosfato (PIP₂), para generar 1, 3 y 4- trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Yellon & Downey, 2003). El IP₃ activa los receptores IP₃ del retículo sarcoplásmico liberando más calcio y junto con el DAG activan a la PKC. Se ha comprobado que PKC ϵ se transloca a la mitocondria (Heinen *et al.*, 2011) activando el canal mKATP y promoviendo la producción de ROS las cuales pueden a su vez activar a la PKC, también se sabe que la PKC actúa sobre el poro transitorio de permeabilidad mitocondrial (mPTP) para impedir la liberación de citocromo c que activa a las caspasas (Rossello & Yellon, 2018). PKC α es la isoforma más importante en mamíferos superiores y se encuentra interactuando con conexina 43 (Cx 43) (Heusch, 2015). En un estudio publicado por Wang *et al.*, (2002) produciendo periodos de 25 minutos de isquemia en la arteria mesentérica seguidos de 15 de reperfusión, mostraron que la cardioprotección se abolía cuando se le aplicaba queleritrina que es un inhibidor de la PKC. Sin embargo, Heinen *et al.*, (2011) en un modelo de PIR en ratas anestesiadas con pentobarbital sódico mostro que PKC ϵ no mostraba cambios significativos comparados con el control por lo que concluyeron que el PIR muestra patrones diferentes de señalización al PI.

Las ROS, producidas en su mayoría durante la reperfusión, promueven la activación de la PKC en la fase temprana de la cardioproteccion como lo sugieren Donato *et al.*, (2016) quienes comprobaron un incremento de peróxido de hidrogeno, efecto que fue inhibido por 5 hidroxidecanoato (5 HD) un bloqueador del mKATP, esto en un modelo de PIR.

2.5.2 Proteína cinasa G (PKG)

Es una proteína cinasa que depende de las concentraciones de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). La PKG está involucrada en la vía de cardioprotección neurogénica, al activar a PI3K, NOS y PKG que actúa a nivel del mPTP y del canal mK_{ATP} (Donato *et al.*, 2017; Mastitskaya *et al.*, 2016). También se ha comprobado su participación a nivel endotelial provocando vasodilatación y cardioprotección (Heusch, 2015). La vía de la PKG está involucrada en la reducción de las corrientes de calcio a través de la fosforilación de la serina 533 del canal de Ca^{2+} tipo L (Ziolo *et al.*, 2008) sin embargo, también se ha comprobado que hay un aumento de las corrientes de calcio en células atriales de conejo con un aumento de la PKG (Wang *et al.*, 2000; Bae *et al.*, 2019).

2.5.3 Proteínas Tirosina cinasa (PTK)

Hay dos grupos principales de proteínas tirosinas cinasas, las unidas a receptores de membrana y las tirosinas cinasas citosólicas. La activación de las PTK está relacionada con la vía de PI3K y MAPK pudiendo estar corriente arriba o corriente debajo de PKC (Cohen & Downey 2000). Las MEK son tirosinas cinasas que dependen de PKC y activan las MAPK promoviendo la formación de factores de transcripción para la formación de síntesis de proteínas en la cardioprotección tardía. (Cohen & Downey 2000).

2.5.4 Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK)

Estas proteínas pueden ser activadas por la PKC y por tirosina cinasas acopladas a receptores, dentro del grupo están las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), la proteína cinasa activada por estrés (JNK), la proteína cinasa activada por

mitógeno (MAPK) p38. Se ha encontrado que la MAPK p38 interviene en la protección al miocardio (Cohen & Downey 2000). La isoforma p38 α se activa posteriormente a la producción de ciclos de preconditionamiento (Sicard *et al.*, 2010), mientras que la isoforma p38 β lo hace durante la isquemia sostenida (Schulz *et al.*, 2003), las dos tienen efectos en la cardioprotección y en el PIR la actividad de p38 no muestra cambios, sin embargo, su inhibición abroga la cardioprotección (Heusch, 2015). ERK 1/2 parece participar en la cardioprotección en ratas con PI, sin embargo, no parece actuar de la misma manera en el PIR (Heinen *et al.*, 2011). En un trabajo publicado por Vicencio *et al.*, (2015) demuestran que ERK es una vía de señalización importante en la cardioprotección a distancia por exosomas que se acoplan a receptores tipo Toll (TLR4) activando HSP27. También ERK 1/2 activa factores de transcripción como el factor inducido por hipoxia 1 α (HIF 1 α), en este sentido Oba *et al.*, (2015), en un modelo de PIR en la arteria renal, mostraron que la activación de HIF-1 α y la expresión de eritropoyetina disminuían las áreas de infarto. ERK1/2 activa a la proteína activada 1 (AP-1), también el factor NF- κ B, el cual está implicado en la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio vascular (Yang *et al.*, 2016) provocando disfunción. Manchurov *et al.*, (2014) encontraron que el PIR mejoraba la función endotelial al medir la dilatación del flujo arterial y este mecanismo se producía al activar al factor de transcripción Nrf2. Yellon & Downey (2003) mencionan que JNK es activada después de la isquemia y esta activación se ha relacionado con la PKC, otros estudios en cambio muestran una disminución en la fosforilación de PKC (Yellon & Downey, 2003), en el PIR en cambio no muestran diferencias significativas (Heinen *et al.*, 2011).

2.6 Mediadores del preconditionamiento tardío

Hay un incremento en la síntesis de proteínas como resultado de la activación de las cinasas sobre factores de transcripción 24 horas después del estímulo preconditionante, estas proteínas tienen efectos sobre la protección cardiaca tardía, entre ellas están: iNOS, COX-2, AldRed y la HO-1 (Zhou *et al.*, 2014).

Uno de los factores de transcripción más estudiados es el NF- κ B al cual se le relaciona con la modulación de genes como los de la iNOS, la AldRed, la COX-2 que se encuentran aumentados en el PIR tardío (Stein *et al.*, 2004). Recientemente se ha encontrado la participación del factor nuclear eritroide 2- relacionado con el factor 2 (Nrf2), el cual modula la expresión de la HO-1 y se le relaciona con la protección tardía del corazón (Zhou *et al.*, 2014).

Un aumento en la iNOS en el preconditionamiento isquémico tardío promueve la síntesis del óxido nítrico que puede actuar sobre la PKC, o directamente sobre el mKATP (Cohen *et al.*, 2000). Por otro lado, Gres *et al.*, (2002) encontraron que una inhibición de la COX-2 aumenta el tamaño del infarto, lo que implica que un fuerte estímulo preconditionante aumenta la síntesis de esta enzima que está relacionada con la cardioprotección. Otras enzimas involucradas en la cardioprotección tardía son la SOD, la superóxido dismutasa Mn (Mn SOD), la NADPH oxidasa, la proteína de shock térmico (HSP 70) (Vicencio *et al.*, 2015), HIF-1 α y EPO (Oba *et al.*, 2015).

2.7 Efectores finales del preconditionamiento

La mitocondria es con mucho el organelo donde convergen la gran mayoría de las vías de señalización que detonan los tres tipos de preconditionamiento, PI, PF, PIR, a través de la activación de las cinasas que actúan sobre el mPTP o sobre el canal mKATP los cuales son considerados los efectores finales de la cardioprotección (Rosenberg *et al.*, 2018), no por esto se debe restar importancia a las proteínas que conforman los canales, receptores, intercambiadores, cinasas y factores de transcripción que se ha comprobado participan en la cardioprotección.

2.7.1 Poro transitorio de permeabilidad mitocondrial (mPTP).

Está conformado por complejos proteicos mitocondriales que interaccionan para formar el poro. En la membrana interna se encuentra la adenina nucleótido translocasa (ANT) y en la externa la proteína del canal aniónico dependiente de voltaje de (VDAC), esta interacción de proteínas permite el paso de solutos desde la matriz mitocondrial como son el calcio, el citocromo c, ADP/ATP, los nucleótidos de piridina, el glutatión reducido (GSH), alterando el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Feissner *et al.*, 2009). El poro transitorio mitocondrial se abre cuando hay una disminución de estos solutos o cuando hay una sobrecarga de calcio y alta producción de ROS lo que libera el citocromo c que se une a las caspasas y lleva a la muerte celular (Costa & Garlid, 2008).

2.7.2 Los canales de potasio dependientes de ATP, mitocondrial (mKATP) y del sarcolema (sKATP)

Los canales de potasio dependientes de ATP se denominan así porque son sensibles a las concentraciones de ATP, siendo inhibidos por este nucleótido. Se les relaciona con la cardioprotección en la fase temprana y tardía y son canales rectificadores Kir, que al abrirse permiten la entrada de potasio para hacer más hiperpolarizada a la membrana plasmática, y en el caso de la mitocondria su apertura produce una despolarización del potencial mitocondrial. Están asociados con receptores a las sulfonilureas (Yellon & Downey, 2003) por lo que medicamentos como la glibenclamida y antibióticos como las sulfas pueden afectar su función (Kanoria *et al.*, 2007).

El canal sKATP está relacionado con el acortamiento del potencial de acción disminuyendo la fase dos del potencial evitando la sobrecarga de calcio al cardiomiocito, los primeros estudios de patch clamp en células cardiacas estuvieron relacionados con el canal sKATP (Heusch, 2015). La caracterización molecular del mKATP no está clara aún, pero parece que constan de un receptor a sulfonilurea y un

canal unitario de potasio, difiere del canal sKATP por sus características farmacológicas, así el mKATP es 1000 veces más sensible al diazóido y también más sensible al 5 hidroxidecanoato (5 HD) que lo inhibe en concentraciones nanomolares (Yellon & Downey, 2003).

Se sabe que ante un evento isquémico hay una disminución de ATP lo que provoca la apertura del canal mKATP permitiendo la entrada de iones de K^+ , lo cual activa al intercambiador K^+/H^+ disminuyendo el $\Delta\psi_m$ en cerca de 10 mV lo que provoca un desacople en el complejo respiratorio V afectando la función de F1-F0 ATPasa y aumenta la producción de ROS disminuyendo la entrada de calcio a la mitocondria (Holmuhamedov *et al.*, 1999). En condiciones normales el gradiente electroquímico en el complejo V sirve para fosforilar ADP a ATP y mantener el potencial de membrana mitocondrial (Li *et al.*, 2013) La apertura del canal mKATP disminuye el área de infarto en la ventana temprana y tardía de la cardioprotección (Kanoria *et al.*, 2007). El canal mKATP puede ser activado por el NO (Sasaki *et al.*, 2000), la PKC, la PKG (Donato *et al.*, 2016) y las ROS, que a su vez activan a la PKC, produciendo un ciclo de retroalimentación.(Costa & Garlid, 2008).

2.7.3 Conexina 43.

Es una proteína transmembrana que se localiza en el sarcoplasma y en la membrana mitocondrial, está muy relacionada con el canal mKATP. Su activación promueve la entrada del ion K^+ a la matriz mitocondrial aumentando el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP (Heusch, 2015). En el PI su fosforilación promueve la protección cardiaca a través de STAT3 (Bell *et al.*, 2016). El daño por reperfusión y la consecuente hipercontractura se transmite de célula a célula por las uniones estrechas, el mecanismo por el cual se da la extensión del daño se basa en el paso de sodio a través de las uniones estrechas del miocito hipercontraído a miocitos adyacentes y esta sobrecarga de Na^+ promueve la activación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} aumentando la sobrecarga de calcio y daño, de esta forma se determina la extensión del infarto (Garcia-Dorado *et al.*, 1997).

2.7.4 Hipercontractura y ruptura del sarcolema.

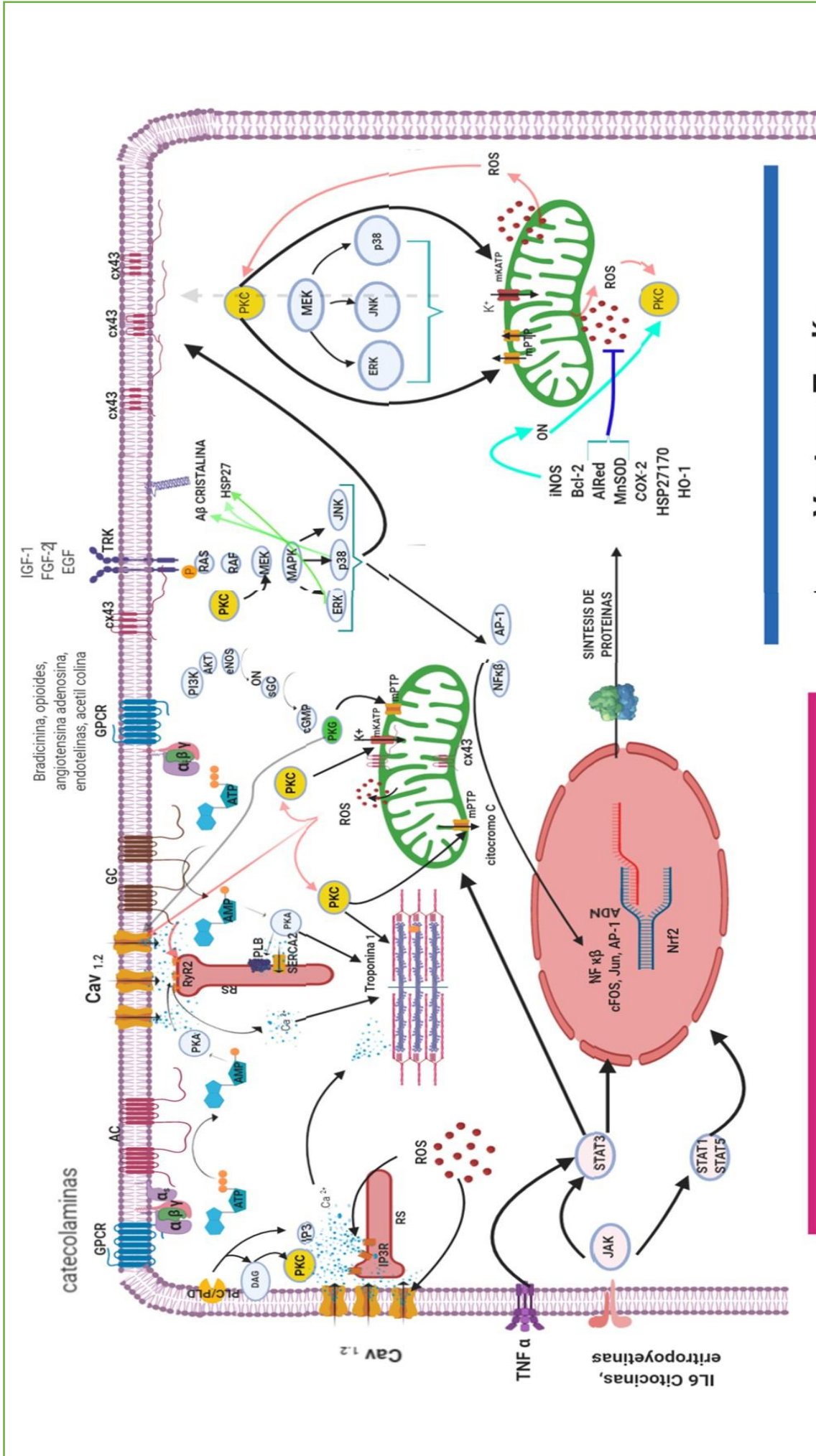
Minutos después de la reperfusión se restaura la cadena respiratoria, aumenta la producción de ATP lo que disminuye el fósforo inorgánico y por ende aumenta la sensibilidad de las miofibrillas al ion Ca^{2+} que se encuentra en concentraciones altas lo que promueve una hipercontractura que daña el sarcoplasma, este fenómeno es conocido como daño por reperfusión (García-dorado & Ruiz-meana, 2009). En corazones sometidos a PI o a PIR existe una disminución de esta hipercontractura dada por la acción que ejercen las proteínas cinasas en diferentes blancos lo que ayuda a estabilizar el citoesqueleto o a tener un mejor manejo del calcio (Moreno & Portillo, 2016).

2.7.5 Estabilización del citoesqueleto.

Una disminución de la estabilidad del citoesqueleto y un aumento en el volumen celular por edema contribuyen a la fragilidad y ruptura del sarcoplasma. En la red de microtúbulos está involucrada la vía de activación y translocación de PKC ϵ y p38 lo que promueve una mejor resistencia al daño (Nakamura *et al.*, 2004). En el PI la activación de la proteína p38 y de su isoforma $\alpha\beta$ cristalina así como de HSP 27 está relacionada con el ensamble de miofilamentos de actina. (Heusch, 2015). Tanto en el PI como en PIR la conexina 43 es fosforilada evitando así la entrada de iones Na^+ de células vecinas y por ende el edema celular (Wang *et al.*, 2013).

2.7.6 Apoptosis.

La muerte celular programada es activada por el daño provocado durante la isquemia/reperfusión al abrirse el mPTP y liberar citocromo c que a su vez activa las caspasas llevando a la apoptosis. El PI y el PIR reducen la proteína proapoptótica BAX (Yellon & Downey, 2003), también disminuyen la apoptosis en el tejido auricular (Hu *et al.*, 2016). Se ha relacionado la activación de las MAPKs con la disminución de la apoptosis (Chen *et al.*, 2017). También la inactivación p38 reduce la apoptosis inhibiendo la activación de la caspasa 3 (Zuo *et al.*, 2019). La activación del NO y de las ROS activa a la PKC que finalmente actúa sobre el mPTP disminuyendo la liberación de citocromo c produciendo cardioprotección (Cohen & Downey 2000).



Ventana Tardía
12 - 96 horas

Ventana Temprana
1-3 horas

Fig.3 Esquema representativo de las vías de señalización involucradas en la cardioprotección temprana y tardía donde el calcio juega un papel fundamental en ambas fases.

2.8 El Ca^{2+} y su participación en la isquemia/reperfusión.

Zimmerman & Htillsmaun (1966) probaron que en corazones aislados perfundidos con soluciones sin calcio no presentaban enzimas de daño pero si estos corazones eran vueltos a perfundir con soluciones ricas en calcio la permeabilidad de la membrana se veía afectada presentando enzimas de daño celular, el hecho de que el Ca^{2+} , un ion indispensable para el funcionamiento cardiaco, pueda producir daño lo llamaron paradoja del calcio, posteriormente se supo que esta alteración en la permeabilidad de la membrana es a causa de una hipercontractura y destrucción del sarcoplasma (Isenberg & Klockner, 1982).

El calcio tiene un papel importante en el preconditionamiento como lo demostraron (Miyawaki & Ashraf, 1997) al perfundir corazones aislados con una solución con alta concentración de calcio seguido de una perfusión con baja concentración de calcio en un sistema de Langendorff. Esto disminuyó el daño miocárdico comparado con el grupo control, también encontraron que se produce activación y translocación de la PKC a la membrana del cardiomiocito. (Miyawaki & Ashraf, 1997). En corazones de perro se ha encontrado algo similar con este procedimiento, así como utilizando un agonista α adrenérgico, la metoxamina (Node *et al.*, 1997). En este sentido los agonistas α -adrenérgicos promueven la formación de cAMP que fosforila a la PKA. La PKA actúa en sitios de interacción con el canal de calcio tipo L y con el RyR2 lo que promueve que entre más calcio a través de los canales y se libere más calcio del RS (Bers, 2013). El incremento de calcio intracelular puede activar a la PKC y ésta a su vez al canal mKATP produciendo cardioprotección, o activando a las ROS y la síntesis de adenina que activan también a la PKC. Al ser activada la PKC puede a su vez activar a PI3K-AKT y su vez fosforilar a ERK1/2 (Salie *et al.*, 2012) del grupo de las MAPKs promoviendo factores de transcripción río abajo o activando proteínas como $\alpha\beta$ -cristalina o p38 para estabilizar el citoesqueleto.

2.9 El canal de Ca²⁺ tipo L.

El calcio es fundamental para varios procesos fisiológicos y existen muy pocos trabajos sobre el papel que juegan los canales de Cav 1.2 en la cardioprotección. El canal de Ca²⁺ tipo L es un canal que depende del voltaje y es activado ante una despolarización de membrana. Está compuesto de varias subunidades: $\alpha 1c$, $\alpha 2$, β , y δ (Bodi *et al.*, 2005). La subunidad $\alpha 1c$ es la que forma el poro y contiene al sensor de voltaje, la selectividad al ion Ca²⁺ y la gran mayoría de sitios de interacción con segundos mensajeros y fármacos (Hool & Corry, 2007) La subunidad β se encuentra en la cara citoplasmática del cardiomiocito, se le considera una unidad auxiliar. Las subunidades $\alpha 2$ - δ interactúan y se les relaciona con la expresión del canal en la membrana así como con su activación (Spedding & Paoletti, 1994).

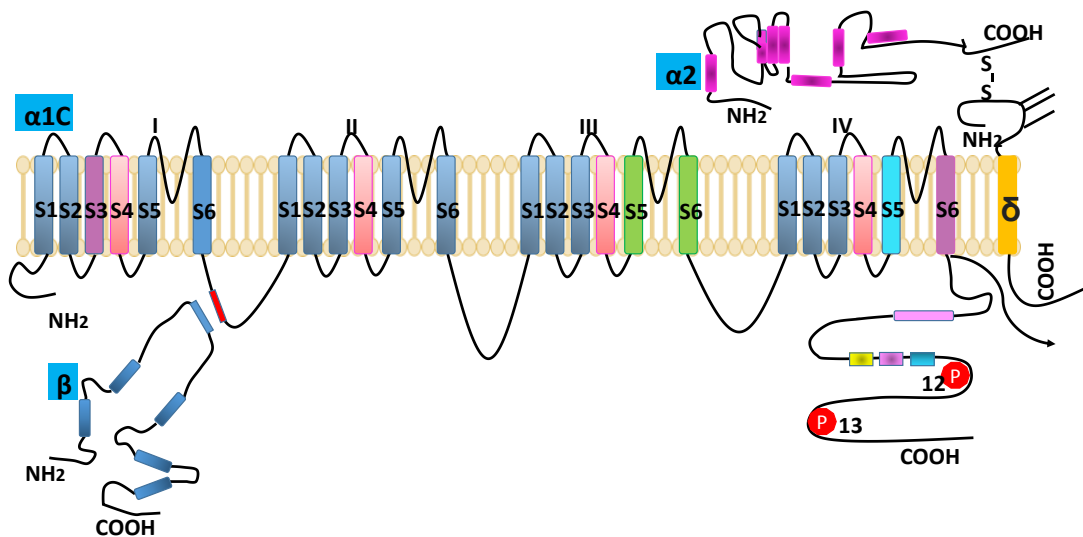


Fig.4 Esquema de la estructura del canal de Ca²⁺ tipo L (modificado de Bodi *et al* 2005).

2.9.1 El canal de Ca^{2+} tipo L en el acople excitación-contracción.

Al despolarizarse la membrana del cardiomiocito a un nivel que genere un potencial de acción, se abrirán los canales de calcio dependientes de voltaje en la fase dos, o de meseta de dicho potencial. Esta entrada de calcio libera más calcio del retículo sarcoplásmico aumentando las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para que milisegundos después el ion Ca^{2+} sea empleado por las miofibrillas en la contracción o sístole cardíaca (Bers & Guo, 2005). Posteriormente viene la relajación en la cual las concentraciones de calcio disminuyen como consecuencia de la activación de las bombas SERCA, la PMCA y el canal uniporter de la mitocondria (Bers, 2013).

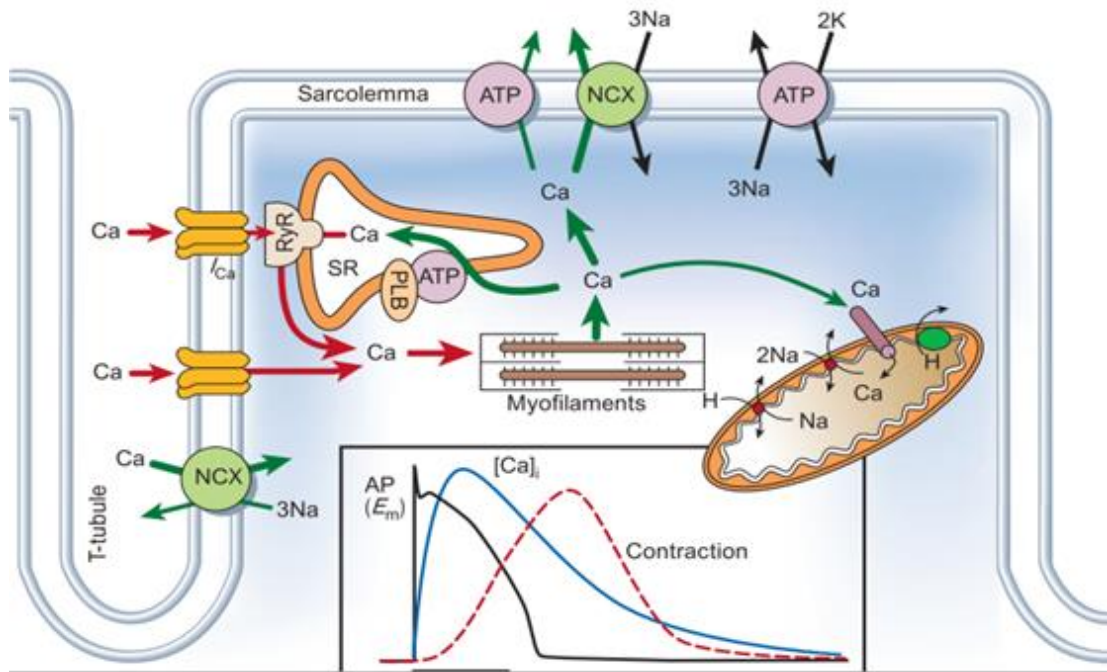


Fig.5 Acople excitación-contracción. Se esquematiza a la célula muscular cardíaca con las principales proteínas que participan en el manejo del calcio intracelular durante la contracción y en la relajación. En el recuadro se representa el curso temporal desde la producción del potencial de acción (negro), el transitorio de Ca^{2+} (azul), y la contracción (línea punteada roja), (tomado de Bers, 2013).

2.9.2 Regulación del canal de Ca²⁺ tipo L.

El canal de calcio tiene varios sitios de interacción en el extremo COOH terminal para proteínas y fármacos, estos sitios de interacción regulan su actividad. Las proteínas cinasas involucradas son PKA, PKC (Puri *et al.*,1997) y PKG (Keef *et al.*,2001). Su regulación es compleja y depende de las condiciones del canal, la temporalidad, etc.

La vía cAMP/PKA fosforila al canal en la región del carboxilo terminal en la serina 1928 y a nivel de la subunidad β en los residuos 143 y 145. La fosforilación en la serina 1928 en la subunidad $\alpha 1c$ aumenta las corrientes de calcio (Hofmann *et al.*,2014).

Las corrientes de calcio son reguladas por cGMP/PKG (Méry *et at.*, 1991) y por lo tanto NO/cGMP se vería involucrado en la regulación del canal al disminuir las corrientes por fosforilación (Hofmann *et al.*, 2014). Estos efectos de PKA y PKG son opuestos y se continua analizando como estas proteínas cinasa interactúan en la subunidad $\alpha 1c$ aumentado o disminuyendo su actividad (Vandael *et al* 2013; Zhao *et al* 2018).

Estudios *in vitro* han demostrado que la PKC fosforila tanto a la subunidad $\alpha 1c$ en el extremo amino terminal en los residuos 27 y 31 (McHugh *et al.*, 2000), así como a la subunidad $\beta 2$ en el amino terminal (Hofmann *et al.*, 2014), y puede activar o inhibir al canal dependiendo de las diferentes isoformas de la PKC (Keef *et al.*, 2001).

La CaMKII es una cinasa dependiente de la calmodulina muy abundante en el corazón que tiene sitios de interacción en la región del carboxilo terminal de la subunidad $\alpha 1c$ a la cual puede fosforilar, teniendo como consecuencia la inactivación o la facilitación del canal (Maier & Bers, 2007).

El canal de Ca²⁺ tipo L tiene varios residuos de cisteína que están expuestos a los efectos de las especies reactivas de oxígeno provocando glutationilación del canal y aumentando así las corrientes de calcio (Tang *et al.*,2011). El NO puede modular al canal via cGMP/PKG disminuyendo las corrientes del canal o aumentándolas por acción directa sobre grupos tiol (-SH) (Hool & Corry, 2007).

2.9.3 Antecedentes inmediatos

En un estudio publicado por González *et al.*, (2010) se demostró el papel fundamental de los canales Cav1.2 en la protección al miocardio en un modelo de PF. Gonzalez *et al* (2010) encontraron una disminución del área de infarto en corazones de rata Wistar adulta, así como una disminución de la amplitud de las corrientes de calcio en cardiomiocitos precondicionados farmacológicamente con diazóxido (abridor del mK_{ATP}) en comparación con el grupo control (ver Figura 6). La incubación previa con 5-hidroxicanoato (5-HD), bloqueador del canal mK_{ATP}, evitó los efectos del diazóxido en las corrientes de Ca²⁺ del canal.

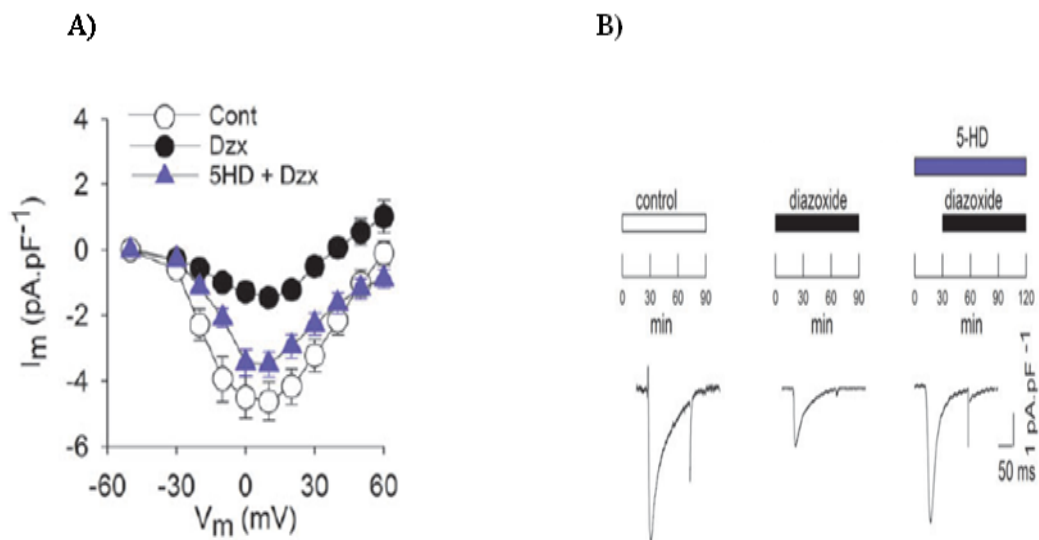


Fig. 6. A) curva I-V con los promedios de las corrientes al pico obtenidas a diferentes potenciales de membrana. En círculos claros se muestran los datos obtenidos en miocitos control, y en círculos negros los valores de miocitos tratados con diazóxido. Los triángulos muestran los datos obtenidos al pre incubar los miocitos con 5-HD, bloqueador de los canales mK_{ATP}. B) Los diagramas representan los protocolos experimentales utilizados. En la parte inferior se muestran registros representativos de las corrientes de Ca²⁺ tipo L (abajo) obtenidas a 0 mV en las diferentes condiciones experimentales. (Gonzalez *et al.*, 2010).

Al disminuir las corrientes de calcio se esperaría que la liberación de calcio del RS también sea menor. Efectivamente, en cardiomiocitos enzimáticamente disociados provenientes de rata Wistar adulta y con PF con diazóxido se demostró (Gonzalez *et al.*, 2010) una disminución de la amplitud de los transitorios de calcio comparados con el grupo control y este efecto se evitaba cuando los cardiomiocitos eran incubados con 5-HD, o, con N-acetil-cisteína (NAC) que es un amortiguador de especies reactivas de oxígeno, lo cual demuestra un papel de las ROS en el PF (ver Figura 7A). En ese mismo trabajo se encontró por estudios de Western blot una expresión a la baja de la subunidad α_{1c} en miocitos cardiacos sometidos a PF, lo cual indica que la expresión del canal a la baja es la causante de la disminución de las corrientes en esas condiciones (ver Figura 7B).

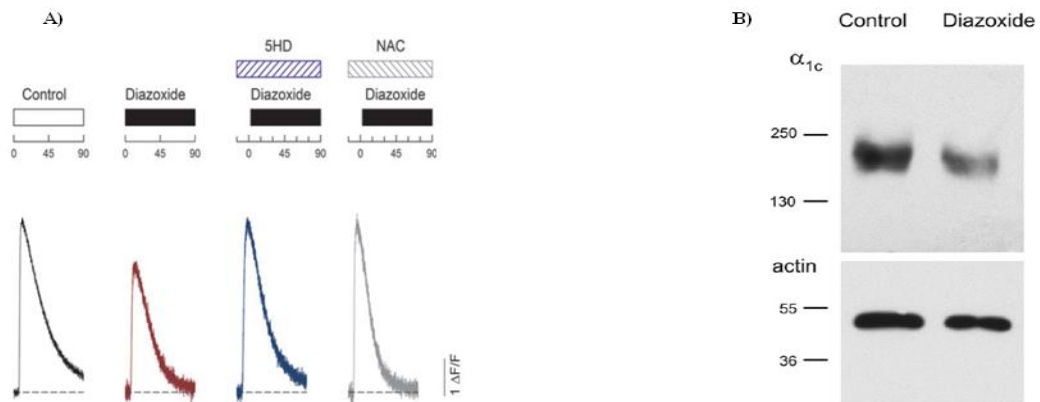


Fig. 7. El PF reduce las señales de calcio y la expresión de la subunidad α_{1c} . A) en la parte superior se representan los protocolos y en la parte inferior se muestran registros representativos de los transitorios de calcio en las diferentes condiciones experimentales. B) Blots representativos de la subunidad α_{1c} en condiciones control y con diazóxido, así como de actina, proteína utilizada para la normalización. (tomado de Gonzalez *et al.*, 2010).

En nuestro laboratorio nos hemos interesado por analizar el papel que juegan los canales de calcio en la cardioprotección, y ante la escasez en la literatura de datos en este sentido en las diferentes fases del PIR, nos dimos a la tarea de su estudio en este modelo de preconditionamiento

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la mayor causa de muerte a nivel mundial, su relación con el sedentarismo, la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico agravan más este problema. En México también son la primera causa de muerte a nivel nacional afectando niños, adolescentes y por supuesto adultos.

El PIR podría ser una terapia novedosa con aplicaciones clínicas, por lo que el estudio de los mecanismos por los cuales promueve la protección del corazón deben ser estudiados e investigados para promover terapias efectivas que lleven a resultados exitosos.

El calcio está implicado en varios procesos biológicos. En el acople excitación-contracción la célula debe tener un manejo de calcio adecuado. Durante la isquemia-reperfusión los mecanismos que lo controlan se ven alterados provocando concentraciones altas a nivel intracelular que llevan a la muerte celular por hipercontractilidad, o a procesos apoptóticos de las células cardiacas que tendrán como resultado un mal funcionamiento cardiaco.

El interés de este trabajo es analizar si el canal de Ca^{2+} tipo L está involucrado en la cardioprotección producida por el PIR, modelo de cardioprotección con posibles aplicaciones terapéuticas.

4. HIPÓTESIS.

En un modelo de preconditionamiento isquémico remoto el tejido cardiaco disminuye la actividad de los canales Cav 1.2

5. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad del canal de Cav 1.2 en miocitos cardiacos de rata adulta después del preconditionamiento isquémico remoto.

6. OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Implementar el modelo de preconditionamiento isquémico remoto y su validación a través de la medición de las áreas de infarto

2.- Registrar por la técnica de patch clamp las corrientes de calcio en miocitos cardiacos obtenidos de ratas previamente sometidas al preconditionamiento a distancia y analizar los posibles cambios en relación con miocitos de ratas testigo.

3.- Analizar los posibles cambios en los transientes de calcio mediante su registro con técnicas ópticas en cardiomiocitos obtenidos de ratas sometidas al preconditionamiento remoto.

4.- Estudiar si la contractilidad de los miocitos en las condiciones antes mencionadas se ve alterada.

5.- Evaluar por medio de técnicas de Western blot los posibles cambios en la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ en extractos totales de cardiomiocitos obtenidos de ratas sometidas a preconditionamiento isquémico remoto.

6- Analizar los posibles cambios en la protección obtenida con el modelo de PIR a las 24 horas posteriores al procedimiento (ventana tardía o PR tardío) a través de la medición de las áreas de infarto

7.- Registrar por la técnica de patch clamp las corrientes de calcio en miocitos cardiacos obtenidos de ratas previamente sometidas a PR tardío para analizar sus posibles cambios en esa etapa.

8.- Medir la contractilidad de los miocitos en las condiciones de acondicionamiento remoto durante la ventana tardía.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Protocolo anestésico.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250 a 300 g. Las ratas se colocaron en una cámara de inducción anestésica con isoflurano al 4% con una mezcla de oxígeno al 95% y CO₂ al 5% a un flujo de 0.5 a 1 l/min, posteriormente el mantenimiento anestésico se hizo con una mascarilla a una saturación de 2% de isoflurano (Sociedad Española de Anestesia (S.E.A.) animalario, 2005), una vez comprobada la profundidad de la anestesia por pinzamiento interdigital (ausencia de dolor) se procedió a realizar una incisión quirúrgica que abarca la región ventral del cuello iniciando caudalmente en el comienzo del tórax y terminando a la altura del ángulo mandibular. Se separan el tejido subcutáneo y los músculos braquiocefálicos exponiendo los anillos traqueales. Se introduce un catéter de 16G en la luz traqueal para posteriormente sacar la aguja y sólo dejar el catéter, una vez comprobado que el catéter está bien colocado se retira la mascarilla y se coloca el ventilador mecánico (Ugo Basile, modelo 7025, Italy), a una frecuencia de 76 respiraciones por minuto.

A)



B)

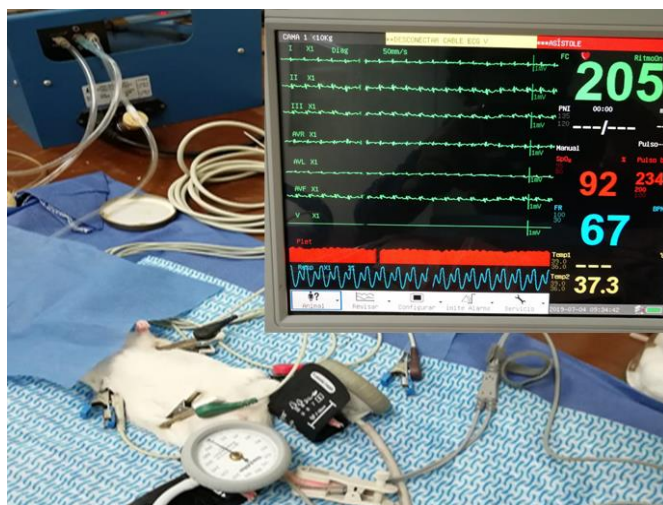


Fig. 8. Fotografías que muestran al animal anestesiado (A), y durante la aplicación del protocolo de PIR (B) en donde se muestra el registro simultáneo del EKG, frecuencia cardiaca, pulso, saturación de oxígeno, temperatura rectal, plestinografía y frecuencia respiratori. En los miembros inferiores se observa el baumanómetro pediátrico.

7.2 Protocolo de Precondicionamiento Isquémico Remoto (PIR).

Las ratas se seleccionaron aleatoriamente. Durante el periodo de estabilización anestésica se rasuró y desinfectó la zona quirúrgica lateral izquierda (región del tórax). En el grupo utilizado como referencia del daño producido por un período prolongado de isquemia (grupo de I/R), la anestesia se continuó durante 40 minutos, posteriormente se realizó una incisión quirúrgica en el cuarto espacio intercostal exponiendo la cavidad torácica y el corazón. Se localizó la arteria anterior descendente (AAD) y con una sutura absorbible de 5-0 de ácido poliglicólico (Surgeasy) se ocluyó la arteria durante 30 minutos con un punto simple. Pasado este tiempo se retiró el punto de sutura para permitir el flujo sanguíneo durante 90 minutos, y acto seguido se extirpó quirúrgicamente el corazón. En el grupo PIR+ I/R se produjo isquemia en los miembros inferiores obliterando la arteria femoral, con ayuda de un baumanómetro pediátrico a una presión de 200 mmHg, durante 5 minutos seguidos de 5 minutos de reperfundición de manera alternada hasta completar 40 minutos, los siguientes pasos fueron iguales a los del grupo I/R. hasta la extirpación quirúrgica.

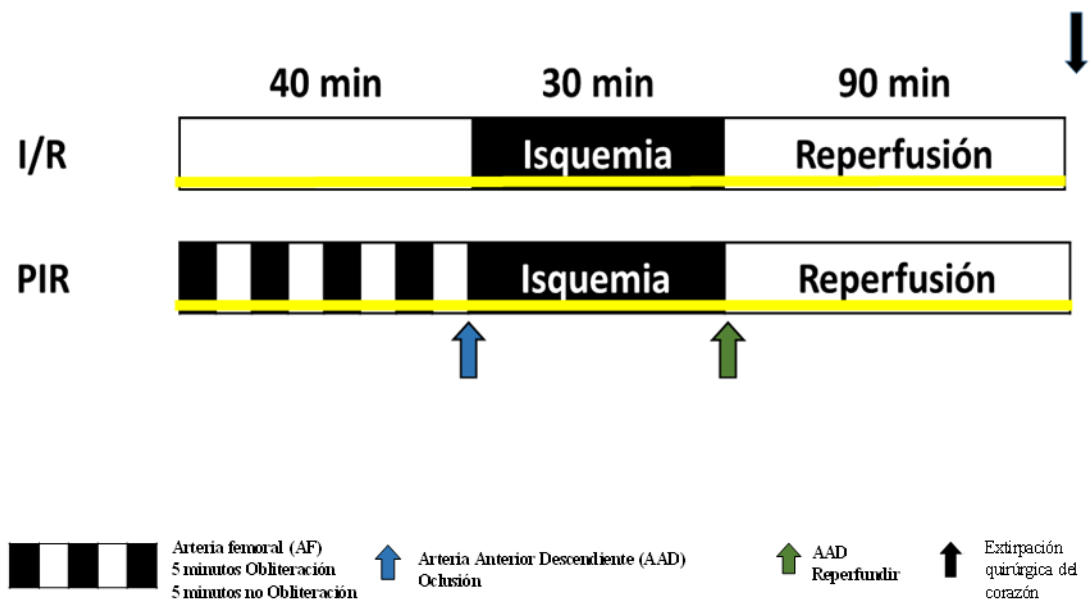


Fig.9 Esquema de los protocolos para la validación del PIR.

Protocolo de PIR Tardío.

Los animales en los que se analizó el grado de protección producido en la etapa tardía del PIR se dividieron en dos grupos, a uno de ellos se le aplicó anestesia durante 40 min y acto seguido se mantuvo a la rata por un periodo de 24 horas. Posteriormente, y bajo anestesia, se procedió a realizar el protocolo de I/R (grupo de I/R tardía), es decir, 30 minutos de isquemia seguidos de 90 minutos de reperfusión. El otro grupo, grupo de PIR tardío, se sometió al protocolo de 4 ciclos de isquemia y reperfusión descrito previamente, y 24 horas después se sometió a los períodos más prolongados de isquemia y reperfusión (ver Figura 10).

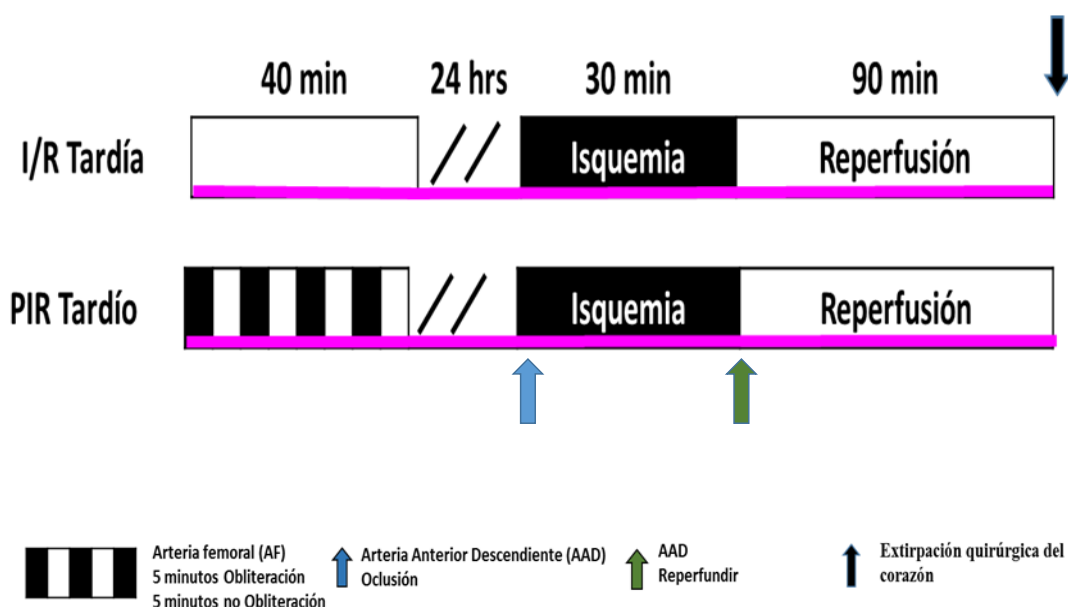


Fig.10 Esquema de los protocolos para la validación del PIR tardío.

7.3 Medición del área de infarto.

Después de los 90 minutos finales de la reperfusión, tanto para los animales sometidos al PIR o al PIR tardío los corazones fueron extirpados quirúrgicamente, previo lavado con PBS que contiene (en mM) 137 NaCl, 2.7 KCl, 10.56 Na₂HP0₄, 1.45 KH₂ PO₄. Los corazones se congelaron durante dos horas a -20 °C, se realizaron cortes histológicos a

la altura del ápice y tercio medio y se incubaron 20 min en una solución de 2,3,5 cloruro de Trifeniltetrazolium (TTC) (Sigma-Aldrich) al 1% a 37 °C. Posteriormente, se pasaron a solución de formaldehído al 10 % y se refrigeraron por 24 h. El TTC tiene la ventaja de reaccionar con la enzima deshidrogenasa y cofactores como NADH, presentes en las células viables, produciendo un color rojo, mientras que el tejido necrótico no se colorea (Downey, 2019). La medición del área de infarto se hizo utilizando el software image J y los resultados se expresaron en porcentaje en relación al área total (Cho *et al.*, 2019).

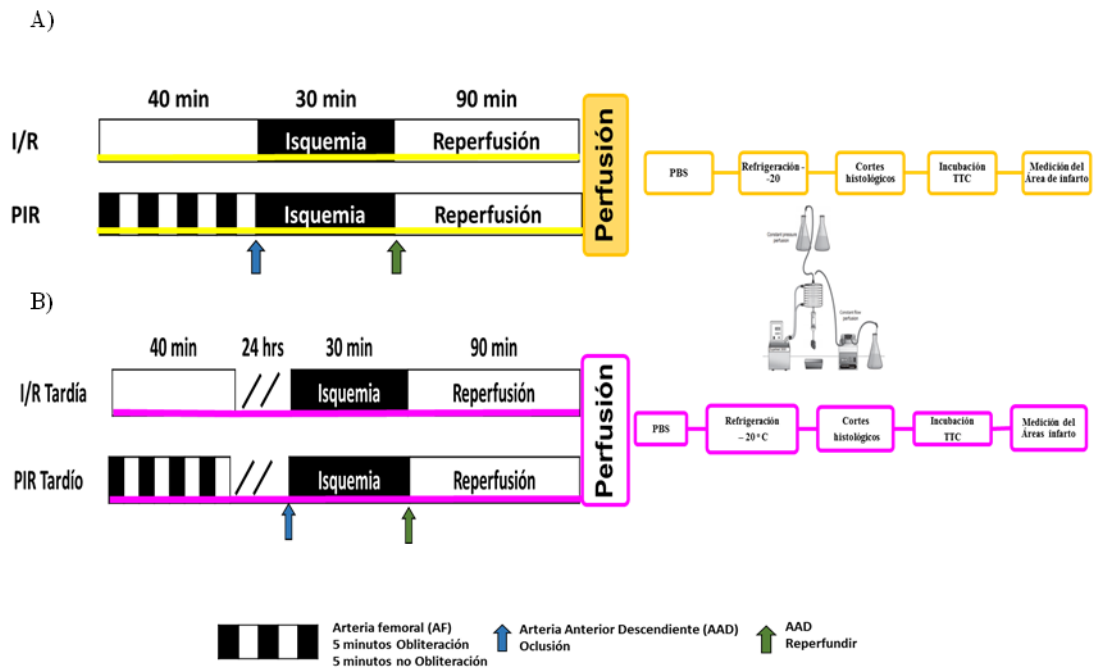


Fig. 11 Esquema de la metodología para la validación de los modelos de PIR (A, en amarillo) y de PIR tardío (B, en rosa), desde el respectivo protocolo hasta la medición del área de infarto.

7.4 Disociación de los cardiomiocitos.

Para el estudio de los diversos mecanismos fisiológicos de protección que se inducen con el PIR, se utilizaron cardiomiocitos aislados enzimáticamente. En los grupos utilizados para estudiar la fase temprana del PIR se procedió de la siguiente manera. En el grupo control, después de 40 min. de anestesia se procedió a extirpar el corazón y se montó en el sistema de Langendorff para la disociación de los cardiomiocitos. En el grupo correspondiente al PIR, bajo anestesia, se realizaron periodos de 5 min de

isquemia en los miembros inferiores, seguidos de 5 min de reperfusión hasta completar 40 min y posteriormente se extirpó el corazón para colocarlo en el sistema de Langendorff y proceder a la disociación enzimática de los miocitos (ver Figura 11 A). En el caso del PIR tardío, el grupo control se anestesió por 40 min y se dejaron transcurrir 24 hs antes de la disociación. En el grupo de PIR tardío los animales se sometieron al protocolo y después de 24 hs se extirpó el corazón para proceder a la disociación de los cardiomiocitos (ver Figura 11 B).

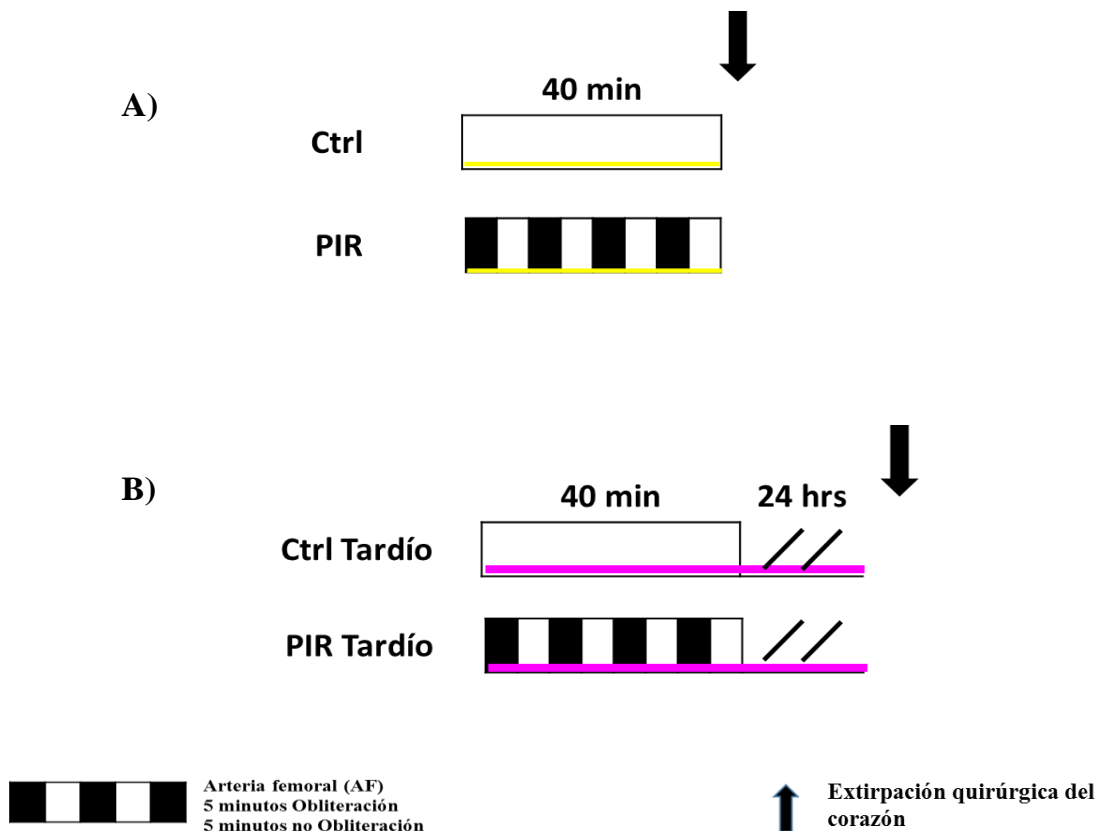


Fig.12 Esquemas de los protocolos para el estudio de los mecanismos de protección generados por el PIR y el PIR tardío, con sus respectivos controles. Al finalizar los protocolos se extirpó el corazón y se procedió a la disociación enzimática de los cardiomiocitos.

Los corazones fueron rápidamente canulados por la aorta y colocados en un sistema de Langendorff, perfundidos durante 5 min con una solución de Tyrode a 37 °C que contiene (en mM) 137 NaCl (Merck), 5.4 KCl (Merck), 1 MgCl₂ (Sigma), 10 HEPES (Sigma), 10 Glucosa (Merck). Pasado este tiempo la solución de perfusión se cambió por una solución de Tyrode a la que se le añadieron 18 mg de colagenasa (Worthington

Biochemical Corporation) y 3 mg de proteasa (Sigma) para 100 ml, durante ~50 min. para permitir la digestión de la matriz extracelular. Se desmontó el corazón, las aurículas se separaron y los ventrículos se cortaron en trozos más pequeños para facilitar el desprendimiento de los miocitos, los cuales fueron centrifugados a 2 g (Zentrifugen D-78532 Tuttlingen) durante 2 min. Las células fueron resuspendidas en una solución de Tyrode con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) al 0.1% y en la cual se fue incrementando gradualmente la concentración de calcio (0.1, 0.5 y 1 mM de CaCl₂, períodos de 2 minutos para las dos primeras concentraciones) con el fin de evitar una sobrecarga de calcio y la consiguiente muerte celular.

Los trozos restantes de los ventrículos fueron incubados a 37 °C (Water Bath Precisión) por 5 min en la misma solución con enzimas, y se repitieron los pasos antes mencionados.

Las células enzimáticamente disociadas tanto del grupo control como del grupo con PIR fueron utilizadas para las técnicas que se describen a continuación.

7.5 Medición de los transitorios de Ca²⁺.

Los miocitos ya disociados se incubaron en solución Tyrode que contenía 5 mM de Fluo-3 AM (Molecular Probes) durante una hora, en la oscuridad. Pasado este tiempo se lavó el indicador con Tyrode y se incubó durante 30 minutos más. La forma AM del indicador fluorescente Fluo-3 tiene la ventaja de atravesar la membrana plasmática y las esterasas de la célula hidrolizan el indicador haciéndolo sensible al calcio. Este indicador genera poca compartimentalización y ha sido utilizado en miocitos cardiacos ampliamente (González *et al.*, 2010).

Una vez terminado el periodo de incubación las células se colocaron en un portaobjetos y se observaron a través de un microscopio de fluorescencia (Nikon). La excitación fue a 485 nm y la emisión se filtró a 535 nm, la cual fue captada por un fotodiodo acoplado al microscopio y a través de una interfaz la señal análoga se convirtió a una señal digital (Digidata 1322, 16 bits). Los miocitos se estimularon eléctricamente de forma

extracelular para generar potenciales de acción a una frecuencia de 0.2 Hz. La fluorescencia emitida se registró cada 60 μ s por 40 s. La fluorescencia basal (F) se tomó del promedio de los 300 ms previos al transiente de calcio y la amplitud se midió de manera relativa como $\Delta F/F$. Los datos fueron analizados utilizando el software pCLAMP 8.0 (Axon Instruments) y SigmaPlot 10 (Systat Software Inc).

7.6 Registro electrofisiológico de las corrientes de calcio.

Las corrientes de calcio se midieron mediante la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa (whole cell) (Hamill *et al.*,1981). Se aplicó un protocolo de pulsos que consistió de dos pulsos consecutivos hiperpolarizantes de -10 mV con una duración de 150 ms, seguidos de una secuencia de pulsos que iban desde -40 mV hasta +60 mV en pasos de 10 mV y con una duración de 150 ms. Los pulsos hiperpolarizantes permiten cuantificar las corrientes capacitivas y las corrientes lineales las cuales se restaron para obtener exclusivamente las corrientes de Ca^{2+} . El potencial de “holding” se escoge cercano al potencial en el cual la mayoría de los canales de Ca^{2+} tipo L están cerrados en una determinada célula (Molleman, 2003).

Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200-A (Axon Instruments) y fueron digitalizadas por una interfaz Digidata Interface (Axon Instruments, Foster City, USA) con una resolución de 16 bits. Los datos se analizaron con el software pCLAMP 8.0 (Axon Instruments).

La solución en la pipeta contenía (en mM) 100 aspartato de cesio, 20 CsCl (Sigma), 20 TEACl (Sigma), 2 MgATP (Sigma), 1.8 MgCl₂ (Sigma) 0.05 EGTA (Sigma) y 5 HEPES (Sigma), pH 7.2. La solución externa fue Tyrode con 1 mM de CaCl₂. La solución interna permite bloquear los canales de potasio utilizando cesio, además de cloruro de tetraetilamonio (TEACl), un bloqueador de los canales de potasio inespecífico (Molleman, 2003).

Los miocitos ya disociados fueron inmediatamente transferidos a la cámara de registro para realizar la técnica de patch clamp.

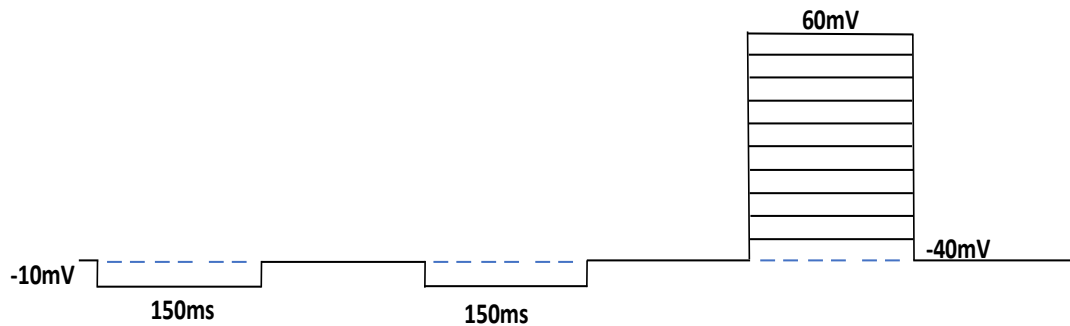


Fig. 13 Esquema del protocolo de pulsos utilizado para el registro de las corrientes de Ca^{2+} .

7.7 Registros de la actividad mecánica.

Los miocitos aislados fueron estimulados eléctricamente con un estimulador Grass SD a una frecuencia de 1 Hz a través de electrodos de platino. El acortamiento de los cardiomiocitos se observó a través de un microscopio y se videograbó con una cámara Deiko (MSR, 350) y con el software Dvd Video Soft Free Studio se convirtió la imagen de video a imágenes en formato jpg con un intervalo entre cuadro y cuadro de 33.33 ms. La medición se inició durante la relajación y se continuo cada 33.33 ms hasta el máximo acortamiento. Con el software image J se analizó dicho acortamiento. Los valores de acortamiento se promediaron para el grupo control y para el sometido a PIR y fueron expresados en longitud relativa con respecto a la longitud de reposo. El período de contracción, o tiempo al pico, se midió como el tiempo entre el inicio de la contracción y el máximo acortamiento del cardiomiocito El periodo de relajación se midió desde el punto de máxima contracción hasta la relajación completa de la célula (Paterek & Mackiewicz, 2016).

7.8 Medición de la expresión de la proteína $\alpha 1c$

Se utilizaron extractos totales de cardiomiocitos enzimáticamente disociados inmediatamente después de ser obtenidos, se colocaron en Buffer de lisis que contiene 20 mM de Tris 100 mM NaCl, 1% Triton X 100, con inhibidores de proteasas y se congelaron a -70°C , posteriormente se sometieron a sonicación durante 5 ciclos y se centrifugaron a $13,000\text{ g}$ durante 10 min. a 4°C , la fracción soluble fue utilizada para Western blot. La cuantificación de proteína fue realizada con la técnica de Bradford y las muestras se llevaron a una concentración de $20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se utilizaron geles de dodecil sulfato de sodio -poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % para la identificación de la proteína $\alpha 1c$ y para la β tubulina y se corrió durante 2 horas a 180 mV, en una cámara de electroforesis modelo V16. Una vez que se corrieron los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa m (Bio-Rad).

Posteriormente y para verificar que hubo una buena transferencia se hizo una tinción con Rojo de Ponceau, La membrana se bloqueó con PBS más 4.5% de leche en polvo libre de grasa, en agitación y a temperatura ambiente, con el fin de cubrir las zonas libres de proteína y que el anticuerpo primario no interactúe con la misma membrana.

La membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario Anti-Cav 1.2 (CACNA 1C) de conejo a una dilución de 1:100, 000 a una temperatura de 4°C . Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario AB 6528 de ratón unido a peroxidasa en una dilución de 1:200.

El anticuerpo secundario unido a la peroxidasa al agregarle el sustrato produce una reacción de quimioluminiscencia que se registra con una placa de rayos X.

Se cuantificó la densidad absoluta de la banda, se calculó el área y el promedio de la intensidad de la banda, el producto de estos dos parámetros nos da densidad absoluta de la banda. La normalización se hace dividiendo la densidad absoluta de $\alpha 1c$ entre la densidad absoluta de β tubulina.

8. RESULTADOS.

8.1 El protocolo de PIR produjo protección frente a la isquemia-reperfusión.

Nuestro primer objetivo fue evaluar la efectividad de nuestro protocolo de PIR, para lo cual evaluamos el área de infarto después de aplicar una hipoxia prolongada. Con este propósito se utilizó la tinción con TTC y se midió el área de infarto por medio del software image J y los resultados se expresan en porcentaje de área infartada. La figura 14 muestra en el panel A cortes histológicos representativos a diferentes niveles del corazón. PIR denota al corazón sometido al protocolo de preconditionamiento, I/R se refiere al corazón que sólo se sometió al protocolo de isquemia-reperfusión. Se puede apreciar una clara disminución del área de infarto en corazones provenientes de ratas sometidas a PIR comparada con el grupo control. En el panel B de la figura 14 se resumen los resultados de varios experimentos en donde se expresa el área de infarto como porcentaje del área total. La protección fue de poco más del 40% en relación con el grupo que no se preconditionó, por lo tanto, nuestro modelo confiere cardioprotección.

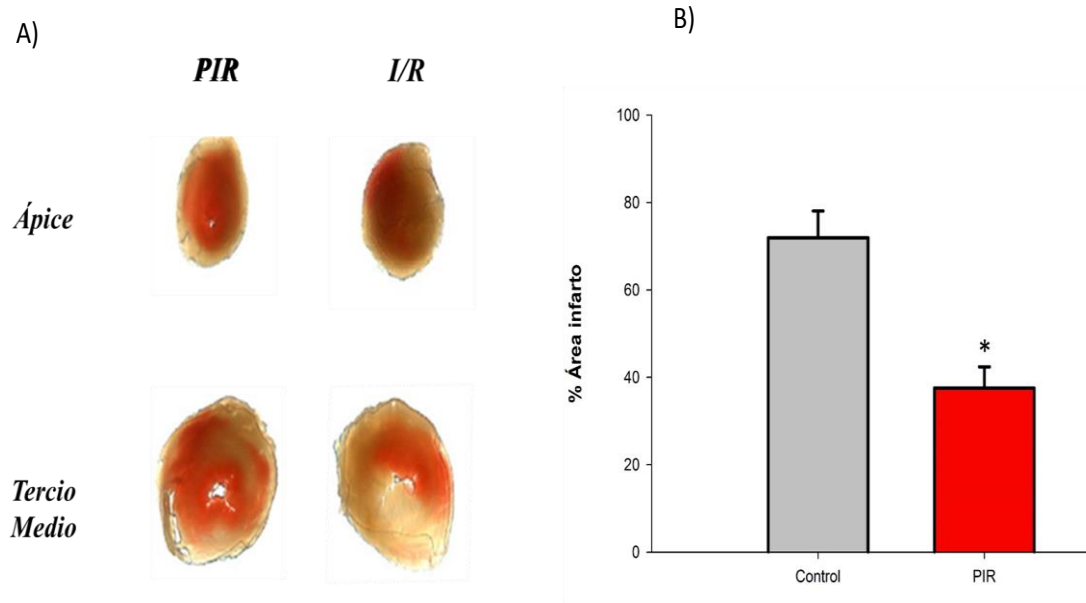


Fig. 14 **El PIR disminuye el área de infarto.** A) Ejemplo de cortes histológicos de dos corazones en dos regiones diferentes. Uno de los corazones fue sometido a PIR y posteriormente a I/R, y el otro únicamente a I/R. El TTC tiñe de rojo el tejido viable, las zonas infartadas se ven blanquecinas. B) La gráfica resume la cuantificación de las áreas de infarto a partir de cortes histológicos como los mostrados en A. $n = 4$ por grupo. $*p < 0.05$.

8.2 El PIR produjo una disminución transitoria en la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} .

Habiendo comprobado la efectividad de nuestro protocolo de PIR para producir la protección ante eventos de ischemia-reperfusión lo siguiente fue analizar si, como en el caso del PF, dicha protección se acompaña de una disminución de las corrientes de Ca^{2+} . Como se observa en la gráfica de la figura 15 A la curva I-V de células provenientes de animales sometidos a PIR tiene valores menores de densidad de corriente a todos los voltajes probados. Sin embargo, este efecto no fue mantenido ya que las corrientes obtenidas a tiempos mayores de tres horas después de realizado el protocolo de PIR no son diferentes a las controles (figura 15 B).

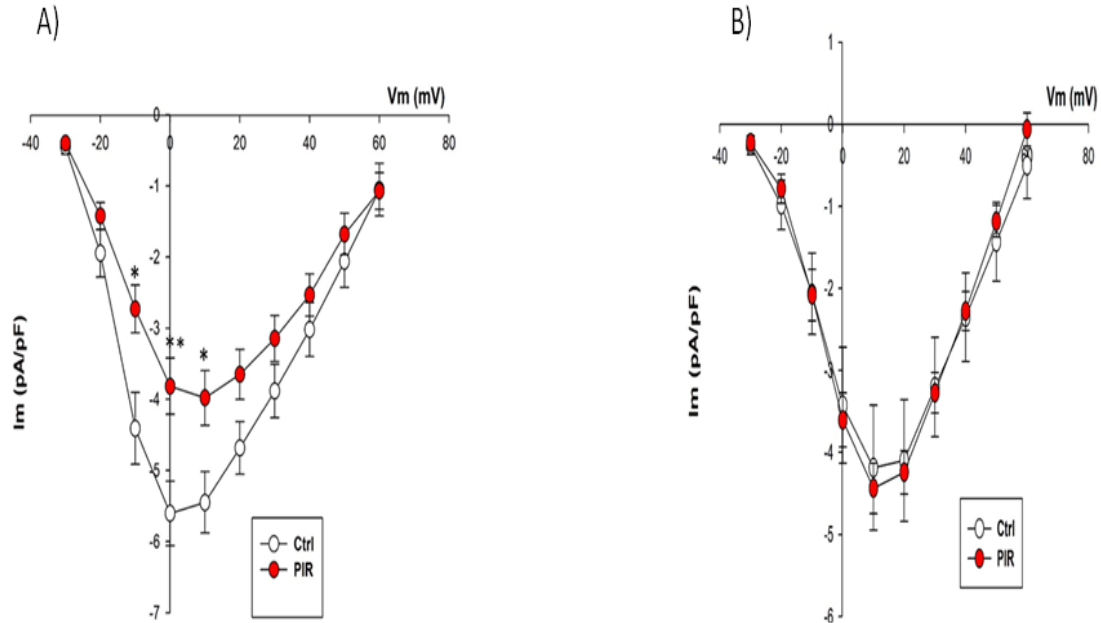


Fig. 15 El PIR disminuye las corrientes de Ca^{2+} . A) Gráfica de la curva corriente-voltaje (I-V) donde se promedian las amplitudes máximas obtenidas a diferentes potenciales de membrana. Se observa una clara disminución de las corrientes en las células tratadas con PIR (círculos rojos, $n=19$) comparadas con las células en condiciones control (círculos claros, $n=19$). Los registros se realizaron en un período de tiempo de 90 a 180 min después de realizado el PIR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. B) Gráfica de la curva I-V de registros obtenidos entre 190 a 240 min después de realizado el PIR. En este caso no existen diferencias significativas entre los grupos control y PIR ($n= 13$ para ambos grupos). En la parte superior derecha se muestran los esquemas de los protocolos experimentales para las células control y para los miocitos sometidos a PIR.

8.3 El PIR no modificó los transitorios de Ca^{2+}

Como se mencionó previamente, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Cav1.2 es determinante para la liberación de Ca^{2+} desde el RS. Si las corrientes se vieron disminuidas después del PIR se podría esperar que los transientes de Ca^{2+} también se vieran reducidos ya sea en su amplitud y/o en su duración. En la figura 16 A se

muestran dos registros de transitorios de Ca^{2+} representativos, en negro está el proveniente de una célula proveniente de un animal control y en rojo, de un animal sometido a PIR. No se observan cambios evidentes ni en amplitud ni en duración. En el panel B se resumen los resultados de medir la amplitud, como $\Delta F/F$, de varios experimentos, no se encontraron diferencias significativas. La gráfica del panel C resume los resultados de la medida de la anchura media en ambos grupos. Tampoco se observan cambios estadísticamente significativos. Estos registros se obtuvieron entre 3 y 4 horas después de la aplicación del protocolo de PIR.

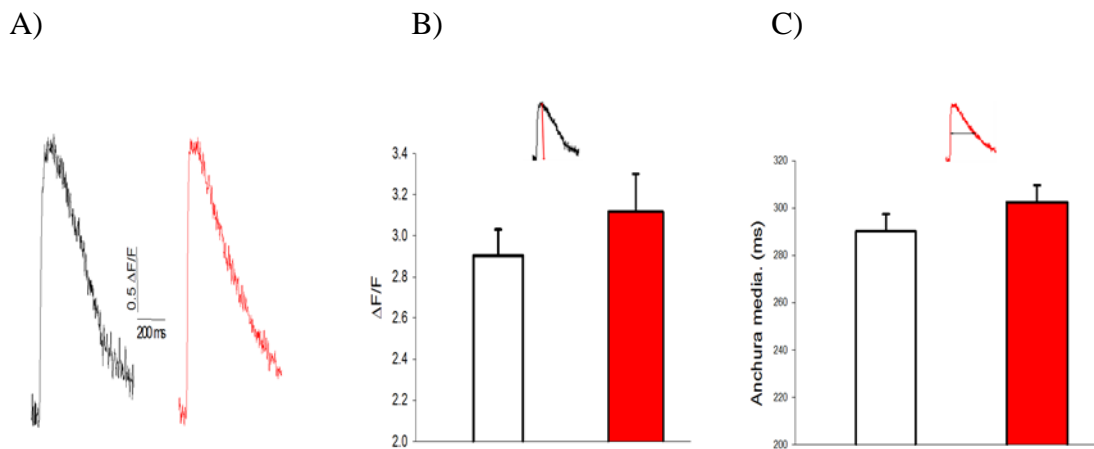


Fig.16 **El PIR no modifica las señales de Ca^{2+}** . A) Registros representativos de transitorios de calcio, expresados como $\Delta F/F$ para su normalización, en condiciones control (trazo en negro) y PIR (trazo en rojo). B) Gráfica de los promedios de la amplitud máxima de los transitorios de calcio de cardiomiocitos tratados con PIR (n=51) y en condiciones control (n=49). No se observan diferencias significativas. C) Gráfica que muestra el promedio de la anchura media de las señales obtenidas de células cardiacas de animales sometidos a PIR y de animales control. Los resultados no arrojan diferencias significativas. n= 49 para grupo control y 51 para PIR. Los insertos de los paneles B y C señalan los parámetros analizados en las gráficas correspondientes, la amplitud máxima en B, y la anchura media en C.

8.4 El PIR no modifica la contractilidad de los miocitos cardiacos

La contractilidad de los cardiomiocitos depende en gran medida de la disponibilidad de Ca^{2+} , el hecho de que la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} se viera disminuida podría reflejarse en una menor capacidad de acortamiento. La gráfica de la figura 17 A muestra los promedios del acortamiento relativo tanto del grupo control (círculos claros), como del grupo sometido a PIR (círculos rojos) donde no se observan diferencias significativas. En los paneles B y C se muestran las gráficas de los promedios del tiempo al pico y del período de relajación para ambos grupos, respectivamente, sin que se hayan encontrado diferencias significativas

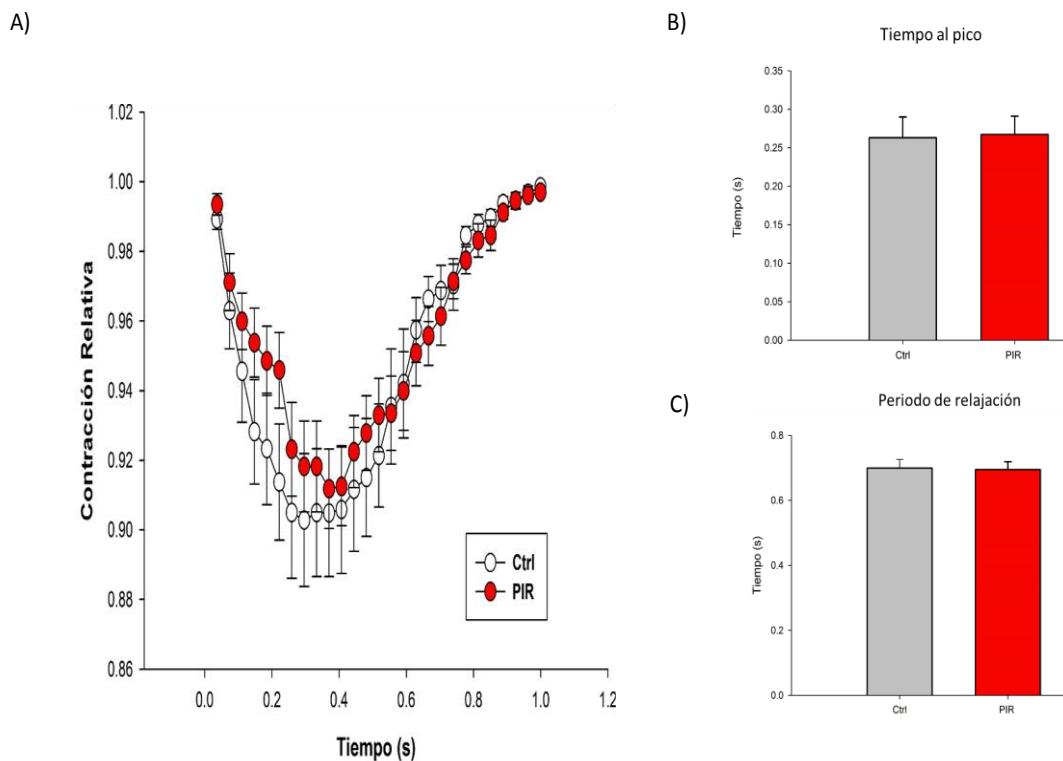


Fig. 17 **El PIR no modifica la contracción de las células cardiacas.** A) Gráfica donde se expresa el acortamiento en forma relativa de los cardiomiocitos sometidos a condiciones de PIR (círculos rojos) comparado con el de miocitos cardiacos del grupo control (círculos claros). B) Gráfica de los promedios de los tiempos al pico para ambos grupos. C) gráfica de los promedios del período de relajación para ambos grupos. Las mediciones de contractilidad se hicieron cada 33 ms ($n=9$ en todos los casos).

8.5 Efectos del PIR sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1c$.

La disminución de las corrientes de Ca^{2+} que se observó después de la aplicación del PIR podría deberse, a semejanza de lo obtenido en un modelo de PF por González *et al.*, (2010), a una disminución en la expresión de la proteína. Como se muestra en la figura 18 A la densidad de la banda de la subunidad $\alpha 1c$ es menor en el grupo precondicionado. Se muestran también las bandas de β tubulina proteína que se utilizó como normalizador. Los cardiomiocitos fueron obtenidos inmediatamente después de la disociación. La figura 18 B muestra el promedio de la densidad relativa de la subunidad $\alpha 1c$ proveniente de tres experimentos. Se observa una disminución de aproximadamente el 50% en el grupo sometido a PIR.

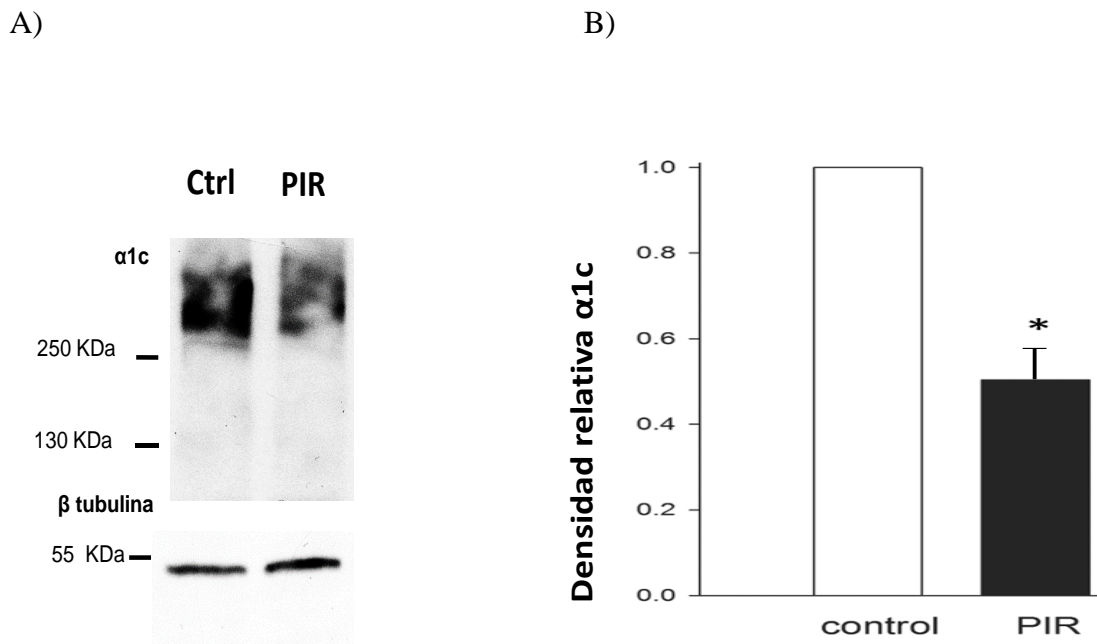


Fig. 18 **El PIR regula a la baja la expresión de la subunidad $\alpha 1c$.** A) Blots representativos de la subunidad $\alpha 1c$ y β tubulina, se observa una mayor intensidad en el blot del grupo control, comparado con la intensidad del grupo PIR. También se muestran los blots de β tubulina, utilizada como normalizador. B) Gráfica de los promedios de las densidades relativas de $\alpha 1c$ en el grupo control (barra blanca) y en el sometido a PIR (barra negra) ($n = 3$ para cada grupo). * $p < 0.05$.

8.6. La protección brindada por el PIR se mantiene después de 24 horas.

Nuestros resultados comprobaron el efecto protector del PIR en un período inmediato posterior (Figura 14), fue por lo tanto de interés analizar si esa protección se mantenía por períodos más prolongados. La figura 19 A muestra cortes histológicos representativos obtenidos a diferentes niveles. Uno de los corazones (PIR) se obtuvo de un animal que se sometió al estímulo preconditionante y 24 horas después se aplicó el protocolo de ischemia-reperfusión. El otro corazón se obtuvo de un animal al cual no se le preconditionó y sólo se sometió a la ischemia-reperfusión. Se midió el área de infarto y los resultados se muestran en la figura 19 B donde se grafican los promedios expresados como porcentaje de área infartada. Nuestros resultados demuestran una clara disminución del área de infarto del grupo PIR tardío con respecto al grupo control.

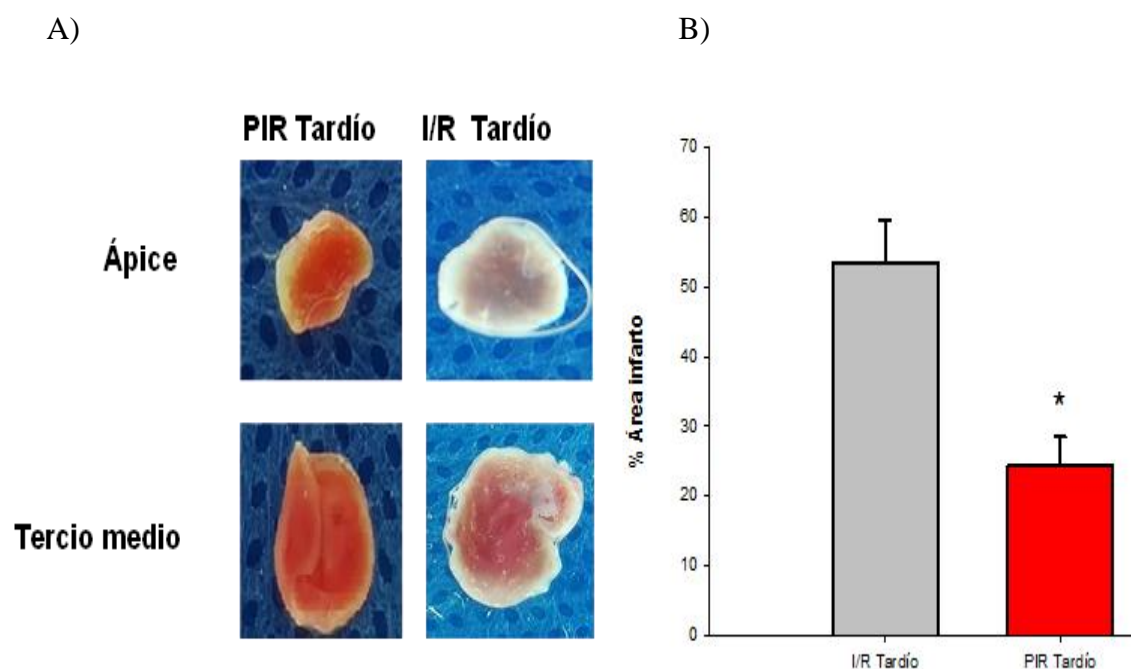


Fig.19 A **las 24 horas de haber realizado el PIR continua la protección cardiaca** A) Cortes histológicos de corazones de un animal sometido a PIR y su control, sometidos a ischemia reperfusion 24 horas después. B) La gráfica resume la cuantificación de las áreas de infarto expresadas en porcentaje para ambos grupos ($n=3$). * $p < 0.05$.

8.7 Durante el PIR tardío no se producen cambios en las corrientes de Ca^{2+}

Como vimos en los resultados obtenidos durante la ventana temprana del PIR, la reducción del área del infarto parece estar relacionada con la disminución de las corrientes Ca^{2+} a través de los canales $\text{Cav}1.2$, y por una disminución a su vez de la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ por lo que medimos las corrientes de estos canales en el PIR tardío. En la gráfica de la figura 20 se muestran las relaciones promedio I-V de miocitos precondicionados y controles registradas a las 24 horas sin que se observen diferencias significativas en ambas curvas.

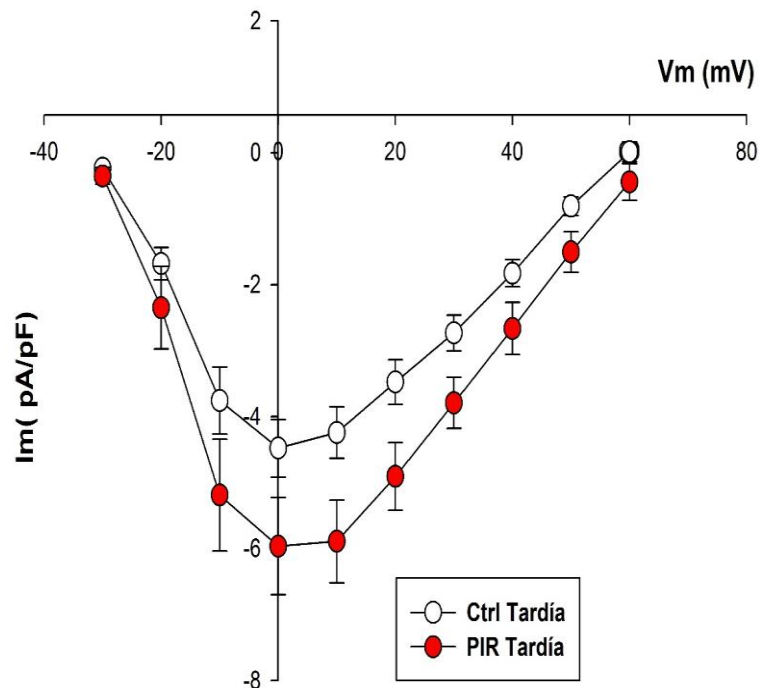


Fig. 20 **Las corrientes de calcio no presentan diferencias en la ventana tardía del PIR.** Gráfica de la curva corriente voltaje en donde se comparan las corrientes del grupo PIR tardío (círculos rojos) con las del grupo control (círculos blancos). $n= 19$ para cada grupo

8.8 Durante el PIR tardío se modifica el curso temporal de la contracción

Como se mostró en la figura 17, durante la ventana temprana de cardioprotección el PIR no tuvo efectos sobre la contractilidad del cardiomiocito, sin embargo, 24 horas después se ven cambios en la cinética de la contracción. La gráfica de la figura 21 A muestra los promedios de la contracción relativa para el grupo sometido a PIR (círculos rojos) y para el grupo control (círculos negros). Se puede observar que hay diferencias significativas de amplitud durante el período de relajación debidas en parte a cambios cinéticos. Esto se detalla en la figura 21 B en donde se muestran las gráficas con los valores promedio para ambos grupos, tanto del tiempo al pico como del período de relajación. El tiempo al pico se encontró disminuido, mientras que el período de relajación se encontró aumentado en el grupo sometido a PIR.

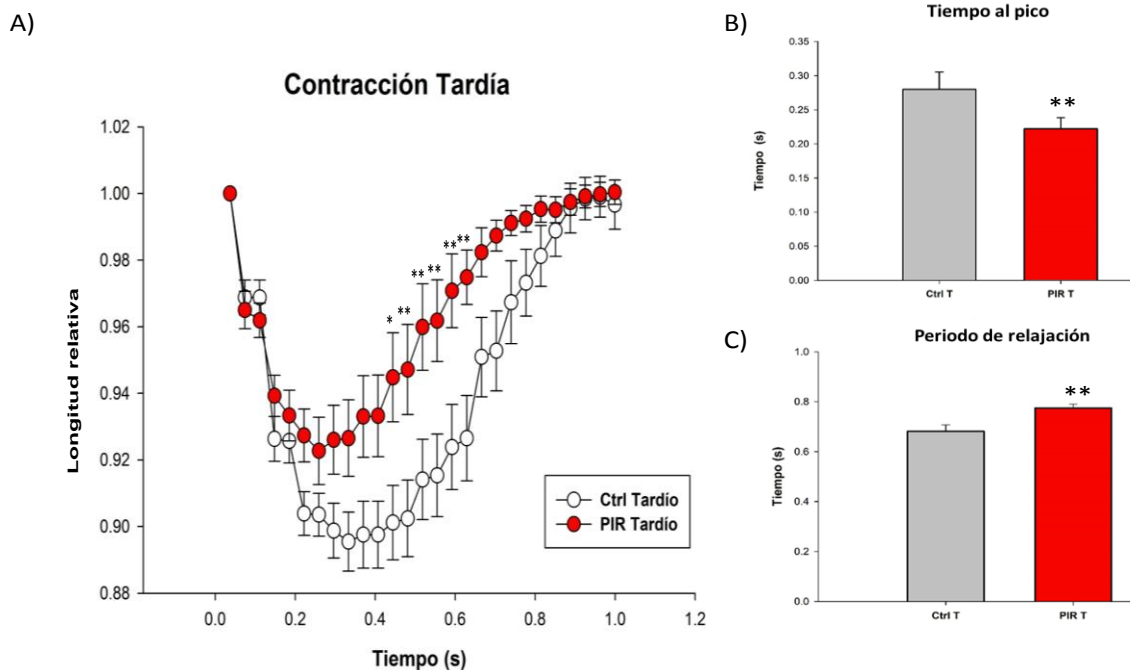


Fig.21 **Durante el PIR tardío hay cambios en la cinética desde la contracción.** A) Gráfica del acortamiento promedio de los cardiomiocitos durante el PIR tardío en relación con la de los cardiomiocitos en condiciones control (círculos rojos y blancos, respectivamente). B) Gráficas de los promedios de los tiempos al pico de contracción y del período de relajación para ambos grupos. $n=14$ para ambos grupos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

9. DISCUSIÓN

9.1 Efectos de PIR sobre la disminución del área de infarto (ventana temprana)

Nuestros resultados confirman que el modelo de PIR confiere cardioprotección ante una isquemia prolongada ya que se obtuvo un área de infarto del $37.5 \pm 9.8\%$ en el grupo PIR comparado con el $71.9 \pm 12.2\%$ en el grupo control, es decir una reducción de poco más del 50%. Estos valores están acordes a los encontrados por Brandenburger *et al.*, (2014). Ellos demostraron cardioprotección produciendo ciclos de I/R en miembros inferiores de ratas Wistar macho, obteniendo un área de infarto del $34.1 \pm 14\%$ para el grupo de PIR comparado con un $72.6 \pm 5\%$ del grupo control. Heinen *et al.*, (2011) también obtuvieron resultados similares en la disminución del área del infarto en un modelo de PIR en ratas Wistar adultas, obteniendo $54 \pm 15\%$ de área infartada para el grupo PIR y para el grupo control el $76 \pm 14\%$.

En el modelo utilizado en esta tesis se usó el isoflurano como anestésico general. Existen trabajos en los que se menciona que el isoflurano por si solo tiene efectos cardioprotectores (Tritapepe *et al.*, 2007) sin embargo Mila, (2007) demostró el efecto cardioprotector en rata Wistar solamente cuando son sometidas a breves periodos del agente anestésico (Mila, 2007). Behmenburg *et al.*, (2018), utilizando ratas Wistar, compararon la cardioprotección que produce el PIR utilizando diferentes agentes anestésicos incluido el sevoflorano, un anestésico inhalado de la familia de los halogenados y de la cual el isoflurano es un integrante. Con el sevoflorano ellos obtuvieron un área de infarto del $31 \pm 6\%$ en el grupo de PIR, comparado con un $61 \pm 8\%$ del grupo control. Además en ese mismo trabajo no encontraron diferencias significativas en la medición del área de infarto entre los grupo control ya sea utilizando el sevoflorano, el pentobarbital sódico o el Propofol. Como dato interesante, Behmenburg y colaboradores (2018) demostraron que el Propofol inhibe la cardioprotección proporcionada por el PIR.

9.2 Efectos de PIR Tardío sobre la cardioprotección

Nosotros también confirmamos la presencia de cardioprotección durante la ventana tardía del PIR. El área de infarto fue de un $24.23\% \pm 7.26\%$ para el grupo PIR tardío comparado con el $53.50\% \pm 10.36\%$ del grupo control. Así, nuestros resultados son similares a lo encontrado en trabajos previos. Zhou *et al.*, (2014) demostraron una reducción del área de infarto en un modelo de PIR en la ventana tardía dando periodos de 5 min de isquemia seguidos de 5 min de reperfusión en los miembros inferiores de una rata Sprague- Dawley. El corazón del animal se extrajo 24 horas después, y en un sistema Langendorff produjeron isquemia durante 35 minutos, seguidos de 120 minutos de reperfusión. Ellos obtuvieron un área de infarto del $10.2\% \pm 2.6\%$ en el grupo de preconditionamiento remoto tardío comparado con un $35\% \pm 5.2\%$ en el grupo control. Rohailla *et al.*, (2014) en un modelo de PIR tardío similar al de Zhou *et al.* (2014) encontraron $36.6 \pm 5.1\%$ de área infartada con el PIR tardío y $58.6 \pm 5\%$ en el control. Cabe señalar que nuestro modelo es en animal completo donde se pueden liberar una gran variedad de ligandos los cuales activan muchas vías de señalización por lo que consideramos es un modelo más completo que en corazón aislado.

9.3 Efectos de PIR temprano y tardío sobre las corrientes de Ca^{2+}

Nuestros resultados muestran por primera vez los cambios en los canales Cav1.2 durante la protección cardiaca durante la ventana temprana en un modelo de PIR. Se encontró una disminución significativa de la amplitud de las corrientes de calcio en $\sim 30\%$ en el grupo PIR comparado con el grupo control. El único antecedente es en un modelo de PF en donde fueron se obtuvieron resultados similares (González *et al.*, 2010).

Los efectos del PIR sobre las corrientes se vieron revertidos después de tres horas del estímulo preconditionante. Después de ese tiempo no se encontraron diferencias significativas en las corrientes de calcio entre el grupo PIR y el grupo control. Este

resultado concuerda con los resultados de González *et al* (2010) donde después de un acondicionamiento farmacológico, utilizando diazóxido por 90 minutos, las corrientes de Ca^{2+} tipo L mostraban una clara disminución y ese efecto se revirtió con un lavado de 60 minutos. Los registros de las corrientes de Ca^{2+} realizados en el PIR tardío no mostraron diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo que es en la cardioprotección temprana en donde los canales de Ca^{2+} pudiesen desempeñar un papel relevante pero no en la cardioprotección tardía.

9.4 Los transitorios de Ca^{2+} en el PIR

Habiendo encontrado una disminución en las corrientes de Ca^{2+} durante el PIR temprano, era probable que como consecuencia hubiera una disminución en la liberación de Ca^{2+} del RS en respuesta a un potencial de acción. Sin embargo, los transitorios de Ca^{2+} no mostraron cambios significativos entre el grupo control y el del PIR. Una posibilidad para explicarlo es que debido a que los cambios en las corrientes de Ca^{2+} son evidentes sólo en la ventana temprana, los efectos del PIR en los transitorios de Ca^{2+} se vean disminuidos por el tiempo transcurrido durante el proceso de disociación de los miocitos, la incubación con el indicador fluorescente y el tiempo que debe pasar para que el indicador esté en la forma ácida, y así poder iniciar los registros del calcio intracelular, cayendo en el periodo interventana donde se ha demostrado no existe ya la cardioprotección (Moreno & Portillo, 2016). Trabajos realizados en el laboratorio en acondicionamiento farmacológico con diazóxido han demostrado una disminución en la amplitud de estos transitorios como resultado de la disminución en la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} , sin embargo, en esos experimentos el acondicionamiento se obtuvo por incubación de los miocitos con un fármaco lo cual permitía que los registros de las señales de Ca^{2+} fueran realizadas en tiempos mucho más breves (González *et al.*, 2010).

9.5 El PIR y los efectos sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1c$.

Nuestros resultados muestran que la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ en extractos totales de cardiomiocitos de animales sometidos a PIR muestra una regulación a la baja comparada con miocitos cardiacos control en un porcentaje similar a los resultados de González *et al* (2010). En su tesis de doctorado González (2011) describió que esos efectos se revertían también después de una incubación con solución Krebs-Henseleit, es decir el efecto es temprano y transitorio. Todo esto parece indicar que el efecto protector de la disminución de las corrientes de Ca^{2+} se debe a una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ transitoria, y que es común para diferentes formas de preconditionamiento.

9.6 Efectos del PIR sobre la contractilidad de los cardiomiocitos en la ventana temprana de cardioprotección.

La disminución de la expresión del canal de Ca^{2+} , y la consecuente disminución de las corrientes, nos harían suponer que habría una pérdida de la función contráctil (acople excitación-contracción) sin embargo, nuestros resultados muestran que los efectos sobre la contracción isotónica en las células sometidas a condiciones PIR con respecto al control no muestran diferencias significativas. Esto puede deberse a múltiples factores, por ejemplo, cambios en la ganancia entre la corriente de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} (Altamirano & Bers, 2007), cambios en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} por moduladores de la fosforilación como PKC; PKG; CAMKII. (Lezcano, 2015) etc., y que requieren una futura investigación.

9.7 Efectos de PIR tardío sobre la contractilidad de los cardiomiocitos.

El flujo coronario se produce durante la relajación muscular o diástole, período en el cual el corazón puede tener ese intercambio de oxígeno y nutrientes. Se sabe que la

sístole o contracción del miocardio ocupa menos tiempo que la diástole (Guyton & Hall, 2011) por lo que una alteración en estos tiempos puede llevar al miocardio a adaptaciones metabólicas extremas.

En nuestro modelo se observó una tendencia a la reducción en la amplitud del acortamiento de los cardiomiocitos durante el PIR y un tiempo al pico de la contracción más breve en los cardiomiocitos de animales preconicionados donde tuvo un promedio de duración de 187 ± 6 ms que representa un 33% de disminución con respecto a los controles. El período de relajación también fue más prolongado, con 774 ± 6 ms de duración en promedio, que representa un 14% más prolongado comparado con el grupo control.

Un aumento en el tiempo de relajación o diástole promueve un mejor aporte sanguíneo al miocardio y por ende una mejor nutrición y mejor remoción de metabolitos tóxicos, la homeostasis iónica, . Los cambios en ambos períodos, de contracción y de relajación podrían deberse a cambios en el manejo del Ca^{2+} por el RyR (Gonzalez, 2007) y/o por la SERCA, entre otras cosas. Se requeriría un análisis más detallado del manejo del Ca^{2+} intracelular, así como otros estudios posteriores para conocer las causas de dichas modificaciones.

10. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos concluir que:

- El modelo de Precondicionamiento Isquémico Remoto implementado en nuestro laboratorio confiere cardioprotección tanto en la fase temprana como en la tardía.
- Se produce una clara disminución de las corrientes de Ca^{2+} en la ventana temprana de cardioprotección en el PIR
- No se encontraron cambios significativos en los transitorios de Ca^{2+} después de aproximadamente tres horas de haber producido el PIR
- Hay una regulación a la baja del canal de Ca^{2+} tipo L en la ventana temprana de cardioprotección del PIR
- El PIR no produjo cambios en la contractilidad del cardiomiocito en la ventana temprana de cardioprotección.
- El PIR Tardío produjo un acortamiento del tiempo de contracción y una prolongación del período de relajación

Finalmente, en este trabajo se demostró que las corrientes de Ca^{2+} disminuyen con el precondicionamiento isquémico remoto (PIR), a semejanza de lo que se encontraron González et al (2010) en el precondicionamiento farmacológico (PF). Ellos demostraron que dicha disminución es un elemento fundamental en la protección que confiere el PF, por lo tanto, en el caso del PIR la disminución de las corrientes de Ca^{2+} que encontramos podría sugerir su participación en la protección del miocardio en la ventana temprana del precondicionamiento remoto, probablemente no así en la ventana tardía donde parece que otros factores serían responsables de la cardioprotección

11. PERSPECTIVAS

- Analizar el posible papel de las ROS en los cambios encontrados con el PIR, en particular en la expresión de la subunidad Cav1.2 del canal de calcio. Para tal efecto puede medirse la producción de ROS mediante técnicas ópticas, así como utilizarse atrapadores de ROS, como el NAC.
- Analizar el manejo del calcio intracelular en el PIR tanto en la fase temprana como en la tardía. Estudiar los posibles cambios en los RyR y en la bomba SERCA, tanto en su abundancia, mediante técnicas de Western blot, como en su actividad, con otras técnicas bioquímicas.
- El modelo de PIR puede ser aplicado en animales hipertensos, obesos, o con diabetes, en los cuales hay una mayor propensión a patologías cardíacas y analizar su eficacia en esas condiciones.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular María. *Iatreia*, 23(2), 166–177.
- Altamirano, J., & Bers, D. M. (2007). Voltage dependence of cardiac excitation-contraction coupling: Unitary Ca²⁺ current amplitude and open channel probability. *Circulation Research*, 101(6), 590–597. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152322>
- Arroyo-Martínez, E. A., Meaney, A., Gutiérrez-Salmeán, G., Rivera-Capello, J. M., González-Coronado, V., Alcocer-Chauvet, A., ... Meaney, E. (2016). Is local nitric oxide availability responsible for myocardial salvage after remote preconditioning? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 107(2), 154–162. <https://doi.org/10.5935/abc.20160100>
- Bae, H., Taeho, K., & Lim, I. (2019). Effects of nitric oxide on apoptosis and voltage-gated calcium channels in human cardiac myofibroblasts. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, (September), 1–11. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13178>
- Becker., F., & Mobert., J. (1999). Low-dose calcium antagonists reduce energy demand and cellular damage of isolated hearts during both ischemia and reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 360(3), 287–294. Retrieved from http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29480919%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1007/s002109900053%5Cnhttp://sfx.ub.rug.nl:9003/sfx_local?sid=EMBASE&issn=00281298&id=doi:10.1007/s002109900053&atitle=Low-dose+calcium+antagonists+
- Behmenburg, F., Van Caster, P., Bunte, S., Brandenburger, T., Heinen, A., Hollmann, M. W., & Huhn, R. (2018). Impact of anesthetic regimen on remote ischemic preconditioning in the rat heart in vivo. *Anesthesia and Analgesia*, 126(4), 1377–1380. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002563>
- Bell, R. M., Bøtker, H. E., Carr, R. D., Davidson, S. M., Downey, J. M., Dutka, D. P.,

- ... Yellon, D. M. (2016). 9th Hatter Biannual Meeting: position document on ischaemia/reperfusion injury, conditioning and the ten commandments of cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 111(4). <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0558-1>
- Bers, D. M. (2013). Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 415(January), 379–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00221-8>
- Bers, Donald M., & Guo, T. (2005). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047, 86–98. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.008>
- Besse, S., Le, C., Rozenberg, S., & Riou, B. (2004). Cardioprotection with cariporide , a sodium-proton exchanger inhibitor , after prolonged ischemia and reperfusion in senescent rats. *Experimental Gerontology*, 39, 1307–1314. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.06.006>
- Bodi, I., Akhter, S. A., Schwartz, A., Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., ... Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart : the beat goes on Find the latest version : The L-type calcium channel in the heart : the beat goes on. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3306–3317. <https://doi.org/10.1172/JCI27167.3306>
- Bolli, R. (2000). The late phase of preconditioning. *Circulation Research*, 87(11), 972–983. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.11.972>
- Brandenburger, T., Huhn, R., Galas, A., Pannen, B. H., Keitel, V., Barthel, F., ... Heinen, A. (2014). Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0228-8>
- Chen, Y., Ba, L., Huang, W., Liu, Y., Pan, H., Mingyao, E., ... Cao, Y. (2017). Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 796, 90–100.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.053>

- Cho, Y. J., Nam, K., Kim, T. K., Choi, S. W., Kim, S. J., Hausenloy, D. J., & Jeon, Y. (2019). Sevoflurane, propofol and carvedilol block myocardial protection by limb remote ischemic preconditioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020269>
- Cohen, V., M; Downey, J., M. (2000). Precondicionamiento isquemico: de los mecanismos basicos a las aplicaciones clinicas. *Revista Argentina De Cardiologia*, 68(2), 285–299. Retrieved from <http://www.sac.org.ar/wp-content/uploads/2014/04/1296.pdf>
- Costa, A. D. T., & Garlid, K. D. (2008). Intramitochondrial signaling: Interactions among mitoKATP, PKC ϵ , ROS, and MPT. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 295(2), 874–882. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01189.2007>
- De Micheli, A. (2000). La terapéutica metabólica con glucosa-insulina-potasio. Bosquejo histórico. *Archivos Del Instituto de Cardiologia de Mexico*, 70(6), 609–615.
- Dickson, E. W., Porcaro, W. A., Fenton, R. A., Heard, S. O., Reinhardt, C. P., Renzi, F. P., & Przyklenk, K. (2000). “Preconditioning at a distance” in the isolated rabbit heart. *Academic Emergency Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2000.tb02228.x>
- Dickson, E. W., Reinhardt, C. P., Renzi, F. P., Becker, R. C., Porcaro, W. A., & Heard, S. O. (1999). Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: Preliminary evidence. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 8(2), 123–129. <https://doi.org/10.1023/A:1008911101951>
- Donato, M., Evelson, P., & Gelpi, R. J. (2017). Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: An update on remote ischemic preconditioning and postconditioning. *Current Opinion in Cardiology*, 32(6), 784–790. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000447>

- Donato, M., Goyeneche, M. A., Garces, M., Marchini, T., Pérez, V., del Mauro, J., ... Gelpi, R. J. (2016). Myocardial triggers involved in activation of remote ischaemic preconditioning. *Experimental Physiology*, *101*(6), 708–716. <https://doi.org/10.1113/EP085535>
- Downey, J. M. (2019). *Measuring infarct size by the tetrazolium method* (pp. 1–10). pp. 1–10.
- Feissner, R., F. Skalska, J. Gaum, W., E. Sheu, S. (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *National Institutes of Health*, *27*(4), 1–19. <https://doi.org/10.1037/a0032811>.Child
- Férez, S. M., Márquez, M. F., & Peña, M. A. (2004). Daño miocárdico por reperfusión. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, *57*(Supl 1), 9–21.
- García-dorado, D., Ruiz-meana, M. (2009). Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión : nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología*, *62*(2), 199–209.
- García-Dorado, D., Inserte, J., Ruiz-Meana, M., González, M. A., Solares, J., Juliá, M., ... Soler-Soler, J. (1997). Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.10.3579>
- García-Dorado, D., Thérour, P., Duran, J. M., Solares, J., Alonso, J., Sanz, E., ... Esteban, E. (1992). Selective inhibition of the contractile apparatus: A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*, *85*(3), 1160–1174. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.3.1160>
- García-rivas, G. D. J. (2006). Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección. *Revista de Educación Bioquímica*, *25*(1), 20–25.
- Gonzalez, D. R., Beigi, F., Treuer, A. V., & Hare, J. M. (2007). Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 104(51), 20612–20617.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706796104>

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 Journal of Pharmacology*, 161(5), 1172–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00960.x>

González, S. G. (2011). “Regulación del canal Ca^v1.2 del corazón de la rata en un modelo de acondicionamiento.” (Tesis de doctorado) *CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL*, México 1–87.

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, 6, 260–271.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>

Grau, M., Kollikowski, A., & Bloch, W. (2016). Remote ischemia preconditioning increases red blood cell deformability through red blood cell-nitric oxide synthase activation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 63(3), 185–197.
<https://doi.org/10.3233/CH-152039>

Gres, P., Schulz, R., Jansen, J., Umschlag, C., & Heusch, G. (2002). Involvement of endogenous prostaglandins in ischemic preconditioning in pigs. *Cardiovascular Research*, 55(3), 626–632. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00505-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00505-3)

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Músculo cardíaco: el corazón como bomba y la función de las válvulas cardíacas. *Tratado de Fisiología Médica*, 101–113. Retrieved from <http://ual.dyndns.org/biblioteca/fisiologia/Pdf/Unidad03.pdf> <http://uccuyosl.edu.ar/facultades/wp-content/uploads/2017/05/Unidad-3-corazon-texto.pdf>

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). *Pfl*Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). *Pfl*tigers *Archiv Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*, 85–100. *tigers Archiv*

Improved Patch-Clamp Tech. 85–100.

- Heinen, N. M., Pütz, V. E., Görgens, J. I., Huhn, R., Grüber, Y., Barthuber, C., ... Bauer, I. (2011). Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock*, *36*(1), 45–53. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31821d8e77>
- Heusch, G. (2015a). Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation Research*, *116*(4), 674–699. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
- Heusch, G. (2015b). Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation Research*, Vol. 116. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
- Heusch, G., & Gersh, B. J. (2017). The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge. *European Heart Journal*, *38*(11), 774–784. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw224>
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., & Wegener, J. W. (2014). L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiological Reviews*, *94*(1), 303–326. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2013>
- Holmuhamedov, E. L., Wang, L., & Terzic, A. (1999). ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *Journal of Physiology*, *519*(2), 347–360. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0347m.x>
- Hool, L. C., & Corry, B. (2007). Redox control of calcium channels: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, *9*(4), 409–435. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.1446>
- Houde, M., Desbiens, L., & D'Orléans-Juste, P. (2016). Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Advances in Pharmacology*, *77*, 143–175. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.05.002>
- Hu, Q., Luo, W., Huang, L., Huang, R., & Chen, R. (2016). Apoptosis-related microRNA changes in the right atrium induced by remote ischemic

- perconditioning during valve replacement surgery. *Scientific Reports*, 6(February 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep18959>
- INEGI. (2017). “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA DE MUERTOS” (2 DE NOVIEMBRE) DATOS NACIONALES? *COMUNICACION SOCIAL*. <https://doi.org/1>
- Isenberg, G., & Klockner, U. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB medium.” *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 395(1), 6–18. <https://doi.org/10.1007/BF00584963>
- Kanoria, S., Jalan, R., Seifalian, A. M., Williams, R., & Davidson, B. R. (2007). Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: A novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation*, 84(4), 445–458. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000228235.55419.e8>
- Kaur, H., Parikh, V., Sharma, A., & Singh, M. (1997). Effect of amiloride a Na⁺/H⁺ exchange inhibitor on cardioprotective effect of ischaemic preconditioning: Possible involvement of resident cardiac mast cells. *Pharmacological Research*, 36(2), 95–102. <https://doi.org/10.1006/phrs.1997.0174>
- Keef, K., D; Hume, J., R, and Zhong, j. (2001). Regulation of cardiac and smooth muscle Ca²⁺ channels (CaV1.2a,b) by protein kinases KATHLEEN. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(3), 377. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.10.021>
- Kiss, A., Tratsiakovich, Y., Gonon, A. T., Fedotovskaya, O., Lanner, J. T., Andersson, D. C., ... Pernow, J. (2014). The role of arginase and Rho kinase in cardioprotection from remote ischemic perconditioning in non-diabetic and diabetic rat in vivo. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104731>
- Lanna E., Pelluci, F. (2010). Los roles de digoxina en pacientes con insuficiencia cardíaca Una revisión. *INSUFICIENCIA CARDIACA*, 5(Vol 5), 65–71.
- Le Page, S., & Prunier, F. (2015). Remote ischemic conditioning: Current clinical perspectives. *Journal of Cardiology*, 66(2), 91–96.

<https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.01.009>

- Lezcano, N. (2015). Nuevos moduladores involucrados en la fosforilación, de proteínas que regulan la contractilidad miocárdica: proteínas Epac. (Tesis Doctorado) *Universidad Nacional de la Plata*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.35537/10915/44608>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2007). Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular Research*, 73(4), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.11.005>
- Manchurov, V., Ryazankina, N., Khmara, T., Skrypnik, D., Reztsov, R., Vasilieva, E., & Shpektor, A. (2014). Remote ischemic preconditioning and endothelial function in patients with acute myocardial infarction and primary PCI. *American Journal of Medicine*, 127(7), 670–673. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.02.012>
- Mastitskaya, S., Basalay, M., Hosford, P. S., Ramage, A. G., Gourine, A., & Gourine, A. V. (2016). Identifying the source of a humoral factor of remote (pre)conditioning cardioprotection. *PLoS ONE*, 11(2), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150108>
- McHugh, D., Sharp, E. M., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2000). Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12334–12338.
<https://doi.org/10.1073/pnas.210384297>
- Méry, P. F., Lohmann, S. M., Walter, U., & Fischmeister, R. (1991). Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(4), 1197–1201. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.4.1197>

- Mila, R. (2007). Comparación del efecto cardioprotector del preacondicionamiento farmacológico con anestésicos halogenados: sevoflurano versus isoflurano in vivo. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 22(2).
- Miyawaki, H., & Ashraf, M. (1997). Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.6.790>
- Molleman, A. (2003). Whole-Cell Protocols and Data Analysis. In *Patch Clamping* (pp. 115–139). <https://doi.org/10.1002/0470856521.ch5>
- Moreno, P. R., & del Portillo, J. H. (2017). Isquemia miocárdica: conceptos básicos, diagnóstico e implicaciones clínicas. Tercera parte. *Revista Colombiana de Cardiología*, 24(1), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2016.02.005>
- Moreno, P. R., & Portillo, y J. H. del. (2016). *Revista Colombiana de Cardiología*. 23(6), 500–507.
- Moreu-Burgos, J., & Macaya-Miguel, C. (2007). Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 7(4), 19D-25D. [https://doi.org/10.1016/s1131-3587\(07\)75772-2](https://doi.org/10.1016/s1131-3587(07)75772-2)
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3769170>
- Nakamura, Y., Miura, T., Nakano, A., Ichikawa, Y., Yano, T., Kobayashi, H., ... Shimamoto, K. (2004). Role of microtubules in ischemic preconditioning against myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 64(2), 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.07.013>
- Node, K., Kitakaze, M., Sato, H., Minamino, T., Komamura, K., Shinozaki, Y., ... Hori, M. (1997). Role of intracellular Ca²⁺ in activation of protein kinase C during ischemic preconditioning. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.4.1257>
- Oba, T., Yasukawa, H., Nagata, T., Kyogoku, S., Minami, T., Nishihara, M., ...

- Imaizumi, T. (2015). Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning. *Circulation Journal*, 79(7), 1557–1567. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-1171>
- OMS. (2018). Las 10 principales causas de defunción - World Health Organization. In 24 mayo 2018. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Oxman, T., Arad, M., Klein, R., Avazov, N., & Rabinowitz, B. (1997). Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 273(4 42-4), 1707–1712.
- Parra, V. M. M. (2016). *Estudio del mecanismo del preconditionamiento del miocardio inducido por ejercicio en el perro . Participación del canal de potasio mitocondrial sensible a ATP , Ión calcio y NADPH oxidasa.*(Tesis Doctorado) *Universidad de Barcelona*
- Paterek, A., & Mackiewicz, U. (2016). The effect of pacing frequency on the amplitude and time-course of cardiomyocyte shortening in isolated rat cardiomyocytes. *Postępy Nauk Medycznych*, 48(22), 9–14. <https://doi.org/10.5604/08606196.1226986>
- Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., & Whittaker, P. (1993). Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3), 893–899. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680290>
- Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Zhao, X. L., Ladner, M. B., & Hosey, M. M. (1997). Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C- mediated phosphorylation of L-type calcium channels. *Biochemistry*, 36(31), 9605–9615. <https://doi.org/10.1021/bi970500d>
- Randhawa, P. K., & Jaggi, A. S. (2017). Opioids in Remote Ischemic Preconditioning-Induced Cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 22(2), 112–121. <https://doi.org/10.1177/1074248416660621>

- Ren, X., Anne, E., Thomas, L. Lych IV., Harr, L. M., Faryal, Lui³, Tranter³, Ren³, Xie², ... Keith, W. (2018). Cardioprotection via the skin; Nociceptor-Induced Conditioning Against Cardiac MI, in 2 the NIC of time. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory*, (708).
- Rohailla, S., Clarizia, N., Sourour, M., Sourour, W., Gelber, N., Wei, C., ... Redington, A. N. (2014). Acute, delayed and chronic remote ischemic conditioning is associated with downregulation of mTOR and enhanced autophagy signaling. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111291>
- Rosenberg, J. H., Werner, J. H., Moulton, M. J., & Agrawal, D. K. (2018). Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 11(4), 292–307. <https://doi.org/10.1007/s12265-018-9813-1>
- Rossello, X., & Yellon, D. M. (2018). The RISK pathway and beyond. *Basic Research in Cardiology*, 113(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0662-x>
- Ruiz-meana, M., Inserte, J., Garcia-dorado, D., & Rodri, A. (2014a). *´n contra el dan ´rdico por isquemia-reperfusio ´n ~ o mioca Proteccio ´ctica ch ´nica en la pra.* 67(x), 394–404.
- Ruiz-meana, M., Inserte, J., Garcia-dorado, D., & Rodri, A. (2014b). Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en la práctica clínica. *Revista Española de Cardiología*, 67(x), 394–404.
- Salie, R., Moolman, J. A., & Lochner, A. (2012). The mechanism of beta-adrenergic preconditioning: Roles for adenosine and ROS during triggering and mediation. *Basic Research in Cardiology*, 107(5). <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0281-5>
- Sasaki, N., Sato, T., Ohler, A., O'Rourke, B., & Marbán, E. (2000). Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*, 101(4), 439–445. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.4.439>
- Schoemaker, R. G., & van Heijningen, C. L. (2017). Bradykinin mediates cardiac

preconditioning at a distance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 278(5).
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.5.h1571>

Schulz, R., Gres, P., Skyschally, A., Duschin, A., Belosjorow, S., Konietzka, I., & Heusch, G. (2003). Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1355–1357. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0975fje>

Sicard, P., Clark, J. E., Jacquet, S., Mohammadi, S., Arthur, J. S. C., O'Keefe, S. J., & Marber, M. S. (2010). The activation of p38alpha, and not p38beta, mitogen-activated protein kinase is required for ischemic preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6), 1324–1328. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.02.013>

Simonovic, N., Jakovljevic, V., Jeremic, J., FINDERLE, Z., SREJOVIC, I., NIKOLIC TURNIC, T., ... ZIVKOVIC, V. (2019). Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 450(1–2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3384-y>

Sociedad Española de Anestesia (S.E.A.) animalario. (2005). Anestesia en Roedores. *Servicio de Anestesiología Hospital Clínico de La Universidad Complutense*, 4.

SODI-PALLARES, D., BISTENI, A., MEDRANO, G. A., TESTELLI, M. R., & DE MICHELI, A. (1963). The polarizing treatment of acute myocardial infarction. Possibility of its use in other cardiovascular conditions. *Diseases of the Chest*, 43(4), 424–432. <https://doi.org/10.1378/chest.43.4.424>

Spedding, M., & Paoletti, R. (1994). III. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacological Reviews*, 46(2), 119–120.

Stein, A. B., Tang, X. L., Guo, Y., Xuan, Y. T., Dawn, B., & Bolli, R. (2004). Delayed adaptation of the heart to stress: Late preconditioning. *Stroke*, 35(11 SUPPL. 1),

2676–2679. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143220.21382.fd>

Tang, H., Viola, H. M., Filipovska, A., & Hool, L. C. (2011). Ca v1.2 calcium channel is glutathionylated during oxidative stress in guinea pig and ischemic human heart. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(8), 1501–1511. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.005>

Tritapepe, L., Landoni, G., Guarracino, F., Pompei, F., Crivellari, M., Maselli, D., ... Zangrillo, A. (2007). Cardiac protection by volatile anaesthetics: A multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *European Journal of Anaesthesiology*, *24*(4), 323–331. <https://doi.org/10.1017/S0265021506001931>

Tsibulnikov, S. Y., Maslov, L. N., Gorbunov, A. S., Voronkov, N. S., Boshchenko, A. A., Popov, S. V., ... Downey, J. M. (2019). A Review of Humoral Factors in Remote Preconditioning of the Heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, *24*(5), 403–421. <https://doi.org/10.1177/1074248419841632>

Vandael, D. H. F., Mahapatra, S., Calorio, C., Marcantoni, A., & Carbone, E. (2013). Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: Emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1828*(7), 1608–1618. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.013>

Vicencio, J. M., Yellon, D. M., Sivaraman, V., Das, D., Boi-Doku, C., Arjun, S., ... Davidson, S. M. (2015). Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*, *65*(15), 1525–1536. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.02.026>

Wang, N., Vuyst, E. De, Ponsaerts, R., Boengler, K., Palacios-prado, N., Lai, C. P., ... Leybaert, L. (2013). Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *National Institutes of Health*, *108*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0309-x>. Selective

Wang, Y. G., Wagner, M. B., Joyner, R. W., & Kumar, R. (2000). cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit

atrial cells. *Cardiovascular Research*, 48(2), 310–322.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00178-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00178-4)

Wang, Y. P., Maeta, H., Mizoguchi, K., Suzuki, T., Yamashita, Y., & Oe, M. (2002). Intestinal ischemia preconditions myocardium: Role of protein kinase C and mitochondrial KATP channel. *Cardiovascular Research*, 55(3), 576–582.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00245-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00245-6)

Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P. Y., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., ... Li, C. J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1650–1667.
<https://doi.org/10.1159/000489241>

Yang, Q., He, G. W., Underwood, M. J., & Yu, C. M. (2016). Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: Perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *American Journal of Translational Research*, 8(2), 765–777.

Yellon, D. M., & Downey, J. M. (2003). Preconditioning the myocardium: From cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological Reviews*, 83(4), 1113–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2003>

YELLON, D. M., & DOWNEY, J. M. (2003). Preconditioning the Myocardium: From Cellular Physiology to Clinical Cardiology. *Physiological Reviews*, 83(4), 1113–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2003>

Yu, Y., Zhou, C. H., Yao, Y. T., & Li, L. H. (2017). Downregulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform 1 protects isolated hearts by sevoflurane postconditioning but not by delayed remote ischemic preconditioning in rats. *Chinese Medical Journal*, 130(18), 2226–2233. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.213967>

Zhao, C. Y., Greenstein, J. L., Winslow, R. L., & Johns, T. (2018). *network in cardiac L-type calcium channel regulation*. (Mechanism 2), 29–44.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.013.Mechanisms>

Zhou, C., Li, H., Yao, Y., & Li, L. (2014). Delayed remote ischemic preconditioning

produces an additive cardioprotection to sevoflurane postconditioning through an enhanced heme oxygenase 1 level partly via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 19(6), 558–566. <https://doi.org/10.1177/1074248414524479>

Zimmerman ANA., H. W. (1966). © 1966 Nature Publishing Group. *Nature*, 211, 646–647.

Ziolo, M.T., Kohor, M. J., W. H. (2008). Nitric Oxide Signaling and the Regulation of Myocardial Function. *National Institutes of Health*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.07.015>.

Zuo, G., Ren, X., Qian, X., Ye, P., Luo, J., Gao, X., ... Chen, S. (2019). Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2), 1925–1936. <https://doi.org/10.1002/jcp.27070>