

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Análisis electrofisiológico del canal Orai de  
cardiomiocitos en el Precondicionamiento  
Farmacológico”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M en C. Raúl Sampieri Cabrera**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de la tesis:

**Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez**

**Ciudad de México**

**Febrero 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN** por brindarme las instalaciones y soporte institucional para el desarrollo del proyecto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo otorgado a través del programa de becas nacionales en el nivel de doctorado.

A mi director de tesis el **Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez** por sus enseñanzas, mentoría y apoyo académico, sin él no hubiera sido posible este proyecto.

A la **Dra. María del Carmen García García**, por todas las horas de discusiones, enseñanzas y su calidez humana.

A los miembros del comité tutorial:

**Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo, Dr. Pablo Muriel de la Torre, Dr. Benjamín Florán Garduño.**

Por sus comentarios, enseñanzas, consejos y sugerencias para enriquecer este proyecto.

Al apoyo académico y colaboración de la **QFB. Ascención Hernández**, por sus horas de trabajo dedicadas a hacer posible este proyecto.

A la colaboración experimental de la **Dra. Elba Carrillo** quien aportó resultados clave para el trabajo.

Al apoyo técnico de la **QBP. Ivonne Lezama, Sr. Oscar Ramírez y Sr. Sergio**, quienes son los responsables de mantener el laboratorio en condiciones adecuadas para realizar los experimentos.

A mis compañeros del laboratorio:

**Joice Thomas Gavali, Wilibaldo Orea, Rubén, Eridani, Maikel Clara, Erick, Andres, Eshwar y Gayathri**, quienes siempre demostraron compañerismo y profesionalismo, lo que propicia un buen ambiente de trabajo de laboratorio.

## ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS.....	5
2.	ABSTRACT.....	6
3.	RESUMEN .....	7
4.	INTRODUCCIÓN.....	7
5.	MARCO TEÓRICO .....	8
5.1	PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO CLÁSICO.....	10
5.2	PROTECCIÓN POR EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO .....	11
5.3	BIOLOGÍA DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO.....	14
5.4	EFACTORES FINALES DE LA CARDIOPROTECCIÓN POR PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO.....	14
5.5	METABOLISMO DEL ATP, LACTATO Y GLUCÓGENO.....	15
5.6	INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .....	16
5.7	CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE ATP .....	17
5.8	ENTRADA DE CALCIO OPERADA POR CISTERNA SOCE.....	19
5.9	REQUISITOS ESTEQUIOMÉTRICOS PARA LA ACTIVACIÓN DE ORAI .....	22
5.10	INACTIVACIÓN RÁPIDA DEPENDIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$ .....	22
5.11	INACTIVACIÓN LENTA DEPENDIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$ .....	23
5.12	MODULACIÓN REDOX DE STIM Y FUNCIÓN DE Orai .....	24
5.13	pH.....	25
5.14	EL PAPEL DE STIM1 Y SOCE EN LOS CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES .....	26
5.15	EL PAPEL DE STIM1 Y SOCE EN LA HIPERTROFIA CARDÍACA.....	28
6.	HIPÓTESIS.....	29
7.	OBJETIVO GENERAL.....	29
8.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
8.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	29
8.2	AISLAMIENTO DE MIOCITOS VENTRICULARES.....	29
8.2	MÉTODOS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	30
8.4	MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS .....	32
8.5	PPC EN CORAZONES AISLADOS.....	32
9	ANÁLISIS DE DATOS.....	32
10	RESULTADOS .....	33
10.1	LOS SOC EN LOS CARDIOMIOCITOS SON ACTIVADOS POR Tg.....	33
10.2	INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC.....	34
10.3	LA INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC DEPENDE DE LAS ROS .....	36

10.4	LA INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC DEPENDE DEL $Ca^{2+}$ INTRACELULAR.....	37
10.5	INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC A DIFERENTES POTENCIALES.....	39
10.6	INACTIVACIÓN DE LOS SOC DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$ Y DEL INTERCAMBIADOR DE SODIO-CALCIO (NCX) .....	40
10.7	INACTIVACIÓN DE LOS SOC DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$ EN CARDIOMIOCITOS PRECONDICIONADOS.....	42
10.8	RELACIONES I-V DE CORRIENTES SOC EN CARDIOMIOCITOS PRECONDICIONADOS CON MITOCONDRIAS ENERGIZADAS.....	45
11	DISCUSIÓN .....	47
11.1	EL PPC Y LOS SOC EN EL CORAZÓN ADULTO.....	47
11.2	LAS ROS Y LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES ORAI1.....	48
11.3	LAS MITOCONDRIAS JUEGAN UN PAPEL EN LA INACTIVACIÓN DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$ DE LOS CANALES ORAI1.....	49
11.4	IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA INHIBICIÓN DE LOS SOC INDUCIDA POR EL PPC .....	54
12.	CONCLUSIÓN.....	54
13.	PERSPECTIVAS.....	55
14.	REFERENCIAS.....	55
15.	ANEXOS .....	75
15.1	MEDICIÓN DE $[Ca^{2+}]$ CITOSÓLICO .....	75
15.2	INACTIVACIÓN DE LOS SOC EN CÉLULAS PRECONDICIONADAS .....	75
15.3	ARTÍCULO DERIVADO DE ESTE TRABAJO DE TESIS.....	77

## 1. ABREVIATURAS

<b>SOCE</b>	Entrada de calcio operada por cisterna
<b>SOC</b>	Canales de calcio operados por cisterna
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>BAPTA</b>	ácido tetraacético 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'
<b>STIM</b>	Proteína de interacción estromal
<b>PPC</b>	Precondicionamiento farmacológico
<b>RS</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>HEPES</b>	Ácido ethanesulfónico 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]
<b>Dzx</b>	Diazóxido
<b>Tg</b>	Thapsigargina
<b>NMG</b>	N-metil-D-glucamina
<b>Fura-2 AM</b>	Éster acetoximetílico fluorescente

## 2. ABSTRACT

Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOCs) are the major routes of  $\text{Ca}^{2+}$  entry into mammalian cells. It has been previously reported that pharmacological preconditioning (PPC) leads to a decrease in the amplitude of Cav1.2 channel currents in the heart. In this study, we examined the changes in SOC function induced by PPC. We measured adult cardiomyocyte membrane currents using the whole-cell patch-clamp technique. In addition, we evaluated reactive oxygen species (ROS) production using fluorescent probes. Diazoxide was used to induce PPC, and depletion of internal stores of  $\text{Ca}^{2+}$  was achieved using thapsigargin. Store depletion generated inward currents with strong rectification, which were suppressed by the SOC blocker GSK-7975-A. These currents were completely abolished by PPC, an effect that was largely prevented by 5-hydroxydecanoate, a selective mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel blocker, or an intracellular mitochondrial energizing solution. Buffering of ROS and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  with N-acetylcysteine and BAPTA-AM, respectively, also prevented the effects of PPC on SOC currents. These results indicate that influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through SOCs is inhibited by their ROS and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation during PPC and that downregulation of SOCs by PPC may play a role in cardioprotection following ischemia-reperfusion.

### 3. RESUMEN

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por cisterna (SOC) son las principales rutas de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de los mamíferos. Se ha descrito previamente que el preconditionamiento farmacológico (PPC) conduce a una disminución en la amplitud de las corrientes del canal Cav1.2 en el corazón. En este estudio, examinamos los cambios en la función los SOC inducidos por el PPC. Medimos las corrientes de membrana de cardiomiocitos adultos usando la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. Además, evaluamos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Utilizamos diazóxido para inducir el PPC, y la depleción de las reservas internas de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando thapsigargina (Tg). La depleción del retículo sarcoplásmico (RS) generó corrientes internas con una fuerte rectificación, que fueron suprimidas por el GSK-7975-A un bloqueador de los SOC. Estas corrientes fueron completamente abolidas por el PPC, un efecto que se evitó en gran medida por el 5-hidrodecanoato, un bloqueador selectivo de canales  $\text{K}^+$  sensible al ATP mitocondrial (mitoKATP) o una solución intracelular que tiene un efecto energizante mitocondrial. La amortiguación de las ROS y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con N-acetilcisteína (NAC) y BAPTA-AM, respectivamente, también anuló los efectos del PPC en las corrientes de los SOC. Nuestros resultados indican que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los SOC es inhibida por la inactivación dependiente de las ROS y el  $\text{Ca}^{2+}$  durante el PPC y que la regulación negativa de los SOC por el PPC puede desempeñar un papel en la cardioprotección después de la isquemia-reperfusión.

### 4. INTRODUCCIÓN

El daño severo al músculo cardíaco por isquemia y reperfusión está relacionado con la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperfusión (Murphy y Steenbergen 2008). La lesión puede mitigarse mediante el preconditionamiento isquémico, que se logra mediante el tratamiento previo con breves períodos de isquemia (Murry *et al.*, 1986) o mediante el preconditionamiento farmacológico (PPC) utilizando agentes como el diazóxido (Dzx), que abre los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP mitocondriales (mitoKATPs) (Garlid *et al.*, 1997; Pain *et al.*, 2000). Ambas formas de preconditionamiento (isquémico y farmacológico) se pueden suprimir bloqueando los canales mitoKATP (Ardehali y O'Rourke 2005; Halestrap *et al.*, 2007). Además

de los canales mitocondriales, los canales Cav1.2 juegan un papel en la PPC en los cardiomiocitos de ratas adultas (González *et al.*, 2010). El PPC conduce a una disminución en la amplitud de las corrientes del canal Cav1.2 y a una disminución en la elevación de la concentración mioplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a los potenciales de acción, lo que lleva a un daño menor después de la isquemia (González *et al.*, 2010). Sin embargo, los cambios inducidos por el PPC en las funciones de otros canales involucrados en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  permanecen en gran parte inexplorados.

En las células no excitables, una fuente principal de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es la familia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOC) operados por cisterna. Los SOC se denominan así porque responden a la disminución en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminal en el retículo endoplásmico. La molécula de interacción estromal (STIM) y las proteínas Orai se han identificado como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  y canales operados por la cisterna, respectivamente. Su función principal es reponer la concentración de calcio en las cisternas  $\text{Ca}^{2+}$  (Prakriya y Lewis 2015). En las células excitables, como los cardiomiocitos, la mayor parte del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Catterall 2011); sin embargo, también se ha descrito la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los SOC (Hunton *et al.*, 2004). El papel de los SOC en el corazón adulto no está bien definido. Estudios previos bloqueando a los SOC demostraron una mejoría en la recuperación funcional del músculo cardiaco posterior a un evento de la isquemia-reperfusión (Liu *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2013), lo que sugiere que los SOC pueden desempeñar un papel importante en la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 5. MARCO TEÓRICO

En 1986, Reimer estudió la contribución de la depleción de ATP en la génesis del daño miocárdico en un modelo experimental que implicaba la producción de una serie de breves episodios isquémicos porque suponía que con la realización de sucesivas isquemias observaría una disminución progresiva en el contenido de ATP. Contrariamente a la hipótesis, Reimer se encontró con el sorprendente resultado de que, si bien existía una disminución inicial del contenido de ATP durante el primer episodio isquémico, los episodios restantes no implicaban variación significativa en los niveles de ATP y que, por otra parte, en algunos de sus

animales no se observaba infarto (Reimer *et al.*, 1981). Estos hallazgos experimentales desafiaron el concepto de que sucesivos episodios de isquemia conducían al infarto como consecuencia de un "daño acumulativo" (Ninomiya *et al.*, 2004). Posteriormente Murry *et al.*, 1986, basándose en los resultados de Reimer, postuló que el mantenimiento de ATP en los experimentos anteriores podría deberse a que el miocito necesitaba menos energía como consecuencia del desarrollo de una rápida adaptación a la isquemia y comprobó esta hipótesis realizando una serie de 4 períodos de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de perfusión momentos previos al sometimiento del miocardio a una isquemia prolongada de 40 minutos de duración. Murry observó que estos breves períodos de isquemia y perfusión protegían del daño isquémico reduciendo en un 30% el tamaño del infarto; así nació el concepto de preconditionamiento (isquémico) (Murry *et al.*, 1986).

Este hallazgo fue el pionero para el desarrollo de líneas de experimentación encaminadas a estudiar los mecanismos que participan en el preconditionamiento cardíaco, éste ha sido descrito en una amplia variedad de modelos experimentales como, corazón aislado (Simkhovich *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 1996), animales anestesiados a tórax abierto (Baxter *et al.*, 1994; Schwartz *et al.*, 2001), animales conscientes (Müllenheim *et al.*, 2001) y cultivos de cardiomiocitos (Armstrong *et al.*, 1997) y en diferentes especies como perro, rata, conejo, ratón, cerdo, cobayo, oveja y humanos (Ghosh *et al.*, 2000; Arstall *et al.*, 1998).

Asimismo, el concepto de preconditionamiento se extendió a:

- 1) Consecuencias adversas de la isquemia diferentes al infarto, tales como arritmias, (Sakamoto *et al.*, 1999) apoptosis (Piot *et al.* 1997), disfunción endotelial (Dayton *et al.*, 2002) y disfunción contráctil postisquémica (Negroni *et al.*, 2002);
- 2) Estímulos protectores diferentes de la isquemia, por ejemplo, hipoxia (Cohen *et al.*, 1995), marcapaso cardíaco acelerado (Vegh *et al.*, 1991), estiramiento celular (*stretching*) (Ovize *et al.*, 1994) y varios agentes farmacológicos (Laghi *et al.*, 1997; Batthish *et al.*, 2002).

Originalmente se describió al preconditionamiento como una forma "inmediata" de adaptación a la isquemia, posteriormente se descubrió que respondía a las características de un fenómeno bifásico, con una primera fase (precondicionamiento clásico, temprano o primera ventana de protección) que se desarrolla pocos minutos después de los breves estímulos isquémicos y desaparece dentro de las 2 a 3 primeras horas (Van Winkle *et al.*, 1991; Murry *et al.*, 1991) y una segunda fase (Marber *et al.*, 1993) (precondicionamiento tardío o segunda ventana de protección) que comienza a desarrollarse dentro de las 12 a 24 horas siguientes al estímulo y que puede durar hasta 3 o 4 días (Marber *et al.*, 1993; Kuzuya *et al.*, 1993).

### **5.1 PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO CLÁSICO**

El preconditionamiento isquémico clásico o temprano ha sido intensamente estudiado para determinar las condiciones necesarias para su desarrollo y se sabe que:

1. En cuanto a la protección que brinda:

a) Protege contra el infarto;

b) Existe controversia respecto de sus propiedades para proteger contra las arritmias;

c) El desarrollo de la protección no guarda relación alguna con la presencia y la extensión del flujo colateral.

2. En lo que respecta a los límites temporales del fenómeno:

a) se debe sobrepasar un umbral para que se desarrolle la protección;

b) sus efectos son efímeros y no se extienden más allá de las 2 o 3 horas.

3. En cuanto a su particular biología:

a) se desarrolla en todas las especies animales en las que ha sido estudiado;

b) existen metabolitos gatilladores, mediadores y efectores finales responsables de su desarrollo;

c) es controvertida su existencia en miocardios patológicos (diabetes, hipertrofia);

## 5.2 PROTECCIÓN POR EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO

Aunque clásicamente el preconditionamiento fue estudiado en el contexto de la necrosis miocárdica (infarto), la isquemia y la reperfusión pueden ocasionar otras situaciones indeseables tales como la depresión de la función contráctil y la precipitación de episodios arrítmicos. Luego de la primera descripción de la protección contra el infarto (Murry *et al.*, 1986; Murry *et al.*, 1991; Kuzuya *et al.*, 1993) muchos autores encontraron que el preconditionamiento parecía proteger, en algunos modelos, contra la disminución de la fuerza contráctil (Mullenheim *et al.*, 2001; Lascano *et al.* 1999; Negroni *et al.*, 2002; Del Valle *et al.*, 2002) y las arritmias (Sakamoto *et al.*, 1999; Shiki *et al.*, 2001). Esto resultó de interés clínico debido a que las arritmias son la principal causa de mortalidad temprana en pacientes que sufren de infarto agudo (Bigger *et al.*, 1984) y porque la función contráctil residual es determinante del pronóstico a corto y mediano plazo de quienes logran sobrevivir (Poulsen *et al.*, 1997).

Debemos destacar que la protección contra el infarto ha sido constatada en todas las especies estudiadas hasta el momento y constituye el punto final de la protección por preconditionamiento. Los primeros trabajos en perros demostraron que el infarto disminuía con isquemias de 40 y 60 minutos, pero no protegía cuando el tiempo se extendía a 90 minutos (Murry *et al.*, 1986; Nao *et al.*, 1990). En estos experimentos aparecía evidencia de necrosis a los 20 minutos de isquemia en los corazones normales en tanto que en el miocardio de los animales protegidos la necrosis se observaba a los 40 minutos de isquemia; parece que el preconditionamiento ofrece un tiempo extra de 20 minutos. Posteriormente Lawson *et al.*, 1993 encontró una relación similar en conejos. De esta observación se desprende un concepto fundamental: el preconditionamiento protege contra el infarto "retardando" pero no "evitando" la muerte celular.

Respecto de la protección contra la disfunción contráctil postisquémica es interesante destacar que dos años antes del descubrimiento del preconditionamiento, Neely, *et al.*, 1984 comprobaron, en ratas, que la función contráctil mejoraba luego de una isquemia si previamente se realizaba un período

de hipoxia de 10 a 15 minutos. Asimakis, *et al.*, 1992 fueron los primeros en comprobar que, además de proteger contra el infarto, el preconditionamiento mejoraba la función contráctil postisquémica luego de someter al corazón a una isquemia global de 40 minutos. Estudios posteriores (Cohen *et al.*, 1991; Gelpi *et al.*, 2002; Mosca *et al.*, 1994) coincidieron en que el preconditionamiento en corazones aislados mejoraba algunos índices mecánicos, como la presión ventricular y el producto presión/frecuencia, aunque otros autores no encontraron resultados similares (Yang *et al.*, 1994; Jenkins *et al.*, 1995) en el mismo modelo experimental.

En contraste con estos resultados obtenidos en corazones aislados, existe un consenso generalizado acerca de que *in vivo* no existe protección contra la disminución de la función contráctil tal y como fuera demostrado en cerdos (Miyama *et al.*, 1993; Jahania *et al.*, 1999) en perros anestesiados (Ovize *et al.*, 1992) y en conejos conscientes (Bolli *et al.*, 2001). Estas diferencias en los resultados pueden deberse al método experimental, a la especie utilizada o al tiempo utilizado en el protocolo de isquemia. Este último punto parece ser de fundamental importancia, en general, los estudios de preconditionamiento han utilizado isquemias con duración superior a los 30 minutos, con lo cual existen áreas de necrosis con áreas de tejido viable y, por lo tanto, es posible postular que cuanto más extensa sea el área infartada menor será la posibilidad de recuperación funcional. Esto ha sido demostrado (Jenkins *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1993) y en consecuencia, muchos autores consideran que la recuperación contráctil luego del preconditionamiento es un efecto secundario propio de la capacidad del fenómeno de retardar la muerte celular. Las observaciones en ovinos conscientes contrasta con esta apreciación (Del Valle *et al.*, 2002; Del Valle *et al.*, 2000) y sugiere que el preconditionamiento sí protege contra la disminución de la función contráctil, y que ello es un efecto neto y primario del fenómeno y no una consecuencia secundaria a la disminución del infarto debido a que se utilizó una isquemia totalmente reversible de 12 minutos de duración. Es probable que las discrepancias mencionadas se deban a la utilización de tiempos de isquemia prolongados no compatibles con el estudio. La función contráctil debe ser estudiada pura y exclusivamente bajo condiciones de total

reversibilidad (Bolli *et al.*, 1999) y la mayor parte de los estudios han utilizado períodos que generan necrosis.

El análisis de los efectos del preconditionamiento sobre las arritmias inducidas por isquemia/reperfusión es más controvertido que la protección contra la disfunción contráctil. Shiki *et al.*, 2001 fueron los primeros en estudiar la capacidad antiarrítmica del preconditionamiento y determinaron su existencia, aun cuando los períodos utilizados resultaban arritmogénicos en sí mismos. Posteriormente, otros autores (Vegh *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 1993) coincidieron con estos resultados, por lo cual existe evidencia respecto de que el preconditionamiento, reduce la incidencia de extrasístoles, taquicardia y fibrilación ventricular en el modelo de rata. En perros los hallazgos son contradictorios; mientras que Vegh *et al.*, 1992 encontró una baja incidencia de taquicardia y fibrilación ventriculares durante la isquemia y la reperfusión, Pryzklenk y Kloner 1995 observaron que no variaba la incidencia de fibrilación ventricular ni la distribución temporal o el número de extrasístoles durante la reperfusión. En corazones aislados de ratones (Botsford *et al.*, 1998), conejos (Zhu *et al.*, 1998) y cobayos (Lascano *et al.*, 2001) así como en ovinos conscientes (Negroni *et al.*, 2002; Lascano *et al.*, 2001) se encontró protección antiarrítmica. Con los cerdos ocurre algo particularmente interesante; si bien algunos autores han señalado que existe cardioprotección contra las arritmias (Wainwright *et al.*, 1990; Figueras *et al.*, 1996), la mayor parte de los estudios coinciden en señalar que el preconditionamiento no sólo no protege sino que resulta incluso proarrítmico (aumenta la incidencia de arritmias, acelera el inicio de la fibrilación y disminuye el umbral fibrilatorio durante la isquemia prolongada) (Ovize *et al.*, 1995; Frund *et al.*, 1997). Un aspecto para destacar es que el efecto antiarrítmico del fenómeno no parece estar ligado a la capacidad de retardar la muerte celular, por cuanto el preconditionamiento no altera la relación entre la severidad de la arritmia y la duración de la isquemia precedente (Lawson *et al.*, 1993). Esto significa que el preconditionamiento realmente disminuye la incidencia y severidad del episodio arrítmico, pero no retrasa su producción.

Históricamente, todos los trabajos de investigación se abocaron a dilucidar los mecanismos por los cuales existía una protección endógena contra el infarto, las arritmias y la disminución contráctil. Sin embargo, Figueras, *et al.*, 1996 y Hata *et*

*al.*, 1998 describieron las propiedades antiapoptótica y antiagregante plaquetario del preconditionamiento que se suman así a una característica no demasiado explorada como lo es la capacidad de preservación de la función del endotelio vascular, descrita por primera vez por DeFily *et al.*, 1993.

### **5.3 BIOLOGÍA DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO**

¿Cómo es que un episodio de isquemia breve y reversible genera una serie de eventos celulares que hace al cardiomiocito más resistente a un subsecuente y más prolongado episodio isquémico?

Una amplia variedad de estudios ha evaluado y descartado la posibilidad de que el preconditionamiento fuese una simple protección resultante del mantenimiento del balance entre la oferta y la demanda de oxígeno durante el episodio isquémico prolongado. El preconditionamiento isquémico no depende ni del flujo colateral ni del grado de extensión de éste (Murry *et al.*, 1986; Przyklenk *et al.*, 1998).

Más bien, los estudios sobre preconditionamiento sugieren que en su desarrollo están involucrados fenómenos de unión ligando-receptor. En términos simples, la isquemia preconditionante genera la liberación de una sustancia (gatillador) que actúa sobre un receptor, el que a su vez desencadena una serie de eventos intracelulares (mediadores) que finalmente generan la síntesis o translocación de una proteína responsable de la protección (efector final). Sin embargo, la identificación definitiva del receptor, del efector final y en particular de las vías intermediarias demostró no ser sencilla, aunque como se han realizado considerables avances al respecto.

### **5.4 EFECTORES FINALES DE LA CARDIOPROTECCIÓN POR PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO**

Una vez descrito el preconditionamiento isquémico fueron postuladas, y sucesivamente descartadas, varias explicaciones probables, de manera que aún hoy, a pesar del grado de adelanto en el conocimiento del fenómeno, no se sabe con certeza qué es lo que preconditiona. La mayor parte de los autores coinciden en señalar que el efector final es el canal de potasio dependiente de ATP mitocondrial (mitoKATP). Sin embargo, otras alternativas, tales como los efectos

sobre el metabolismo del glucógeno y el balance energético, la participación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , la síntesis de proteínas protectoras, la acción de las *heat shock proteins* sobre el citoesqueleto y la *down regulation* del factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) podrían participar del efecto cardioprotector por preconditionamiento isquémico clásico.

### 5.5 METABOLISMO DEL ATP, LACTATO Y GLUCÓGENO

Los primeros trabajos demostraron que el preconditionamiento no sólo disminuía el tamaño del infarto, sino que además reducía la demanda energética, en términos de consumo de ATP (Murry *et al.*, 1990) y fosfato de creatina (Kida *et al.*, 1991), durante la isquemia prolongada. Esta observación fue realizada por primera vez por Murry (Murry *et al.*, 1990) en corazones de perro y fue confirmada en trabajos posteriores con cerdos (Mullenheim *et al.*, 2001) mediante técnicas de resonancia magnética nuclear. Sin embargo, algunos estudios realizados en miocardio de rata arrojaron resultados contradictorios en los que el preconditionamiento disminuía (Vourinen *et al.*, 1995), aumentaba (Kollocassides *et al.*, 1996) o no modificaba (Cave *et al.*, 1992) el contenido de metabolitos energéticos. Probablemente esto pueda deberse a diferencias entre especies o al protocolo de preconditionamiento utilizado. Sin embargo, debe destacarse que independientemente de los efectos del preconditionamiento sobre el consumo de ATP, la recuperación funcional siempre fue superior en los miocardios preconditionados respecto de los controles. Este dato sugiere que la preservación de los fosfatos de alta energía no es un prerrequisito para el logro de la cardioprotección por preconditionamiento isquémico.

El miocardio preconditionado también ha mostrado una menor acumulación de metabolitos isquémicos, tales como el lactato (Murry *et al.*, 1990; Kobara *et al.*, 1996), al mismo tiempo que los niveles de glucógeno se encuentran disminuidos. Tales modificaciones metabólicas fueron propuestas como mecanismo de cardioprotección (Wolfe *et al.*, 1993; McNulty *et al.*, 1996). Sin embargo, otros autores encontraron en distintas especies, que al disminuir el contenido de lactato no se obtenía protección durante la isquemia (Weinbrenner *et al.*, 1996; Schafer *et*

*al.*, 1995) y que era posible obtener protección sin depleción de glucógeno (Weinbrenner *et al.*, 1996).

Otros efectos, como la reducción de la acidificación intracelular y la disminución en el contenido de sodio y calcio, podrían intervenir en la protección contra el infarto por cuanto la activación de enzimas potencialmente deletéreas depende del pH y de la concentración intracelular de calcio (Schulz *et al.*, 2001; Steenbergen *et al.*, 1993).

Si bien es probable que estos efectos sobre el metabolismo y el balance energético contribuyan con la acción cardioprotectora del preconditionamiento, lo más probable es que sólo formen parte de un mecanismo de cooperación en el desarrollo de la protección (Yelon *et al.*, 1998).

### **5.6 INTERCAMBIADOR Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>**

Lazdunski *et al.*, 1985 publicaron la primera evidencia de la participación del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en el daño causado por la isquemia. Desde entonces una amplia variedad de fármacos inhibidores del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (HOE-694, Cariporide, EMD-85131) demostraron una capacidad cardioprotectora en diferentes modelos animales (Cave *et al.*, 1992). La acidosis intracelular es el estímulo más potente para la activación del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y el grado de acidosis que generan los episodios de isquemia que, a su vez, generan preconditionamiento, es suficiente para activarlo (Avkiran *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, es probable que el preconditionamiento inicie una serie de mecanismos de regulación postraduccional (fosforilación del intercambiador y/o de sus proteínas reguladoras) que incrementen la sensibilidad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> al H<sup>+</sup> (Avkiran *et al.*, 1999). En este sentido, se ha descrito que el preconditionamiento disminuye el grado de acidosis intracelular.

Independientemente de la influencia del preconditionamiento sobre la actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, no está del todo claro si su actividad es indispensable para el desarrollo de la cardioprotección. Varios estudios utilizaron diferentes fármacos para inhibir el intercambiador en diferentes tiempos experimentales: durante breves episodios de isquemia/reperfusión (Shipolini *et al.*, 1997; Przyklenk *et al.*, 1997), durante la isquemia prolongada (Shipolini *et al.*, 1997; Ramasamy *et al.*, 1995) o en

ambos tiempos (Bugge *et al.*, 1995). La mayor parte de estos trabajos coinciden en señalar que el efecto cardioprotector del preconditionamiento no es atenuado mediante la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Avkiran *et al.*, 1999; Shipolini *et al.*, 1997; Bugge *et al.*, 1995; Munch-Ellingsen *et al.*, 1998). Sorprendentemente, otros trabajos han demostrado que la inhibición del intercambiador conjuntamente con la realización de preconditionamiento ofrecía un beneficio adicional en términos de reducción del infarto y de recuperación de la función contráctil (Shipolini *et al.*, 1997; Bugge *et al.*, 1995). Este efecto aditivo de la combinación entre la inhibición  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  el preconditionamiento fue demostrado en ratas (Shipolini *et al.*, 1997; Bugge *et al.*, 1995) y en perros (Gumina *et al.*, 1999) la inhibición del intercambiador parece ofrecer beneficios superiores a los del preconditionamiento cuanto más prolongada es la isquemia.

### **5.7 CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE ATP**

Desde que fueran descritos por primera vez por Noma, en 1983 en la membrana de cardiomiocitos de cobayo (Noma *et al.*, 1983), los canales de potasio dependientes de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) han adquirido creciente relevancia como estructuras involucradas en los fenómenos de cardioprotección (Grover *et al.*, 2000; Gomma *et al.*, 2001) contra el infarto. En el miocardio existen dos tipos de canales diferentes: los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  sarcolemales y los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocondriales que, a su vez, presentan características y propiedades muy diferentes. Por ejemplo, el pinacidil y la glibenclamida actúan sobre ambos subtipos en tanto que el diazóxido y el 5-hidroxicanoato (5HD) actúan sobre los canales mitocondriales, y el HMR 1098 y 1883 bloquea únicamente las estructuras sarcolemales. La utilización de estas drogas ha permitido determinar, en parte, el papel correspondiente a cada uno de los dos canales en la cardioprotección por preconditionamiento isquémico (Grover *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2000; Gomma *et al.*, 2001; Lascano *et al.*, 2002).

Los autores que han estudiado el infarto coinciden en señalar que es el canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocondrial el que está involucrado en la protección contra el infarto (Grover *et al.*, 2000; Gomma *et al.*, 2001), en tanto que otros autores consideran que el canal sarcolemal es el responsable de la protección contra la disfunción contráctil postisquémica y las arritmias (Del Valle *et al.*, 2001; Lascano *et al.*, 2002; Toyoda

*et al.*, 2000). Sin embargo, en el perro ambos canales parecen complementarse y participar del preconditionamiento isquémico contra el infarto (Sanada *et al.*, 2001; Pagel *et al.*, 2002). Esta última observación podría estar agregando un componente interespecie debido a que los trabajos más controvertidos acerca de la participación de uno y otro canal provienen de estudios en ratas y conejos. Un factor adicional que podría agregar confusión es la supuesta especificidad de las drogas utilizadas para el estudio de los  $K_{ATP}$ . La glibenclamida, un conocido bloqueante de los canales  $K_{ATP}$ , fue la primera droga utilizada para determinar la participación de estos canales en la protección contra el daño por isquemia y reperfusión, tal como lo señalan los trabajos con perros anestesiados realizados por el grupo de Auchampach (Auchampach *et al.*, 1991; Auchampach *et al.*, 1992). Posteriormente, este grupo sería el primero en mencionar la participación de los canales  $K_{ATP}$  en el preconditionamiento isquémico (Gross *et al.*, 1992).

Otro tema que ha encendido el debate respecto de la participación de los canales  $K_{ATP}$  en el preconditionamiento es el de la acción de estas estructuras en el mecanismo de cardioprotección: ¿son verdaderamente efectores o podrían también ser gatilladores? (Das *et al.*, 1999; Tillay *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2000). Por ejemplo, en el miocardio de conejo el 5HD sólo bloquea la protección cuando es administrado durante el período de preconditionamiento y no cuando se lo administra durante la isquemia; cuando se administra genisteína se bloquea la cardioprotección por diazóxido, lo cual sugiere que la apertura del canal  $K_{ATP}$  es parte integral de una señal de transducción o gatillamiento antes que su efector final (Gros *et al.*, 2000; Pain *et al.*, 2000). Esa última afirmación parece estar reforzada por el resultado obtenido en ratas en las que la administración de diazóxido incrementa la producción de radicales libres (Gros *et al.*, 2000) y la administración de antagonistas de la PKC bloquea la protección conferida por los activadores de los canales  $K_{ATP}$  (Forbes *et al.*, 2001).

Respecto de los mecanismos involucrados en la cardioprotección como consecuencia de la activación de los canales  $K_{ATP}$ , los primeros trabajos postularon que la activación de estos canales llevaba a un mayor acortamiento en la duración del potencial de acción (Nichols *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1994) lo cual necesariamente determinaba un menor ingreso de calcio al interior celular,

atenuando el riesgo de sobrecarga de este ion y el consumo excesivo de energía (Cole *et al.*, 1991; Shigematsu *et al.*, 1995), todo lo cual favorecía la supervivencia celular luego de un episodio isquémico sostenido y mediante el preconditionamiento isquémico (Grover, *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 1994; Grover *et al.*, 1995).

Los canales  $K_{ATP}$  mitocondriales participan en el preconditionamiento, mediante tres mecanismos fisiológicos distintos:

**a) el volumen mitocondrial**, determinado por el balance entre el influjo y el eflujo de iones desde la matriz, sería ajustado o estabilizado por la activación del canal para optimizar la producción de energía (o quizás disminuir la pérdida energética) durante episodios de isquemia y reperfusión (Garlid *et al.*, 1996; Beavis *et al.*, 1992).

**b) La activación del canal  $K_{ATP}$**  enlentecería la entrada de  $Ca^{2+}$  durante la isquemia y la reperfusión merced a la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, evitando así el daño por sobrecarga del ion (Holmuhamedov *et al.*, 1995).

c) la activación del canal podría determinar la **generación de radicales libres mitocondriales**, los cuales contribuirían con los eventos iniciales de la cardioprotección (Das *et al.*, 1999; Tillay *et al.*, 2000; Vanden Hoek *et al.*, 1998).

Independientemente de las controversias respecto del papel gatillador y/o efector de los canales  $K_{ATP}$  se debe destacar que la mayor parte de las publicaciones sostienen que estos canales son las estructuras últimas y responsables efectores de la acción cardioprotectora del preconditionamiento (Baines *et al.*, 1999; Grover *et al.*, 2000; Lascano *et al.*, 2002; Toyoda *et al.*, 2000; Van Winkle *et al.*, 1995).

## 5.8 ENTRADA DE CALCIO OPERADA POR CISTERNA SOCE

El laboratorio de Putney fue el primero en introducir el concepto de SOCE en 1986 con una serie de experimentos en los que se demostró que el agotamiento de las reservas internas de calcio ( $Ca^{2+}$ ) controlaba el grado de entrada de  $Ca^{2+}$  en las células no excitables (Putney 1986). Este mecanismo de entrada de  $Ca^{2+}$  sirvió como enlace entre el  $Ca^{2+}$  extracelular y las reservas internas de  $Ca^{2+}$  (Ríos 2010). Cuando las reservas internas estaban llenas, no se detectó afluencia de  $Ca^{2+}$ , pero

cuando las reservas se vaciaron, se desarrolló la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ahora se reconoce la SOCE como una vía ubicua que funciona para mantener la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta al agotamiento de las reservas internas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE (Putney 1986; Kwan *et al.*, 1990).

Una amplia investigación en la última década ha definido aspectos clave de la SOCE, incluida una proteína capaz de sensar las concentraciones de calcio en el RE y el canal de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . La molécula de interacción estromal 1 (STIM1) es una proteína de transmembrana (en el RE) que actúa como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la activación de los canales de calcio operados por cisterna (SOC) después del agotamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cisterna (Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Los SOC son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  altamente selectivos en la membrana plasmática compuestos por multímeros del canal Orai (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006). En presencia de reservas adecuadas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen a un motivo (EF) en el dominio luminal de STIM1 para mantener una forma monomérica (Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). El agotamiento de las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  unido a STIM1 y se conduce a la agregación y la posterior activación alostérica de los SOC (Vig *et al.* 2006; Chen *et al.* 2006; (Yuan *et al.*, 2009).

Las proteínas Orai se expresan en una gran variedad de organismos desde los nematodos hasta los primates (Cai 2007). Los invertebrados expresan una sola isoforma de Orai (Cai 2007; Collins *et al.* 2011). La primera aparición de dos homólogos de Orai se asocia con vertebrados, y Orai3 aparece incluso más tarde, solo en mamíferos, y parece haber evolucionado de Orai1 a partir de un evento de duplicación de genes. Por lo tanto, en términos evolutivos, Orai1 es el miembro más antiguo de la familia y Orai3 el más nuevo (Shuttleworth 2012).

La evidencia de una variedad de técnicas (transferencia Northern, transferencia Western, rtPCR, inmunohistoquímica) indica una amplia expresión Orai en diversos tejidos de los mamíferos (Gross *et al.*, 2007; Guzman *et al.*, 2014; Gwack 2007; Wissenbach *et al.*, 2007). Además de las células inmunes como los macrófagos y los linfocitos, hay una expresión significativa de Orai1 en el cerebro, el páncreas,

los riñones y la piel. Los estudios genéticos en humanos y los estudios genéticos en ratones complementan estos perfiles de expresión y confirman un papel importante para Orai1 en una variedad de células inmunes (células T, mastocitos, células B, células NK), así como células no inmunes (fibroblastos, músculo esquelético, plaquetas, microglia, células endoteliales, músculo liso, hepatocitos y células madre neurales) (Baba *et al.*, 2008; Braun *et al.*, 2009; Feske *et al.*, 2006; Gwack 2007; McCarl *et al.* 2010; Oh-Hora *et al.* 2008; Somasundaram *et al.* 2014; Stiber *et al.* 2008; Varga-Szabo *et al.* 2008).

El proceso de activación de los SOC es muy inusual, ya que implica el contacto entre proteínas de membrana ubicadas en dos compartimentos celulares diferentes, el RE y la membrana plasmática (MP). En la mayoría de las células, el 75-85% de STIM1 expresado endógenamente reside en la membrana del RE, y el resto en la MP (Manji *et al.* 2000).

La activación de la SOCE por depleción del retículo es un proceso altamente dinámico que requiere la redistribución de STIM y Orai en la célula. En las células en reposo con reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  completa, se ha reportado en estudios de fluorescencia que STIM1 y Orai1 son móviles y se distribuyen difusamente por la membrana del retículo endoplásmico y la membrana plasmática, respectivamente (Baba *et al.* 2006; Covington *et al.* 2010; Fukushima *et al.* 2012; Liou *et al.* 2007; Liou *et al.* 2005; Park *et al.* 2009; Wu *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2005). Después del agotamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, STIM1 y Orai1 se redistribuyen dentro de sus membranas respectivas (Zhang *et al.* 2005). La activación de la SOCE se favorece por la coacumulación de proteínas STIM y Orai en el RE y la MP, respectivamente (Orci *et al.* 2009) donde el RE se mantiene lo suficientemente cerca de la MP que STIM1 puede unirse a Orai1, abriendo el canal para activar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual termina después de la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  la SERCA en el RE. Una vez que se ha rellenado el RE, STIM1 y Orai1 vuelven a sus distribuciones difusas (Baba *et al.* 2008; Malli *et al.* 2008; Sampieri *et al.* 2009; Smyth *et al.* 2008).

## 5.9 REQUISITOS ESTEQUIOMÉTRICOS PARA LA ACTIVACIÓN DE ORAI

La activación de los canales de Orai parece ser altamente sensible al número de STIMs unidos. Hoover y col. 2011 cuantificaron estos efectos y descubrieron que la activación era una función en forma de campana altamente no lineal de la relación STIM a Orai. La activación máxima del canal Orai1 se produjo en una relación STIM1-Orai1 de ~2: 1 (Hoover *et al.* 2011). Sin embargo, se necesitan nuevos enfoques experimentales para resolver estas importantes preguntas sobre la estequiometría STIM1-Orai1, la estructura del estado unido y su relación con el *gating*.

La activación del canal Orai parece ser más compleja que el mecanismo de dos estados, uno abierto y otro cerrado. La activación lenta de la corriente SOCE por depleción del RE se produce mediante el reclutamiento gradual de canales individuales desde un estado "silencioso" a un estado de alta probabilidad de apertura ( $P_o$ ) (~0.8) (Prakriya 2006). Sin embargo, la capacidad del 2-APB (a dosis bajas) para aumentar la SOCE en más de tres veces implica que la  $P_o$  en realidad es mucho más baja, <0.3. Una forma de conciliar estos resultados es que los canales Orai exhiben una activación modal, es decir, el canal alterna entre estados silenciosos y de alta  $P_o$  a una frecuencia suficientemente baja que las transiciones evaden la detección breves períodos de medición. De acuerdo con dicho esquema, la unión de STIM1 a Orai1 podría activar los canales al aumentar la cantidad de tiempo que se pasa en el modo de alta  $P_o$  (Hoover *et al.* 2011; Zhang *et al.* 1995).

## 5.10 INACTIVACIÓN RÁPIDA DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$

La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales Orai inhibe la actividad rápida del canal a través de un proceso llamado inactivación rápida dependiente de  $Ca^{2+}$ , o inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$  (CDI, por sus siglas en inglés) (Fierro *et al.* 1999). La CDI se observa típicamente como una disminución en corriente de los canales Orai durante decenas de milisegundos, además la CDI es específica para  $Ca^{2+}$  sobre  $Ba^{2+}$  o  $Sr^{2+}$  (Zweifach *et al.* 1995). Un tampón de  $Ca^{2+}$  intracelular rápido (BAPTA) puede reducir la CDI, mientras que un tampón más lento (EGTA) no puede, debido a que ocasiona una inhibición de la retroalimentación de la actividad del canal por la alta concentración de calcio a la vecindad del canal (Hoth *et al.*

1993). Un análisis cuantitativo de estos efectos amortiguadores sugirió que la CDI se evoca por la unión de al menos dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  a un sitio ubicado a varios nanómetros del poro del canal o en proteínas muy cercanas a éste (Zweifach *et al.* 1995).

Los estudios de estructura y función han implicado a varias proteínas en el mecanismo de la CDI, incluidos STIM1, calmodulina (CaM) y Orai1 (Scrimgeour *et al.* 2009; Litjens *et al.* 2004). En el caso de STIM se descubrió que sirve como una parte integral del canal, permitiéndole responder a la inactivación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Mullins *et al.* 2009), además que la unión de STIM1 cambia la selectividad iónica del canal Orai (McNally *et al.* 2012).

La CaM también se ha implicado como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  para CDI (Litjens *et al.* 2004; Mullins *et al.* 2009). La CaM se une a Orai de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (residuos 68-91) (Mullins *et al.* 2009). En estudios funcionales se observó que truncamientos dentro de la misma región en Orai3 produjeron una pérdida de la CDI y la unión de la CaM la porción del  $\text{NH}_2$ -terminal de Orai (Bergsmann *et al.* 2011). Además de validar el papel de la CaM en la CDI, se confirmó mediante estudios de cristalografía que Orai1 se une fuertemente a la CaM (Liu *et al.* 2012).

### **5.11 INACTIVACIÓN LENTA DEPENDIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$**

Durante elevaciones prolongadas en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la corriente de Orai disminuye debido a un proceso llamado inactivación lenta dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El relleno de la cisterna desencadena la desactivación del canal a medida que STIM1 se une al  $\text{Ca}^{2+}$  luminal y vuelve a su estado de reposo. La inactivación lenta es mecánicamente distinta de la desactivación y puede observarse cuando los inhibidores de SERCA como la Thapsigargina (Tg) (Parekh 1998; Zweifach 1995) impiden el llenado de la cisterna. Esto se observa en registros electrofisiológicos de células completas como una disminución de la corriente a medida que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta a niveles superiores de  $\sim 200$  nM (Zweifach 1995). Por lo tanto, aunque no se conoce su mecanismo molecular, la inactivación lenta se distingue fácilmente de la CDI rápida por su cinética lenta y su dependencia de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  global, y se distingue de la desactivación por su independencia del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE.

Curiosamente, las mitocondrias pueden modular la sensibilidad de los canales Orai a la inactivación lenta. Las condiciones que desenergizan a las mitocondrias también reducen la actividad del canal Orai (Zheng *et al.* 2008). En los registros de células completa, la inactivación lenta puede atribuirse a la despolarización mitocondrial, ya que puede prevenirse suministrando sustratos metabólicos a la célula y, en estas condiciones, restablecerse mediante inhibidores mitocondriales (Gilabert *et al.* 2000). La base molecular del mantenimiento mitocondrial de la actividad de los SOC no está del todo clara. Sin embargo, generalmente se cree que, al amortiguar eficientemente el  $\text{Ca}^{2+}$  (Rizzuto *et al.* 2009), las mitocondrias evitan la inactivación de la SOCE al competir con los sitios de inactivación lenta por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Hoth *et al.* 2000). Además, las mitocondrias también pueden facilitar la SOCE al liberar piruvato o ATP (Bakowski *et al.* 2007).

La capacidad de las mitocondrias modular la SOCE puede depender de su proximidad a los SOC. Hoth y col. 2006 demostraron que durante períodos de entrada prolongada de  $\text{Ca}^{2+}$ , las mitocondrias se acercan más a la MP. Las mitocondrias modulan la SOCE a través de múltiples vías de interacción, ninguna de las cuales se entiende bien mecánicamente (Demaurex *et al.* 2009). Además, las mitocondrias aumentan la SOCE al mejorar la depleción del RE mediado por el IP3 (Gilabert *et al.* 2001), pero también pueden promover su reabastecimiento (Arnaudeau, *et al.* 2001), y la despolarización mitocondrial puede inhibir aún más la SOCE al dificultar la translocación de STIM1 a las uniones RE-MP (Singaravelu *et al.* 2011). Además, las mitocondrias pueden regular indirectamente la actividad de los SOC por su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno.

### **5.12 MODULACIÓN REDOX DE STIM Y FUNCIÓN DE ORAI**

Los grupos tiol de la cisteína se vuelven sensibles a STIM1 y Orai1 con múltiples modos de modulación redox (Bogeski *et al.* 2012). La modulación resultante tiene implicaciones para una amplia gama de funciones efectoras celulares, especialmente en condiciones patológicas como la hipoxia (Berna-Erro *et al.* 2009; Guzman *et al.* 2014). En un modo de regulación, se informa que la oxidación activa STIM1 y provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  incluso cuando la cisterna está llena (Hawkins *et al.* 2010). Los mecanismos de modulación redox a menudo son complejos, ya

que reflejan el equilibrio entre los niveles de las ROS y antioxidantes (Reczek *et al.* 2015), así como las posibles contribuciones de cisteínas reactivas adicionales ubicadas en otras partes de la proteína.

En un segundo modo de regulación dependiente de redox, Mathes *et al.* 1998 descubrieron que Orai1 se inhibe directamente por la oxidación de un residuo cisteína (C195 en Orai1). Este residuo está ausente en Orai3, lo que lo hace insensible a la inhibición inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yan *et al.* 2006).

### 5.13 pH

La acidificación del medio extracelular ocurre comúnmente en tejidos normales durante episodios de actividad metabólica intensa, ataques hipóxicos e inflamación, así como durante la transformación neoplásica donde la disminución del pH se correlaciona con la agresividad del tumor (Lardner 2011). La acidificación del pH extracelular inhibe fuertemente la corriente de los SOC en macrófagos (Malayev *et al.* 1995). Los SOC también se inhiben por la acidificación intracelular con un pKa de 6.8, sin un cambio notable en la selectividad iónica (Kerschbaum *et al.* 1998). Curiosamente, el pKa de los efectos extracelulares e intracelulares del pH son muy similares a los informados para los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, lo que aumenta la posibilidad de que los mecanismos moleculares de la regulación del pH puedan ser similares en las dos clases de canales. En los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, se sugirió que los residuos de glutamato ubicados en el filtro de selectividad son un posible objetivo molecular de la regulación extracelular del pH (Chen *et al.* 1996). Aunque el glutamato tiene un pKa de ~4.3 en solución, el enlace de hidrógeno de los carboxilos de las proteínas puede elevar el pKa hasta 8.8 (Fitch *et al.* 2002), lo que podría explicar la modulación de los SOC a un pH alto. La modulación del pH podría proporcionar un mecanismo regulador de retroalimentación para limitar la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> durante la inflamación o la hipoxia y mantener estable a las células durante condiciones patológicas (Mancarella *et al.* 2011).

La SOCE es una vía de señalización de Ca<sup>2+</sup> descubierta hace décadas, pero su participación en la fisiología humana apenas está revelándose. La relevancia de esta vía para el músculo estriado aumentó con la descripción de las miopatías esqueléticas que resultan de mutaciones en STIM1 y Orai1.

La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cardiomiocitos, es crítica para muchas funciones celulares que van desde la contracción muscular hasta la regulación de la expresión génica y el metabolismo oxidativo (Sobie *et al.* 2011). La coordinación de estos procesos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  permite a las células musculares ajustar la producción celular a la carga de trabajo impuesta. Para los cardiomiocitos auriculares y ventriculares, la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para la contracción. En contraste, los cardiomiocitos marcapasos utilizan oscilaciones rítmicas de  $\text{Ca}^{2+}$  que impulsan cada latido en forma de un reloj  $\text{Ca}^{2+}$  (Wescott *et al.* 2016; Yaniv *et al.* 2013).

La función de la SOCE en los cardiomiocitos ha sido un tema de intenso debate, ya que está bien establecido que los cardiomiocitos tienen mecanismos muy eficientes para rellenar los depósitos intracelulares de calcio. Sin embargo, conciliar el papel de la SOCE en la fisiopatología cardíaca puede tener implicaciones importantes, ya que podría ofrecer nuevos objetivos terapéuticos para las arritmias cardíacas y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

#### **5.14 EL PAPEL DE STIM1 Y SOCE EN LOS CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES**

Tomando como referencia la descripción de STIM1 en el músculo esquelético y dadas las similitudes del manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  en los músculos estriados, varios grupos propusieron un papel similar para la SOCE en el músculo cardíaco (Hulot *et al.* 2011).

Estas cuestiones se abordaron por primera vez en un estudio cuidadoso de la SOCE en miocitos de ratas neonatales y adultas realizado en el laboratorio de Hill (Luo *et al.* 2012). Estos estudios muestran que la SOCE es robusta en cardiomiocitos neonatales, y se presenta en el 100% de los cardiomiocitos. En contraste, la SOCE se presentó en el 10% de los cardiomiocitos adultos.

Los canales Orai tienen características funcionales muy bien definidas, por lo tanto, es importante registrar la corriente de membrana producida tras la depleción del RE, mediante experimentos de electrofisiología. Además de la dependencia al RE, los canales de Orai muestran características específicas que incluyen: 1) un potencial de inversión muy positivo de una corriente altamente selectiva al  $\text{Ca}^{2+}$ , 2)

inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , 3) monovalencia en condiciones libres iones divalentes. Hasta la fecha, las corrientes tradicionales de Orai que cumplen con todos estos criterios solo se han resuelto en células del nodo sino auricular pero se tiene reserva en incluir a los cardiomiocitos ventriculares aislados (Zhang *et al.* 2015). Para estudiar a la SOCE se suele utilizar Tg un inhibidor de la bomba SERCA, que permite un agotamiento lento de los depósitos de calcio en el RE (Baudet *et al.* 1993). En algunos estudios se ha observado que la Tg activa una corriente no selectiva que es permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  con un potencial de inversión cercano a 0 mV y  $-+20$  lo que indica una corriente no selectiva en los cardiomiocitos (Hulot *et al.* 2011; Saliba *et al.* 2015), por esta razón se ha pensado que la corriente provocada por la Tg podría representar otros canales activados por STIM1, como el canal potencial de receptor transitorio (TRPC) (Zhao *et al.* 2015).

Desde la descripción inicial de la SOCE hace décadas, se han propuesto varias moléculas pequeñas como inhibidores de los SOC. Para los cardiomiocitos, se han utilizado lantánidos y compuestos de pirazol como bloqueadores de la SOCE (Hulot *et al.* 2011). Los lantánidos son los primeros inhibidores de Orai, pero no son muy específicos, ya que pueden bloquear los canales TRPC y los canales  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Kerschbaum *et al.* 1999; Trebak *et al.* 2002). Los bis-(trifluorometil)-pírozoles (BTP) se identificaron por su capacidad para bloquear la translocación nuclear NFAT después de la activación de las células T (Zitt *et al.* 2004; Ohga *et al.* 2008), de ellos el BTP-2 se ha convertido en el inhibidor más utilizado para los SOC y se ofrece como evidencia de la participación del canal Orai1 en los cambios de potencial de acción y SOCE (Touchberry *et al.* 2011; Sabourin *et al.* 2016). El mecanismo por el cual el BTP-2 inhibe la SOCE fue cuestionado por estudios que muestran una interacción específica con los canales TRPM4 (Hof *et al.* 2017; (Simard *et al.* 2013). Otro agente farmacológico que afecta a la SOCE es el 2-aminoetildifenil borato (2-ABP), bloquea las corrientes de los SOC con alta potencia en los cardiomiocitos (Wang *et al.* 2012; Peppiatt *et al.* 2003). Sin embargo, un aspecto curioso de 2-ABP es su capacidad de activar canales Orai3, independientemente de STIM1 o de la depleción del RE. Los canales Orai3 se encuentran solo en mamíferos y han sido implicados en la hipertrofia cardíaca en función de su perfil de expresión por varios grupos de investigación (Saliba *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2014). Sería interesante

saber si el 2-ABP puede activar las corrientes Orai3 en los cardiomiocitos, como se ha demostrado en las células no excitables (Shuttleworth 2012). Sin embargo, cuando se mira en su conjunto, los numerosos estudios que evalúan la SOCE en cardiomiocitos en condiciones normales y después de lesiones patológicas requieren una interpretación cuidadosa basada en los resultados con estos nuevos agentes farmacológicos. Existen otro tipo de inhibidores que han demostrado tener mayor afinidad por los diferentes subtipos de Orai, se identifican como la serie GSK, de estos el GSK-7975A presenta mayor selectividad por ORAI1, aunque también puede inhibir a Orai3 de manera dependiente de la concentración (Derler *et al.*, 2013).

### **5.15 EL PAPEL DE STIM1 Y SOCE EN LA HIPERTROFIA CARDÍACA**

Los cardiomiocitos responden a la sobrecarga de presión activando genes fetales que promueven la resistencia al estrés. Varios laboratorios han propuesto que la regulación a la alta de STIM1 y Orai durante la sobrecarga de presión forma parte de la activación de genes fetales, y permite a las células compensar los depósitos agotados  $Ca^{2+}$  en el RE durante la insuficiencia cardíaca (Troupes *et al.* 2017; Voelkers *et al.* 2010; Parks *et al.* 2016). Se ha sugerido que la regulación positiva de STIM1 y la SOCE son críticos para el desarrollo de insuficiencia cardíaca (Zhu-Mauldin *et al.* 2012). STIM1 parece ser un evento primario en este proceso ya que la sobreexpresión transgénica en el corazón conduce a insuficiencia cardíaca (Correll *et al.* 2015).

Un tema común presente en todos los estudios discutidos anteriormente es que STIM1 en los cardiomiocitos influye en las vías de transducción de señales asociadas con el crecimiento cardíaco. Se ha descrito que eliminar la señalización de STIM1 mediante diferentes técnicas (deleción genética, administración viral de silenciadores o inhibición farmacológica) altera el estado de activación de las vías de calcineurina, una serina-treonina fosfatasa regulada por la  $Ca^{2+}$ -calmodulina y la cinasa dependiente de calmodulina CamK (Hulot *et al.* 2011; Luo *et al.* 2012). Lo que puede cambiar los perfiles de expresión de genes asociado con el crecimiento cardíaco y la hipertrofia.

## **6. HIPÓTESIS**

La entrada de calcio operada por cisterna (SOCE) se regula negativamente durante el PPC.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación de los canales de calcio operados por cisterna en el preconditionamiento farmacológico.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Se utilizaron ratas Wistar macho (300–350 g), el protocolo se ajusta a los lineamientos aprobados por la División de Unidades de Animales de Laboratorio del CINVESTAV-IPN, los cuales cumplen con la ley federal, el estatuto federal y los reglamentos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Las ratas se anestesiaron con una dosis de 50 mg/kg de pentobarbital sódico inyectado por vía intraperitoneal. Además, se administró una dosis de 500 U/kg de heparina sódica por vía intraperitoneal.

### **8.2 AISLAMIENTO DE MIOCITOS VENTRICULARES**

Para el aislamiento de cardiomiocitos ventriculares, los corazones se colocaron en un aparato Langendorff y se perfunden durante 5 minutos a 37 °C con la solución fisiológica Tyrode sin calcio, que contiene: 136 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES y 10 mM de glucosa. Los corazones se recirculan durante ~60 minutos usando la solución de Tyrode suplementada con 70 U/ml de colagenasa tipo II y 0.5 mg/100 ml de proteasa tipo XIV. Los ventrículos se cortan en pequeños fragmentos y se agitan de 2-3 veces a 50 rpm durante 5 minutos en la misma solución. Las células aisladas se filtran a través de un filtro celular de 100 µm y se centrifugan a 500 rpm durante 2 minutos. El sedimento se resuspende en la solución de Tyrode sin enzimas. Los cardiomiocitos se usan inmediatamente en los registros electrofisiológicos.

## 8.2 MÉTODOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Se registrarán las corrientes de membrana en miocitos ventriculares utilizando la técnica de *patch clamp* utilizando un amplificador Axopatch 200-A (Axon Instruments, Foster City, CA, Estados Unidos). Para medir la capacitancia de la membrana, se utilizaron pulsos de despolarización de 10 mV. Estos registros tuvieron una duración entre 100 y 300 s y se digitalizaron a un intervalo de muestreo de 120 ms utilizando una interfaz Digidata (Axon Instruments, Foster City, CA, Estados Unidos) a una resolución de 16 bits. Para medir la dependencia de las corrientes de membrana al voltaje, se utilizaron rampas que van de +50 a -120 mV con una duración de 1 s y se registraron cada 10 s, las corrientes se muestrearon a intervalos de 1 ms, con un potencial de mantenimiento de -80 mV.

Los canales iónicos son de suma importancia para la función celular. Sus propiedades funcionales se estudian comúnmente en condiciones de fijación de voltaje, lo que permite un análisis sistemático de las corrientes con respecto al voltaje. La relación entre corriente y voltaje (relación IV) proporciona información sobre la conductancia, propiedades de activación, selectividad iónica y/o las concentraciones de iones dependiendo de las condiciones y parámetros conocidos en un estudio particular (Hodgkin *et al.*, 1952).

El análisis de las relaciones IV obtenidas de las amplitudes de las corrientes iónicas a voltajes constantes, y después de aplicar protocolos de pulsos, se ha utilizado con frecuencia desde la introducción de la técnica de fijación de voltaje (Hodgkin *et al.*, 1952) para comprender las propiedades funcionales de varios tipos de canales iónicos, incluidos los activados por voltaje y los canales activados por ligando, así como otros tipos de canales (Zhang *et al.*, 1998).

Para registrar corrientes iónicas que dependen del tiempo y/o que tienen cinéticas de activación rápida, se suelen usar protocolos de pulsos, por ejemplo, corrientes de sodio y calcio. Además de los pulsos cuadrados, se pueden utilizar protocolos de rampa, para estudiar corrientes independientes del tiempo, donde el voltaje cambia gradualmente a una velocidad constante y la corriente se registra continuamente, se usan principalmente para registrar las corrientes que son

independientes del tiempo o que se activan lentamente (Reiner, *et al.* 2005), como los SOC.

La solución de la pipeta contenía: 137 mM de aspartato de cesio, 2 mM de CsCl, 8 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1.8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de EGTA y 15 mM de HEPES, la solución se ajustó a un pH 7.2. La solución del baño contiene 137 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de glucosa, 10 μM de verapamilo, 200 μM de ouabaína y 10 mM de HEPES, la solución se ajustó a un pH 7.4.

Para depletar al retículo sarcoplásmico se utilizó Tg, la cual boquea la recaptación de calcio mediado por la SERCA (ATPasa de Ca<sup>2+</sup>) a una concentración de 2 μM. Para estudiar el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizó N-acetilcisteína (NAC) a una concentración de 2 mM. Además, se usó Ni<sup>2+</sup> (5 mM) para bloquear al intercambiador de sodio-calcio (NCX).

Para estudiar el papel del preconditionamiento sobre el desacople de la cadena respiratoria mitocondrial se utilizó una solución (cóctel) que mantiene las mitocondrias en un estado energizado (Gunter y Pfeiffer, 1990). Este cóctel contiene 2 mM ácido pirúvico, 2 mM ácido málico, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM cAMP y 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Para observar el efecto del Ca<sup>2+</sup> intracelular en la inactivación de los SOC, se utilizó un quelante de Ca<sup>2+</sup> que es permeable a través de la membrana celular, BAPTA-AM (30 μM) 30 minutos antes de los registros electrofisiológicos.

El PPC se realizó mediante la incubación de cardiomiocitos en la solución de Tyrode suplementada con 100 μM Dzx. Se añadió Dzx a partir de una solución madre 0,1 M en DMSO para lograr una concentración final de DMSO de menos del 0,01%. El inhibidor selectivo de los canales mitoKATP, 5-hidroxidecanoato (5-HD), se usó a una concentración de 100 μM. Para caracterizar los efectos de PPC en las corrientes de membrana, los cardiomiocitos se incubaron siguiendo los protocolos experimentales indicados en las figuras. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (23 °C).

#### **8.4 MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS**

Los niveles de las ROS se midieron utilizando la sonda fluorescente permeable a través de la membrana celular 5-(y 6)-clorometil-20,70 diacetato de diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA). La fluorescencia (excitación de 505 nm y emisión de 545 nm) se midió (en unidades arbitrarias (AU) durante 30 ms en segmentos de cardiomiocitos definidos por el usuario. Las imágenes fueron adquiridas a intervalos de 5 min. Los cardiomiocitos del grupo Dzx se trataron como los del grupo control, excepto por la incubación con Dzx (100  $\mu$ M) durante 90 minutos. Las mediciones de ROS en cada condición experimental se normalizaron a los valores iniciales de fluorescencia y se ajustaron a una línea recta.

#### **8.5 PPC EN CORAZONES AISLADOS**

Para evaluar la protección contra la isquemia, los corazones previamente perfundidos durante 90 minutos en la solución de Tyrode o en la solución de Tyrode que contenía Dzx (100  $\mu$ M) fueron sometidos a isquemia global durante 30 minutos, seguido de 2 h de perfusión con la solución de control. Los corazones se tiñeron, con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% durante 10 minutos, posteriormente se fijaron durante la noche con paraformaldehído (4%), se cortaron en rebanadas de 500  $\mu$ m, y se fotografiaron con una cámara digital conectada a un microscopio. El TTC produce precipitados coloreados en presencia de sistemas enzimáticos de deshidrogenasa intactos, mientras que las áreas necróticas que carecen de actividad deshidrogenasa o concentraciones suficientes de cofactores no se tiñen.

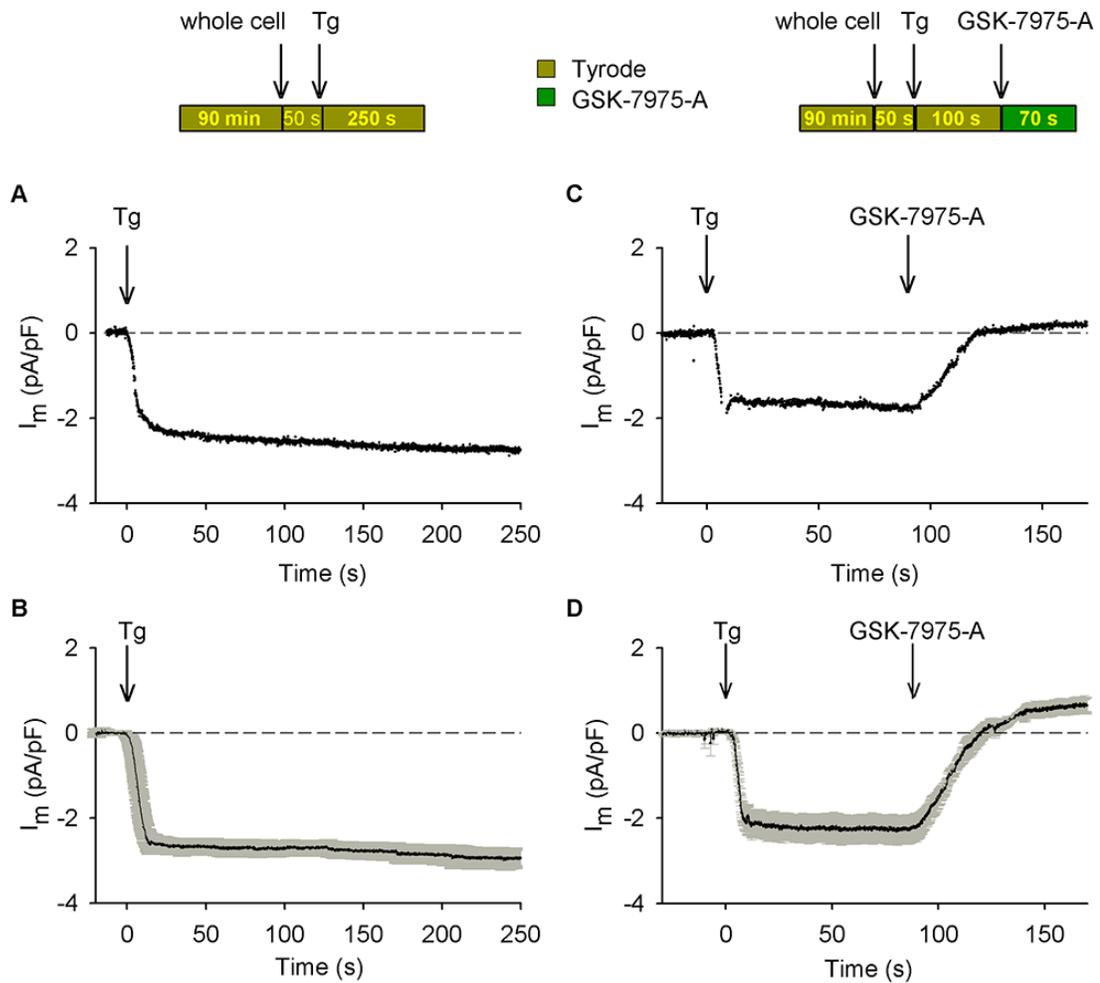
### **9 ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para el análisis se utilizaron pruebas t independientes o ANOVA. Una  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

## 10 RESULTADOS

### 10.1 LOS SOC EN LOS CARDIOMIOCITOS SON ACTIVADOS POR Tg

El agotamiento de las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  usando Tg condujo al desarrollo de una corriente entrante que rápidamente alcanzó un nivel estable y se mantuvo durante todo el período de registro. La Figura 1A muestra los resultados de un experimento representativo y la Figura 1B resume los resultados de varias réplicas experimentales. Los valores de la corriente de membrana se normalizaron a la capacitancia de la célula para permitir comparaciones entre experimentos. Se ilustran los valores promedios ( $\pm$  SEM,  $n = 10$ ) de las corrientes de membrana provocadas tras la adición de Tg. Para probar si las corrientes de SOC pertenecen a los canales Orai, utilizamos GSK-7975-A, un potente inhibidor de las corrientes Orai1 y Orai3 (Derler *et al.*, 2013) (Figura 1C-D). El agotamiento de las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  por Tg produjo corrientes entrantes, como se muestra en la Figura 1A-B, y estas corrientes fueron inhibidas tras la adición del GSK-7975-A. Después de la inhibición de los SOC por GSK-7975-A, se observó una corriente saliente relativamente pequeña (Figura 1C-D).



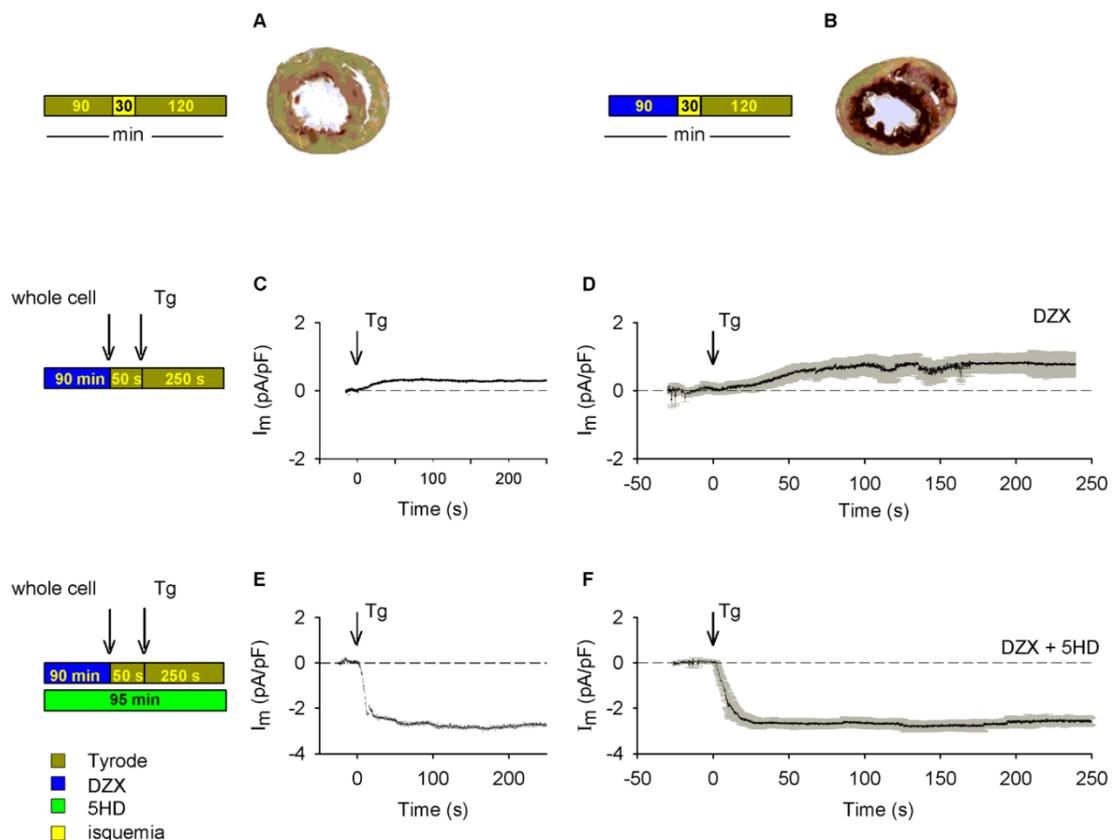
**FIGURA 1. Las corrientes generadas por la Tg están mediadas por los SOC.**

(A) Trazo representativo de una corriente entrante a -80 mV generada por Tg (flecha). (B) Valores promedio de las corrientes de membrana en función del tiempo ( $\pm$  SEM,  $n=10$ ) de experimentos como en (A). (C) Un experimento representativo que muestra que el GSK-7975-A un inhibidor de los SOC bloquea la corriente entrante generada por la Tg. (D) Valores promedio de las corrientes de membrana en función del tiempo ( $\pm$  SEM,  $n=5$ ) de los experimentos como en (C). Paneles izquierdos: protocolos experimentales.

**10.2 INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC**

Verificamos que la perfusión con Dzx conduce al PPC al exponer corazones en condiciones testigo y tratados con Dzx antes de un periodo de isquemia severa. La Figura 2A muestra una sección representativa de un corazón infartado perfundido con solución testigo antes de la isquemia. Las áreas extensas del infarto son evidentes (áreas de color claro). Cuando se sometió a isquemia un corazón

pretratado con Dzx, las áreas infartadas se redujeron considerablemente, como se muestra en la Figura 2B. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos adicionales. A continuación, probamos los efectos de PPC en las corrientes de membrana. Cuando los cardiomiocitos se preconditionaron con Dzx, la Tg no generó una corriente entrante como en los cardiomiocitos testigo (Figura 1). En cambio, se desarrolló una corriente saliente relativamente pequeña que no se inactivó. La Figura 2C muestra los resultados de un experimento representativo y la Figura 2D muestra los valores promedio de las corrientes de membrana registradas de cardiomiocitos preconditionados ( $\pm$  SEM,  $n=13$ ) de las réplicas experimentales. A la concentración utilizada, el Dzx es un abridor selectivo de los canales mitoKATP (Garlid *et al.*, 1996). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que los cambios a nivel mitocondrial están involucrados en la respuesta a la Tg de los cardiomiocitos preconditionados. Para probar esta hipótesis, utilizamos 5-HD, un inhibidor selectivo de los canales mitoKATP (Hu *et al.*, 1999). La respuesta a la Tg de los cardiomiocitos preincubados con 5-HD y al Dzx fue similar a la observada en los experimentos testigo, lo que indica que los cambios a nivel mitocondrial participan en la respuesta a la Tg de los cardiomiocitos PPC. La Figura 2E muestra los resultados de un experimento representativo y la Figura 2F muestra los valores promedios ( $\pm$  SEM,  $n=7$ ) de las corrientes de membrana en función del tiempo de las réplicas experimentales, confirmando el papel de los canales mitoKATP en la respuesta de los cardiomiocitos PPC a la Tg.

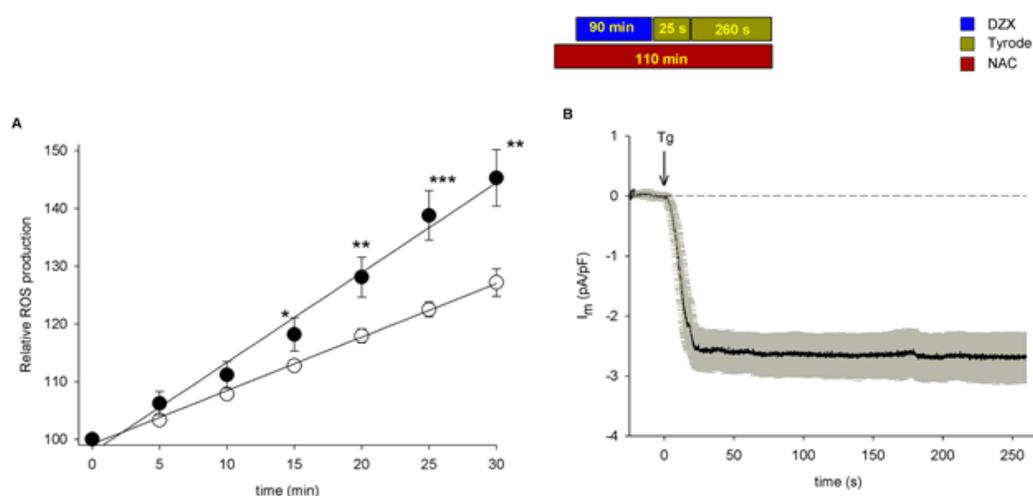


**FIGURA 2. El preconditionamiento farmacológico inhibe los SOC.** (A-B) figuras representativas de cortes transversales de corazones testigo y preconditionados las áreas de infarto se representan como áreas claras. (C) Una corriente representativa generada por la Tg y registrada a -80 mV en un cardiomiocito previamente incubado con Dzx. La flecha indica la adición de la Tg. (D) Promedio de corrientes de membrana en función del tiempo ( $\pm$  SEM, n=13) de los experimentos como en (C). (E) Corriente entrante a -80 mV generada por la Tg (flecha) en un cardiomiocito preconditionado previamente incubado 5-HD. (F) Valores promedio de las corrientes de membrana en función del tiempo ( $\pm$  SEM, n = 7) de los experimentos como en (E). Paneles izquierdos: protocolos experimentales.

### 10.3 LA INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC DEPENDE DE LAS ROS

La apertura de los canales mitoKATP por el Dzx conduce a una mayor producción de ROS en los cardiomiocitos (González *et al.*, 2010) y en las células no excitables, los canales Orai1 son inactivados por las ROS (Bogeski *et al.*, 2010). Por lo tanto, probamos la hipótesis de que la inhibición de las corrientes de SOC en los cardiomiocitos PPC (Figura 2) se debe a la inactivación de Orai1 por las ROS. Primero, verificamos que la producción de las ROS aumenta debido al PPC. La

Figura 3A muestra que, en nuestras condiciones experimentales, la producción de las ROS aumentó en los cardiomiocitos previamente incubados con Dzx en relación con la de los cardiomiocitos testigo, lo que confirma observaciones anteriores hechas por nuestro grupo de trabajo (González *et al.*, 2010). A continuación, probamos el efecto del NAC sobre la inhibición de las SOC por el PPC. La Figura 3B muestra los valores promedio de las corrientes de membrana registradas a partir de cardiomiocitos PPC pretratados con NAC. Las corrientes fueron similares a las observadas para los cardiomiocitos testigo (Figura 1B), lo que indica la participación de las ROS en la inhibición de los SOC en los cardiomiocitos precondicionados.

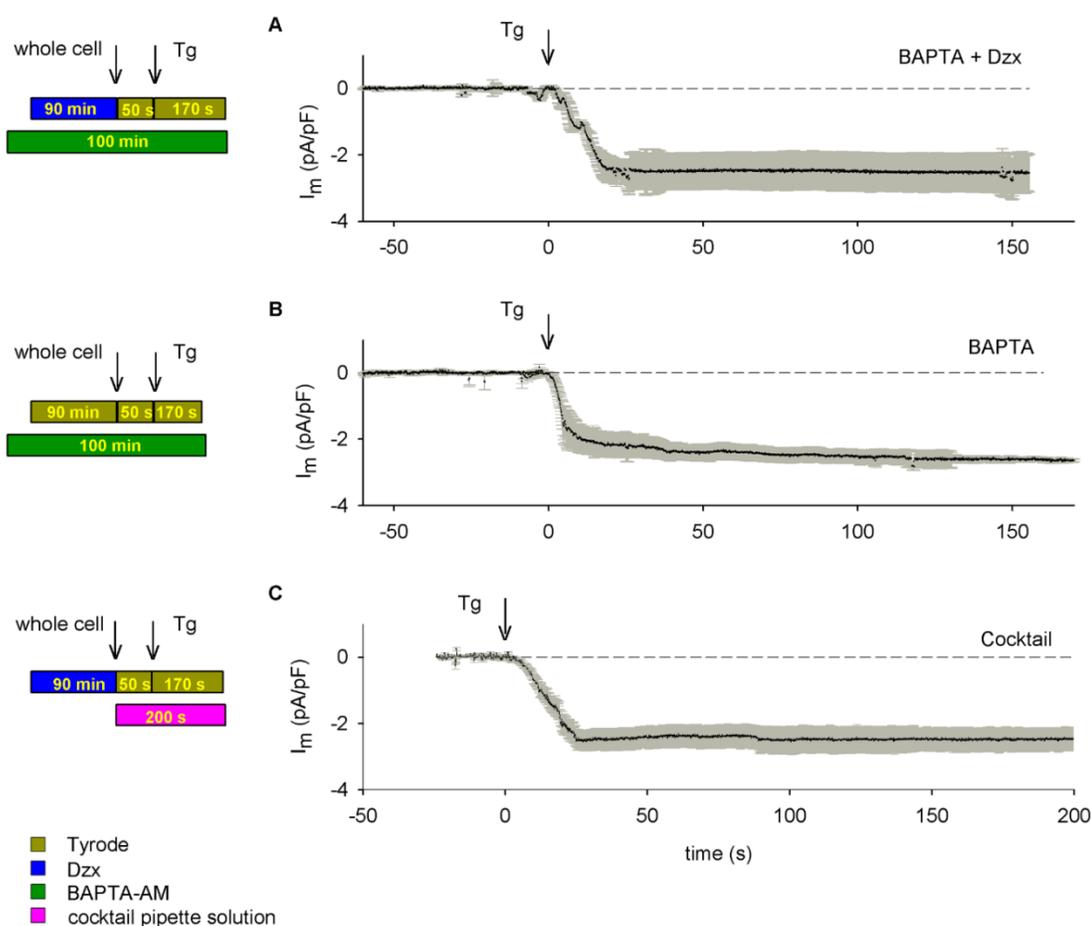


**FIGURA 3. La inactivación de los SOC depende de las ROS.** (A) Promedio ( $\pm$  SEM) de la producción de ROS en células testigo (círculos blancos,  $n=17$ ) y cardiomiocitos PPC (círculos negros,  $n=10$ ) en función del tiempo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) El efecto del NAC sobre las corrientes de los SOC en los cardiomiocitos PPC. Promedio de las corrientes de membrana a  $-80$  mV en función del tiempo ( $\pm$  SEM,  $n = 5$ ). Paneles inferiores: protocolo experimental.

#### 10.4 LA INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC DEPENDE DEL $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR

Los SOC son inactivados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Zweifach y Lewis, 1995a). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que, además de las ROS, en el precondicionamiento un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la vecindad de los SOC contribuye a su inactivación. Para probar esta hipótesis, amortiguamos el  $\text{Ca}^{2+}$  mioplásmico con BAPTA-AM y descubrimos en estas condiciones que las corrientes de los SOC no

son inhibidas por el agotamiento del RS provocado por la Tg, como se observó en los cardiomiocitos testigo. La Figura 4A resume los resultados de varios experimentos. Además, verificamos que el BAPTA-AM por sí solo, tuvo poco efecto sobre las corrientes generadas en los cardiomiocitos testigo (Figura 4B). Trabajos previos realizados en células no excitables han demostrado que las mitocondrias son necesarias para la activación fisiológica de los SOC y que el almacenamiento de calcio mitocondrial puede mantenerse al incluir en la pipeta de *patch*, una solución *cocktail* que mantiene las mitocondrias en un estado energizado (Gilbert y Parekh, 2000; Glitsch *et al.*, 2002). Para probar la posibilidad de que la disminución en la activación de los SOC en el PPC esté relacionada con una disminución en el estado energizado de las mitocondrias, probamos la solución energizante en cardiomiocitos precondicionados y descubrimos que en estas condiciones las corrientes mediadas por los SOC no eran inhibidas (Figura 4C).

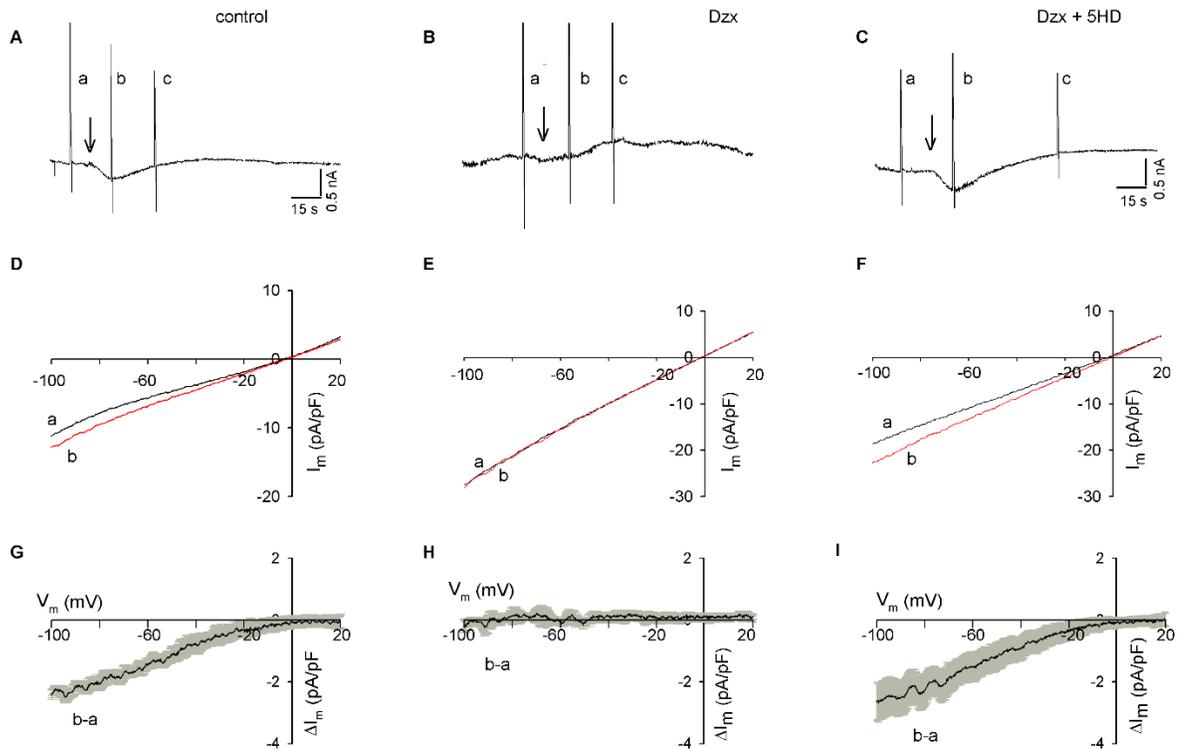


**FIGURA 4. El BAPTA-AM y las mitocondrias energizadas evitan la inactivación de las corrientes a través de los SOC en células precondicionadas. (A) Promedio**

de las corrientes de membrana en función del tiempo ( $\pm$  SE,  $n=5$ ) en cardiomiocitos previamente incubados con Dzx y BAPTA-AM. (B) promedio de las corrientes de membrana en función del tiempo ( $\pm$  SEM,  $n=6$ ) en células testigo que muestran que el BAPTA-AM por sí solo no tiene efectos importantes sobre las corrientes internas generadas por la Tg. (C) Promedio de las corrientes de membrana en función del tiempo registrado utilizando la solución de pipeta suplementada con el cóctel energizante en cardiomiocitos pretratados con Dzx ( $\pm$  SEM,  $n=6$ ). Potencial de mantenimiento =  $-80$  mV en los paneles A-C. Paneles izquierdos: protocolos experimentales.

## 10.5 INHIBICIÓN DE LOS SOC POR EL PPC A DIFERENTES POTENCIALES

Las corrientes de membrana se registraron a diferentes potenciales aplicando rampas de voltaje. La Figura 5A-C muestra tres experimentos representativos. En la Figura 5A, se aplicaron tres rampas (a-c) a un cardiomiocito testigo utilizando un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV, y se agregó Tg después de la primera rampa (flecha). Observamos el desarrollo de una corriente entrante, que disminuyó espontáneamente. El papel de los canales mitoKATP fue comprobado por el uso del 5-HD en los cardiomiocitos precondicionados, como se muestra en la Figura 5C. Al bloquearse al mitoKATP se desarrolló una corriente entrante al agregar la Tg y ésta disminuyó espontáneamente con la aplicación de rampas de voltaje, como en los cardiomiocitos testigo (Figura 5A). En la figura 5A-C se muestran las curvas de corriente-voltaje (I-V, en la Figura 5D-F los trazos en negros representan las curvas I-V antes de la Tg, y los trazos en rojos representan las relaciones I-V después de la Tg. Para estimar las relaciones I-V de las corrientes SOC activadas por la Tg, a las corrientes después de de la Tg (b) se les restaron las de antes de la Tg (a); Los resultados de las corrientes netas de los SOC se resumen en la Figura 5G-I. En los experimentos testigo, el agotamiento del  $Ca^{2+}$  del RS debido a la Tg, activó corrientes con una fuerte rectificación entrante. En los cardiomiocitos precondicionados, las corrientes antes y después de la Tg fueron casi idénticas, lo que indica la inhibición de los SOC en estas condiciones (Figura 5H), sin embargo, este efecto fue bloqueado por el 5-HD (Figura 5I).

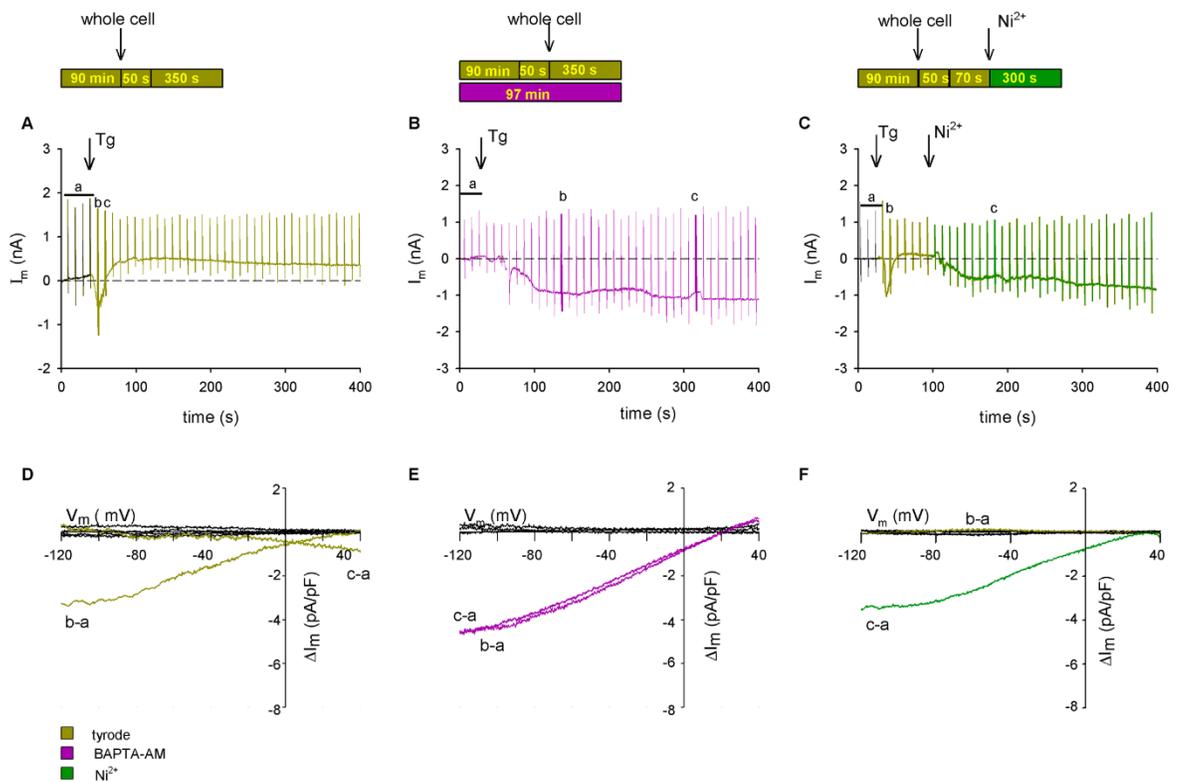


**FIGURA 5. Efecto del PPC en las corrientes de los SOC sobre la aplicación de rampas de voltaje.** (A-C) Registros continuos de las corrientes de membrana en condiciones testigo (A), pretratadas con DzX (B) y pretratadas con DzX y 5-HD (C). Las flechas indican la adición de Tg. Potencial de mantenimiento =  $-80$  mV. (D-F) curvas I-V (trazos a y b) correspondientes a los experimentos ilustrados en (A-C). Obsérvese que la adición de la Tg aumenta los valores de las corrientes de membrana en valores de voltaje negativos (D y F) pero no tiene efecto en células precondicionadas DzX (E). (G-I) Promedio ( $\pm$  SEM,  $n = 4-8$ ) de las corrientes generadas por la Tg (b-a) en función del potencial de membrana de experimentos como en (D-F).

## 10.6 INACTIVACIÓN DE LOS SOC DEPENDIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$ Y DEL INTERCAMBIADOR DE SODIO-CALCIO (NCX)

Nos planteamos la hipótesis de que los cambios en el potencial de membrana durante la aplicación de rampas aumentarían la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las proximidades de los SOC, promoviendo así su inactivación. Para probar esta hipótesis, se aplicaron rampas de voltaje cada 10 s, primero en la solución de Tyrode y después de la adición de la Tg. La Figura 6A muestra un experimento representativo. La Tg generó una corriente entrante, como se muestra en la Figura 5A, pero no se mantuvo y se invirtió en las rampas sucesivas. Sin embargo, cuando

se aplicó el mismo protocolo de rampa a los cardiomiocitos previamente incubados en BAPTA-AM, la corriente interna no se inactivó, lo que indica la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de inactivación (Figura 6B). Posteriormente, probamos la hipótesis de que la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  que media la inactivación de los SOC tras la aplicación de las rampas era el intercambiador sodio-calcio (NCX). Para probar esta hipótesis utilizamos  $\text{Ni}^{2+}$ , un bloqueador del NCX. La Figura 6C muestra los resultados de un experimento representativo. Los cardiomiocitos se mantuvieron en un potencial de membrana de -80 mV y se utilizó un protocolo idéntico al descrito en la Figura 6A-B. La Tg evocó una corriente entrante y esta corriente fue inactivada completamente por las rampas sucesivas. La adición de  $\text{Ni}^{2+}$  (flecha) restauró las corrientes de los SOC. La relación corriente-voltaje (I-V) de los experimentos mostrados en la Figura 6A-C se ilustran en la Figura 6D-F. Se promediaron las corrientes antes de la adición de la Tg (indicada por la letra "a" en la Figura 6A-C), y este promedio se restó de las corrientes generadas tras la adición de la Tg (indicado por las letras b-c). En los cardiomiocitos testigo, solo la primera rampa generó una corriente de SOC (Figura 6D), como en la Figura 5G. sin embargo, en los cardiomiocitos testigo tratados con BAPTA-AM, se generaron corrientes de SOC durante todo el tiempo de registro (Figura 6E). Además, en los cardiomiocitos testigo, el  $\text{Ni}^{2+}$  eliminó la inactivación de las corrientes SOC generadas por las rampas (Figura 6F).

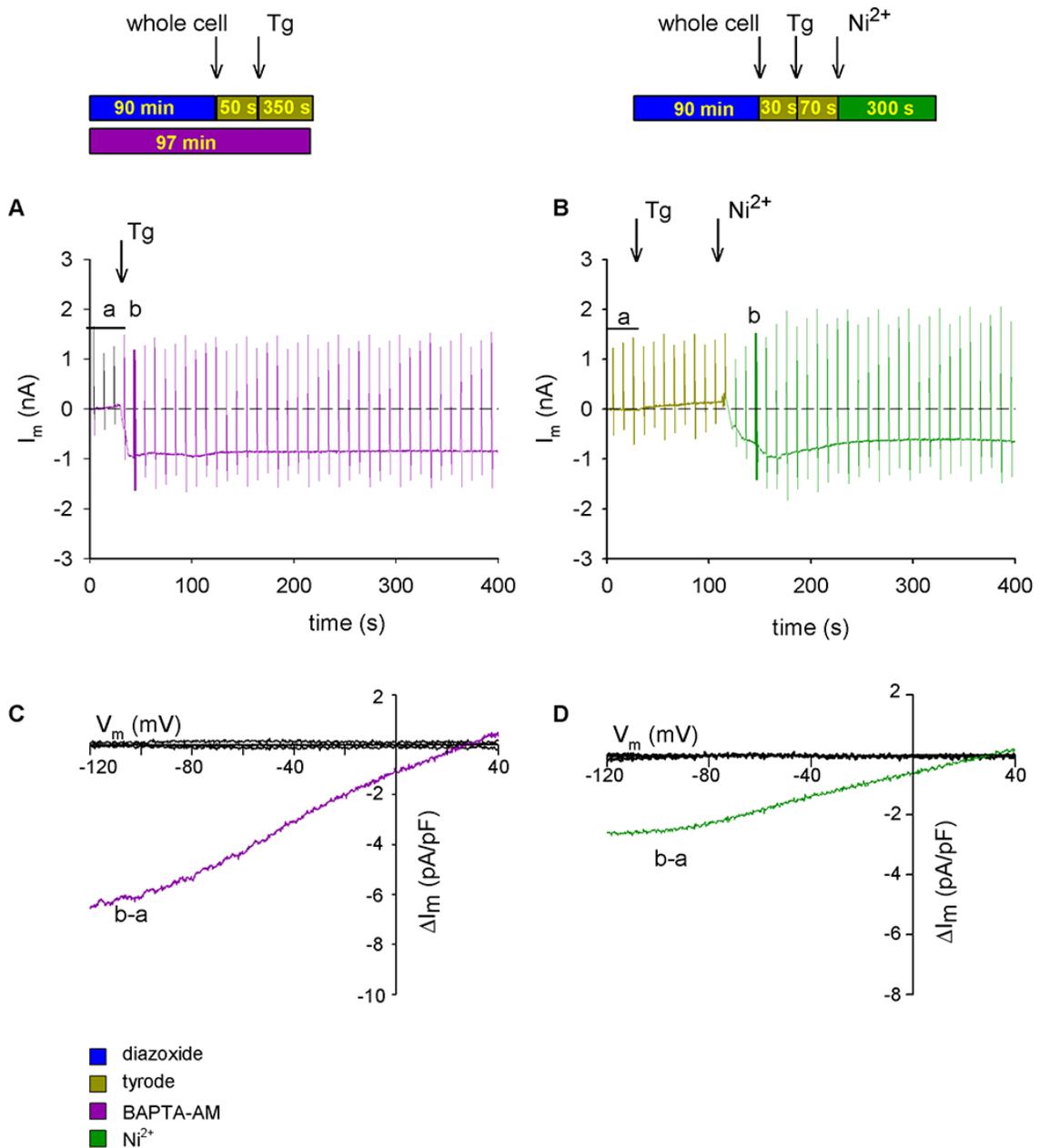


**FIGURA 6. El BAPTA-AM y el  $Ni^{2+}$  evitan la inactivación de los SOC mediante rampas de voltaje.** (A) Registro representativo de las corrientes de membrana en un cardiomiocito testigo. Las rampas de voltaje se aplicaron cada 10 s. La flecha indica la adición de la Tg. (B) Un experimento similar al que se muestra en (A) pero con un cardiomiocito preincubado con BAPTA-AM. (C) registro representativo de las corrientes de membrana de un cardiomiocito previamente incubado como se muestra en (A). Se añadió  $Ni^{2+}$  en el momento indicado (flecha). Paneles superiores: protocolos experimentales. Potencial de mantenimiento =  $-80$  mV en (A-C). (D-F) Relaciones I-V de las corrientes restadas de los experimentos ilustrados en los paneles (A-C). El promedio de las corrientes (indicada por la letra a) se resta de las corrientes tras la aplicación de las rampas seleccionadas, que se indican con las letras b-c en los paneles (A-C). Paneles superiores: protocolos experimentales.

## 10.7 INACTIVACIÓN DE LOS SOC DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$ EN CARDIOMIOCITOS PRECONDICIONADOS

La inactivación de los SOC dependiente de  $Ca^{2+}$  tras la aplicación de rampas de voltaje en cardiomiocitos testigo sugiere que esta inactivación también puede desempeñar un papel en la inhibición de las corrientes inducida por el PPC. Para probar esta posibilidad, realizamos los experimentos ilustrados en la Figura 7. En

los cardiomiocitos precondicionados, las corrientes entrantes generadas por la Tg estaban ausentes (Figura 2 y 5). Sin embargo, cuando se aplicó un protocolo de rampas, similar al descrito en la Figura 6 en presencia de BAPTA-AM, se registró una corriente entrante que no se inactiva en los cardiomiocitos precondicionados (Figura 7A). Además, el NCX también parece participar en la inactivación de los SOC en los cardiomiocitos precondicionados, ya que el  $\text{Ni}^{2+}$  restableció en gran medida las corrientes de SOC, como se muestra en la Figura 7B. Las Figuras 7C y D ilustran las relaciones I-V correspondientes de las corrientes sustraídas sobre las rampas seleccionadas en los experimentos que se muestran en las Figuras 7A y B, respectivamente. Las curvas I-V se obtuvieron como se describe en la Figura 6D-F.



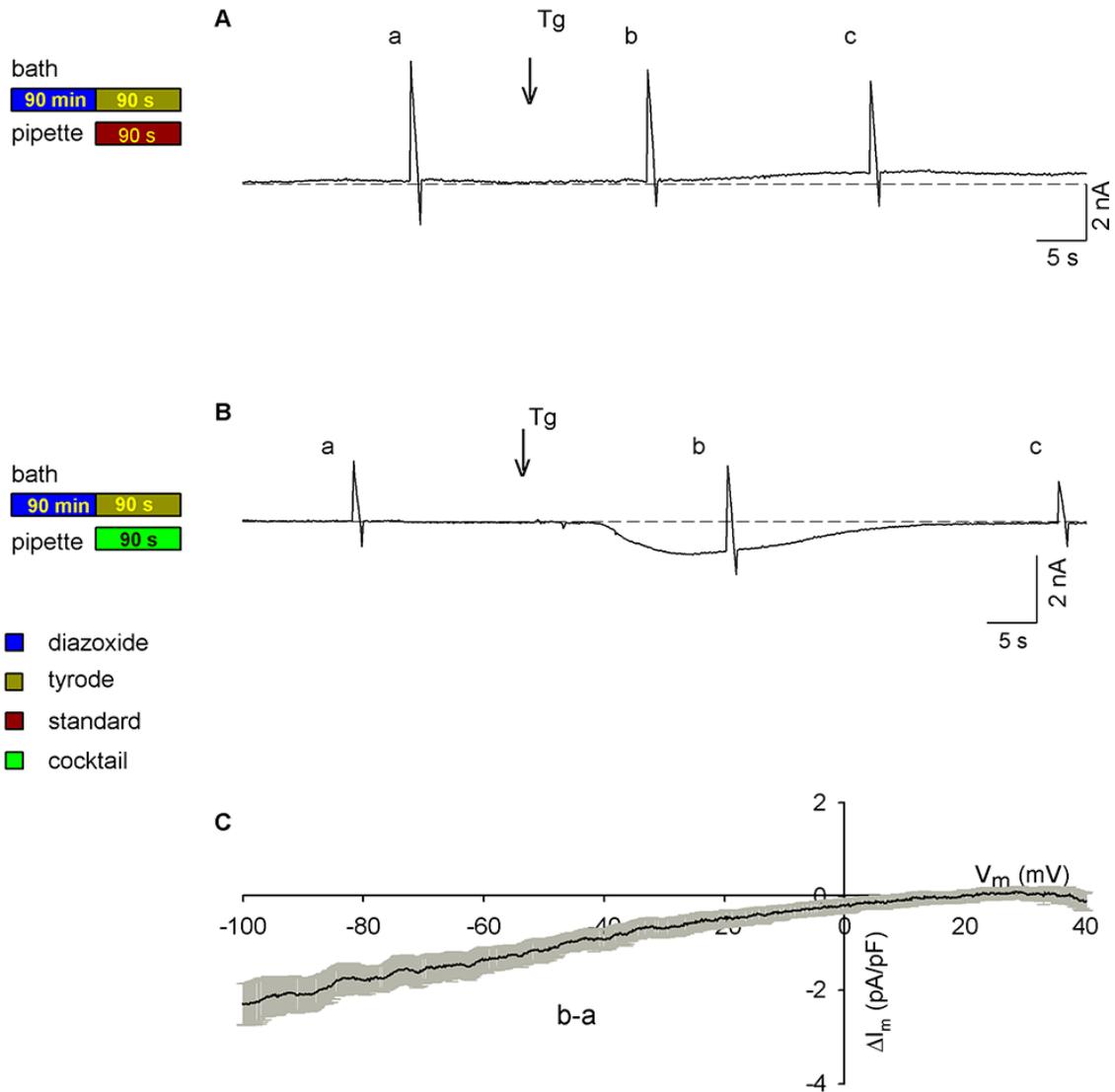
### FIGURA 7. Papel del Ca<sup>2+</sup> en la inactivación de los SOC en cardiomiocitos PPC.

(A) Registro representativo de las corrientes de membrana de un cardiomiocito PPC preincubado con BAPTA-AM. Las rampas de voltaje se aplicaron cada 10 s. La flecha indica la adición de Tg. (B) Registro representativo de las corrientes de membrana de un cardiomiocito PPC. Se añadieron Tg y Ni<sup>2+</sup> en los tiempos indicados (flechas). Paneles superiores: protocolos experimentales. Potencial de mantenimiento = -80 mV en las relaciones A y B. (C, D) Curva IV de las corrientes restadas de los experimentos ilustrados en los paneles A y B. Promedio de la corriente tras la aplicación de las rampas en condiciones testigo (indicada por la letra a) se resta de las corrientes registradas en la

aplicación de rampas seleccionadas después de añadir Tg, que se indican con la letra b en los paneles A y B. Paneles superiores: protocolos experimentales.

### **10.8 RELACIONES I-V DE CORRIENTES SOC EN CARDIOMIOCITOS PRECONDICIONADOS CON MITOCONDRIAS ENERGIZADAS**

Como se mostró anteriormente, los cardiomiocitos preconditionados con mitocondrias energizadas tienen corrientes similares a las de los cardiomiocitos testigo (Figura 4). Evaluamos si este efecto era parecido al aplicar rampas. La Figura 8A muestra un registro continuo de las corrientes de membrana en un cardiomiocito preconditionado, utilizando la solución interna estándar. Las corrientes registradas al aplicar las rampas de voltaje se indican con las letras a-c. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 5B, no se observaron corrientes entrantes. Sin embargo, se obtuvo un resultado diferente cuando se usó la solución energizante de las mitocondrias. La Figura 8B muestra los resultados de un experimento representativo, que ilustra las corrientes de SOC registradas en un cardiomiocito preconditionado. La Tg evocó una corriente entrante con una amplitud y un curso temporal similares a los registrados de cardiomiocitos no preconditionados (Figura 5A). La Figura 8C resume los resultados de varias réplicas experimentales, se ilustran las corrientes promedio netas (b-a) registradas utilizando la solución energizante en la pipeta de patch. La relación I-V fue similar a la observada para los cardiomiocitos testigo (Figura 5G).



**FIGURA 8. Activación de los SOC en cardiomiocitos PPC con mitocondrias energizadas tras la aplicación de rampas de voltaje.** (A) Registros representativos de las corrientes de membrana de cardiomiocitos pretratados con Dzx utilizando la solución interna estándar. (B) Experimento representativo en cardiomiocitos PPC usando la solución interna suplementada con el cóctel energizante. Las corrientes de membrana tras la aplicación de la rampa de voltaje se indican mediante a-c. Las flechas muestran la adición de la Tg. Potencial de mantenimiento=  $-80$  mV. (C) promedio ( $\pm$  SEM,  $n = 6$ ) de las corrientes de los SOC (b-a) en función del potencial de membrana de los experimentos como en (B). Paneles izquierdos: protocolos experimentales.

## 11 DISCUSIÓN

### 11.1 EL PPC Y LOS SOC EN EL CORAZÓN ADULTO

La muerte celular de miocardio asociada con la isquemia-reperfusión está relacionada con alteraciones importantes en el manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Murphy y Steenbergen, 2008). La protección contra las lesiones puede lograrse mediante el PPC (Sato et al., 2000; Wang et al., 2001; Pasdois et al., 2008; González et al., 2010) al abrirse los canales mitoKATP mediante el uso de fármacos como el Dzx. En este trabajo presentamos evidencia experimental novedosa en la que el PPC inhibe en gran medida la entrada de calcio operada por cisterna (SOCE) en cardiomiocitos adultos. Este resultado se obtuvo registrando las corrientes de Orai1 utilizando la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa (esta tesis) y midiendo  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con Fura-2 AM (Fuentes 2017)

La SOCE es una vía ubicua que juega un papel importante en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en células no excitables (Prakriya y Lewis, 2015) y su presencia en células excitables se ha descubierto recientemente. En el músculo esquelético se expresa STIM1 y su ausencia conduce a una disminución en la fuerza desarrollada por el músculo, una aceleración de la fatiga y la muerte perinatal en modelos murinos debida a miopatía esquelética (Stiber et al., 2008). Además, STIM1 también se expresa en el músculo cardíaco (Ohba et al., 2009; Domínguez-Rodríguez et al., 2015; Saliba et al., 2015; Zhao et al., 2015). En modelos murinos, la ablación de STIM1 en el corazón conduce a la dilatación ventricular (Collins et al., 2014), reduce la contractilidad del ventrículo izquierdo y disminuye el acortamiento de los cardiomiocitos aislados (Parks et al., 2016). Además de la presencia de STIM1, los canales Orai1 también se expresan en el músculo cardíaco, y su expresión se ha detectado a nivel de la proteína mediante la técnica de *Western blot* (Ohba et al., 2009; Horton et al., 2014; Domínguez-Rodríguez et al., 2015; Saliba et al., 2015). En el modelo de pez cebra, la deficiencia de Orai1 en los cardiomiocitos produce insuficiencia cardíaca grave, una función sistólica ventricular reducida y bradicardia (Völkens et al., 2012). En cardiomiocitos neonatales de rata, la SOCE es prominente después de la depleción del RS, como lo demuestra el registro de las corrientes de los SOC y la medición del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Ohba et al., 2009; Ji et al., 2017). En los cardiomiocitos adultos, la expresión de los SOC y STIM1 es menor que en los

cardiomiocitos neonatales (Luo *et al.*, 2012). Sin embargo, se han podido registrar las corrientes de los SOC que muestran rectificación interna y se han observado cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tras la depleción del RS utilizando Tg (Hunton *et al.*, 2004; Saliba *et al.*, 2015, pero vea Zhao *et al.*, 2015). Nuestros resultados muestran la presencia de corrientes entrantes de SOC como resultado de la depleción del RS, que se identificaron por sus propiedades electrofisiológicas y su sensibilidad al GSK-7975-A, un compuesto selectivo que bloquea completamente a los canales Orai1 a  $10 \mu\text{M}$  (Derler *et al.*, 2013; Molnár *et al.*, 2016).

Los SOC en el corazón también se han asociado con enfermedades cardíacas, desempeñando un papel en el desarrollo de la hipertrofia en los cardiomiocitos tanto neonatales como adultos (Hunton *et al.*, 2002; Ohba *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2017). Tanto STIM1 como Orai1 juegan un papel clave en la regulación del crecimiento cardíaco hipertrófico. La sobreexpresión de STIM1 en ratones conduce a un incremento de calcio en las células. También conduce a la expresión de genes fetales y a la hipertrofia cardíaca y/o muerte súbita cardíaca (Correll *et al.*, 2015). Además, se ha descrito que el eliminar la expresión de Orai1 tiene un efecto benéfico evitando el desarrollo de la hipertrofia en cardiomiocitos neonatales (Voelkers *et al.*, 2010).

## 11.2 LAS ROS Y LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES ORAI1

Las mitocondrias son una fuente de producción de ROS, y existe evidencia de que la apertura de los canales mitoKATP modula el estado redox mitocondrial y la producción de las ROS (Liu *et al.*, 1998; Pasdois *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010). Las ROS están involucradas no sólo en procesos patológicos, sino también en fenómenos fisiológicos normales (Dröge 2002) como el preconditionamiento (González *et al.*, 2010). Los canales Orai1 son sensibles a los estados redox. En un trabajo previo sobre los linfocitos T se ha demostrado que la actividad del canal Orai1 disminuye con las ROS. La sensibilidad redox de Orai1 depende principalmente de la Cys195 localizada extracelularmente, además, está ausente en los Orai3 (Bogeski *et al.*, 2010; Saul *et al.*, 2016), una isoforma que también se expresa en los cardiomiocitos (Saliba *et al.*, 2015). Las ROS también alteran otras proteínas relacionadas con el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cardíacas. Por

ejemplo, las ROS activan al receptor de rianodina tipo 2 e inhiben a la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS (Zima y Blatter, 2006; Nikolaienko *et al.*, 2018). En el presente estudio, confirmamos que la producción de ROS aumenta debido al PPC y descubrimos que la inhibición de las corrientes Orai1 fue impedida por el NAC, una molécula antioxidante que reacciona con los radicales hidroxilos y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aruoma *et al.*, 1989), lo que sugiere que el PPC inhibe los SOC a través de las ROS.

### **11.3 LAS MITOCONDRIAS JUEGAN UN PAPEL EN LA INACTIVACIÓN DEPENDIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$ DE LOS CANALES ORAI1**

Los SOC son fuertemente inactivados por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Prakriya y Lewis, 2015); por lo tanto, la amplitud y la duración de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los SOC depende de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en sus microdominios. La inactivación rápida y lenta dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SOC se ha descrito que tienen una duración de milisegundos y segundos, respectivamente (Zweifach y Lewis, 1995a,b). Entre las tres isoformas de Orai que se han caracterizado, sólo Orai1 muestra una inactivación significativamente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lis *et al.*, 2007). Nuestros experimentos demostraron que, en los cardiomiocitos, las corrientes Orai1 no se inactivaron cuando las células se mantuvieron a un potencial de -80 mV. Sin embargo, cuando se aplicaron las rampas de voltaje, las corrientes se inactivaron en segundos, un efecto que fue impedido por el BAPTA-AM un búfer rápido de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que sugiere que se produjo un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  interno en los microdominios del canal Orai1. Es probable que el NCX esté funcionando en el modo inverso (Khananshvili 2014) y que proporcione una fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  que inactive los SOC en la aplicación de las rampas.

El movimiento de calcio por el NCX es electrogénico y su dirección depende del gradiente electroquímico del sodio, intercambiando 3 iones de sodio por uno de calcio.

El intercambio electrogénico de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  puede ocurrir ya sea en el modo directo (salida de  $\text{Ca}^{2+}$ ) o inverso (entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ). La direccionalidad del flujo neto de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de las concentraciones citosólicas y extracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y del potencial de membrana (Khananshvili *et al.*, 2014).

Al igual que con otras proteínas de transporte, la cantidad y la dirección del transporte dependen de los gradientes de sustrato transmembrana. Este hecho puede ser protector porque los aumentos en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden activar el intercambiador en su forma reversa.

Para calcular el potencial de inversión del NCX utilizamos la siguiente ecuación (Khananshvili *et al.*, 2014):

$$E_{\text{NCX}} = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}} = (RT/F) \ln \left\{ \frac{([\text{Na}_o]^3 [\text{Ca}_o])}{([\text{Na}_i]^3 [\text{Ca}_i])} \right\}$$

ecuación 1.

En dónde:

$R$  es la constante universal de los gases y es igual a  $8.314 \text{ JK}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

$T$  es la temperatura en Kelvin.

$z$  es la valencia de las especies iónicas.

$F$  es la constante de Faraday y es igual a  $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$

$[X]_o$  es la concentración de la especie iónica  $X$  en el fluido extracelular.

$[X]_i$  es la concentración de la especie iónica  $X$  en el líquido intracelular.

Datos:

Concentración extracelular (datos experimentales):

Sodio 137 mM

Calcio 1.8 mM

Concentración intracelular (datos teóricos):

Sodio 10 mM

Calcio 0.05 mM

(Mullins 1979)

Temperatura de registro= 291.15 K

Resultados:

*Sustituyendo en la ecuación 1*

$E_{\text{NCX}} = -36.51 \text{ mV}$

Por lo tanto, el potencial al cual se invierte la función del NCX es a -36.51 mV, este potencial se encuentra en el rango de voltaje que se utiliza en la rampa (+50 mV a -120 mV).

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) transporta  $\text{Ca}^{2+}$  a cambio de  $\text{Na}^+$  bidireccionalmente a través de la célula (Blaustein *et al.* 1999). La fuerza impulsora del transportador depende del gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , el potencial de membrana y la estequiometría de  $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ . La estequiometría del NCX fue generalmente aceptada como 3:1, en la tabla 1 se citan trabajos que respaldan estas observaciones.

Estequiometría	Materiales	Métodos	Referencias
4:1	n.a	Cálculo teórico	(Mullins 1977)
3:1	Vesículas ventriculares de perro	Flujo de iones	(Pitts 1977)
3:1	Ventrículos de ratón y células N-18	Flujo de iones	(Wakabayashi <i>et al.</i> 1981)
2.5:1	Ventrículo ovino y tejido de Purkinje	Flujo de iones	(Sheu <i>et al.</i> 1982)
3:1	Células ventriculares de cobayo	Flujo de iones	(Reeves <i>et al.</i> 1984)
3:1	Células ventriculares de cobayo	<i>Whole-cell clamp</i>	(Kimura <i>et al.</i> 1987)
3:1	Células ventriculares de cobayo	<i>Whole-cell clamp</i>	(Ehara <i>et al.</i> 1989)
3:1	Células ventriculares de cobayo	<i>Whole-cell clamp</i>	(Crespo <i>et al.</i> 1990)
3:1	Células ventriculares de cobayo	<i>Whole-cell clamp</i>	(Yasui <i>et al.</i> 1990)
3:1	Células ventriculares de cobayo	Patch gigante ( <i>Giant patch</i> )	(Matsuoka <i>et al.</i> 1992)
4:1 o variable	Células ventriculares de cobayo	<i>Macro patch</i>	(Fujioka <i>et al.</i> 2000)
3:1	Células de insecto transfectadas con NCX	Flujo de iones	(Szerencsei <i>et al.</i> 2001)

4:1	Células HEK transfectadas con NCX	<i>Whole-cell clamp</i>	(Dong <i>et al.</i> 2002)
3:1	Células ventriculares de cobayo	<i>Whole-cell clamp</i>	(Hinata <i>et al.</i> 2002)
3.2:1	Células ventriculares de cobayo y Células BHK transfectadas con NCX	<i>Patch gigante (Giant patch)</i>	(Kang <i>et al.</i> 2004)

Cuando la corriente de membrana generada por el NCX fue registrada en miocitos cardíacos, el potencial de inversión de la corriente de NCX ( $E_{NCX}$ ) fue consistente con una estequiometría 3:1, esto fue uno de los criterios para identificarla (Kimura 1986). Además, Ehara y col. 1989 confirmaron el potencial de inversión de la corriente del NCX a una estequiometría de 3:1. Sin embargo, ambos grupos notaron que el potencial de inversión de la corriente del NCX cambiaba con el potencial de mantenimiento.

Kang y col. 2004 propusieron una nueva teoría de que  $1Na^+:1Ca^{2+}$  también pueden transportarse en cualquier dirección a cambio de 3  $Na^+$  a través del NCX, y por lo tanto la estequiometría no es exactamente 3:1 sino 3.2:1. Sin embargo, dado que su experimento se realizó sin cambios en el potencial de mantenimiento, es necesaria una evaluación cuidadosa debido a posibles problemas de acumulación/agotamiento iónico.

Uno de los trabajos clave para comprobar la estequiometría 3:1 fue el realizado por el grupo de investigación de Hinata y col. 2002, quienes exploraron la corriente de membrana producida por el NCX durante cambios en el potencial de mantenimiento, observaron que en esta condición el potencial de inversión cambiaba, demostrando una gran capacidad del NCX, que transporta y acumula  $Ca^{2+}$  hasta el punto de cambiar una aparente estequiometría.

Si bien el intercambiador normalmente funciona en la posición de flujo de salida de  $Ca^{2+}$  (con la excepción de un potencial de acción temprano), ciertas condiciones pueden cambiar el intercambiador a la posición inversa (flujo de entrada de  $Ca^{2+}$ , flujo de  $Na^+$ ). A continuación, se enumeran varias condiciones celulares y farmacéuticas en las que esto sucede (Bers 2002):

- El  $[Na^+]$  interno es más alto de lo normal (como con inhibidores la bomba de  $Na^+/K^+$ -ATPasa).
- Otros canales de entrada de  $Ca^{2+}$  están inhibidos.
- Si la duración del potencial de acción se prolonga.

En mi preparación utilicé un inhibidor de la bomba de  $Na^+/K^+$ -ATPasa (ouabaína), además de un bloqueador de los canales de calcio tipo L (verapamilo), lo cual puede contribuir a que el NCX funcione en su modo inverso.

En nuestras condiciones experimentales comprobamos que las corrientes de Orai se restablecieron parcialmente después de la adición de  $Ni^{2+}$ , un bloqueador del NCX (Hinata *et al.*, 2002). Se espera que la entrada de  $Ca^{2+}$  por parte de NCX inactive Orai1 si el canal se encuentra en su proximidad, lo que permite un enlace funcional entre Orai1 y NCX, es decir, que el NCX regula a los SOC. La ausencia de corrientes SOC en los experimentos realizados por Zhao y col. 2015 puede explicarse ya que solo usaron rampas para registrar las corrientes de membrana y no realizaron registros continuos en el potencial de mantenimiento. Por lo tanto, los canales Orai1 probablemente se inactivaron en estos cardiomiocitos. La interacción entre los SOC y el NCX puede ser recíproca, ya que la caída de STIM1 produce una inhibición significativa de las corrientes mediadas por el NCX en las células del músculo liso de las vías respiratorias (Liu 2010).

Las mitocondrias son participantes activos en la señalización intracelular de  $Ca^{2+}$  y se oponen a la inactivación lenta de los SOC al amortiguar  $Ca^{2+}$  y, por lo tanto, compiten con los sitios de inactivación por  $Ca^{2+}$  (Gilabert 2000; Prakriya 2015). En las células no excitables, las mitocondrias ubicadas cerca de los SOC en la membrana plasmática almacenan cantidades considerables de  $Ca^{2+}$  a través del canal mitocondrial de  $Ca^{2+}$  (*uniporter*) y regulan los microdominios de  $Ca^{2+}$  (Hoth *et al.*, 1997; Gilabert 2000; Gilabert *et al.*, 2001). De acuerdo con este papel de las mitocondrias, se ha descrito que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los SOC en las células Jurkat se reduce cuando la capacidad de amortiguamiento de las mitocondrias se ve comprometida por la despolarización de su potencial de membrana asociado a la apertura de los canales mitoKATP debido al Dzx (Holmuhamedov *et al.*, 1999; Holmuhamedov *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2008) o en

condiciones de desenergización (Hoth *et al.*, 1997; Hoth *et al.*, 2000). El uso de una solución de energizante (*cocktail*) en la pipeta de *patch* retrasa el proceso de inactivación lenta de los SOC y reduce su grado de inactivación (Gilbert 2000). En los cardiomiocitos PPC, notamos que, con el uso de una solución de pipeta energizante, las corrientes de los SOC se recuperaron de la inactivación cuando se mantuvieron a un voltaje de -80 mV, e incluso con la aplicación de rampas. Por lo tanto, es probable que las mitocondrias también sean esenciales para la activación del flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el PPC. De acuerdo con esta posibilidad, se ha demostrado que, en los cardiomiocitos adultos, las mitocondrias ocupan al menos el 30% del volumen celular, y una fracción significativa de las mitocondrias se encuentra en la región próxima a la membrana plasmática (Piquereau *et al.*, 2013), lo que les permite interactuar con los canales de membrana. De hecho, trabajos anteriores han demostrado que las mitocondrias juegan un papel importante en la inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los canales Cav1.2 en cardiomiocitos adultos (Sánchez *et al.*, 2001).

#### **11.4 IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA INHIBICIÓN DE LOS SOC INDUCIDA POR EL PPC**

Se ha descrito que la glucosamina, un inhibidor de los SOC (Hunton *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2013), ofrece una protección sustancial contra el daño por isquemia-reperfusión (Liu *et al.*, 2006), lo que sugiere que los SOC juegan un papel en la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Collins *et al.*, 2013). Además, el papel de los SOC en la isquemia-reperfusión se puede atribuir a que en la isquemia-reperfusión hay una disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS (Valero *et al.*, 2008), por lo que se espera que se produzca la activación de la SOCE.

### **12. CONCLUSIÓN**

Nuestros principales hallazgos en este trabajo son que el PPC produce una gran inhibición de las corrientes a través de los SOC y que este efecto se debe a la inactivación de los canales Orai1, dependiente de las ROS y del  $\text{Ca}^{2+}$ . Las mitocondrias juegan un papel clave en estas observaciones porque las corrientes Orai1 se restauraron cuando se mantuvieron las mitocondrias en el estado energizado. Además, el NCX contribuye como una fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  para la

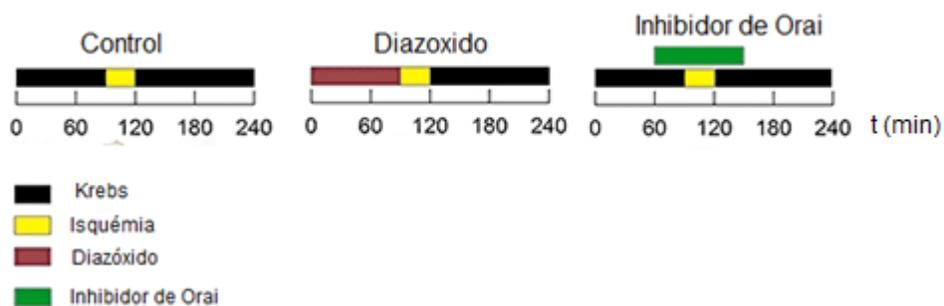
inactivación de los SOC. Este estudio sugiere que los efectos benéficos del PPC durante la isquemia-reperfusión se pueden explicar en parte por una disminución de la SOCE a través de los SOC. Aunque los experimentos se realizaron en células individuales, es posible que haya cambios similares por PPC en los corazones completos, pero claramente, esto debe estudiarse en nuevas investigaciones. Dada la importancia clínica para proteger el corazón del daño por isquemia-reperfusión, es relevante una comprensión detallada de los mecanismos celulares subyacentes al PPC para desarrollar estrategias terapéuticas que contribuyan a la cardioprotección.

### 13. PERSPECTIVAS

Si bien nuestro trabajo contribuye a ampliar la información referente al manejo del calcio en células precondicionadas, aún hay preguntas sumamente interesantes que pueden ser abordadas, entre ellas:

- ¿Cuál es el papel del canal Orai en el modelo de PPC en corazones completos?

Para poder abordar esta pregunta sugeriría utilizar una estrategia similar a la utilizada por Gonzalez et al., (2010), en corazones aislados de rata, utilizando el aparato de Langendorf (como se describió en anteriormente en el apartado de métodos), los experimentos se realizarán en los siguientes grupos experimentales, a los que se le evaluará el área de infarto.



Adicionalmente, se debería realizar experimentos funcionales de órgano completo, como ECG y medición de presión intraventricular, así como evaluación bioquímica de lacto deshidrogenasa.

### 14. REFERENCIAS

- Ardehali H, and O'Rourke B. (2005). Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 7–16. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.12.003.
- Armstrong SC, Kao R, Gao W, Shivell LC, Downey JM, Honkanen RE, & Ganote CE. (1997). Comparison of in vitro preconditioning responses of isolated pig and rabbit cardiomyocytes: Effects of a protein phosphatase inhibitor, fostriecin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(11), 3009–3024. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0507>.
- Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV, Demaurex N. (2001). Mitochondria recycle Ca<sup>2+</sup> to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem* 276:29430 –29439.
- Arstall MA, Zhao, Y. Z., Hornberger, L., Kennedy, S. P., Buchholz, R. A., Osathanondh, R., & Kelly, R. A. (1998). Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(5), 1019–1025. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0666>.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., and Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 593–597.
- Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G. (1992). Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 263: H887-H894.
- Auchampach JA, Gross GJ. (1993). Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 264: H1327-H1336.
- Auchampach JA, Maruyama M, Cavero I. (1992). Pharmacological evidence for a role of ATP - dependent potassium channels in myocardial stunning. *Circulation*; 86: 311-319.
- Auchampach JA, Maruyama M, Cavero I. (1991). The new K<sup>+</sup> channel opener aprikalim (RP25891) reduces experimental infarct size in dogs in the absence of hemodynamic changes. *J Pharmacol Exp Ther*; 259: 961-967.
- Avkiran M. (1999). Protection of the myocardium during ischemia and reperfusion. Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> exchange inhibition versus ischemic preconditioning. *Circulation*; 100: 2469-2472.
- Avkiran M. (1999). Rational basis for use of sodium-hydrogen exchange inhibitors in myocardial ischemia. *Am J Cardiol*; 83:10G -18G.
- Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M, Kurosaki T. (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16704–16709.
- Baba Y, Nishida K, Fujii Y, Hirano T, Hikida M, Kurosaki T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat Immunol* 9:81–88.
- Baines CP, Liu GS, Birincioglu M. (1999). Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 276: H1361 -H1368.
- Bakowski D, Parekh AB. (2007). Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr Biol* 17: 1076 –1081.
- Baudet S, Shaoulian R, Bers DM. (1993). Effects of thapsigargin and cyclopiazonic acid on twitch force and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content of rabbit ventricular muscle.
- Baxter GF, Marber MS, Patel VC. (1994). Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation*; 90: 2993-3000.

Baxter, G. F., Marber, M. S., Patel, V. C., & Yellon, D. M. (1994). Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation*, 90(6), 2993–3000. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.6.2993>.

Beavis AD. (1992). Properties of the inner membrane anion channel in intact mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*; 24: 77-90.

Bergsmann J, Derler I, Muik M, Frischauf I, Fahrner M, Pollheimer P, Schwarzinger C, Gruber HJ, Groschner K, Romanin C. (2011). Molecular determinants within N terminus of Orai3 protein that control channel activation and gating. *J Biol Chem* 286:31565– 31575.

Berna-Erro A, Braun A, Kraft R, Kleinschnitz C, Schuhmann MK, Stegner D, Wulsch T, Eilers J, Meuth SG, Stoll G, Nieswandt B. (2009). STIM2 regulates capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal* 2: ra6.

Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415 (6868): 198–205. [doi:10.1038/415198a](https://doi.org/10.1038/415198a).

Bers. D.M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198-205. [doi:10.1038/415198a](https://doi.org/10.1038/415198a).

Bigger JT Jr, Fleiss JL, Kleiger R. (1984). The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in the 2 years after myocardial infarction. *Circulation*; 69: 250 -258.

Blaustein MP, Lederer WJ. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*;79:763–854.

Bogeski I, Kilch T, Niemeyer BA. (2012). ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J Physiol* 590:4193– 4200.

Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E. C., Koehler, R., Kozai, D., et al. (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci. Signal*. 3, ra24. [doi:10.1126/scisignal.2000672](https://doi.org/10.1126/scisignal.2000672).

Bolli R, Marban E. (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*; 79: 609-634.

Bolli R. (2001). Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*; 33: 1897 -1918.

Botsford MW, Lukas A. (1998). Ischemic preconditioning and arrhythmogenesis in the rabbit heart: effects on epicardium versus endocardium. *J Mol Cell Cardiol*; 30: 1723-1733.

Bouwman, R. A., Salic, K., Padding, F. G., Eringa, E. C., van Beek-Harmsen, B. J., Matsuda, T., et al. (2006). Cardioprotection via activation of protein kinase C-delta depends on modulation of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Circulation* 114, 1226-232. [doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000570](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000570).

Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B. (2009). Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* 113:2056 –2063.

Bugge E, Ytrehus K. (1995). Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart: a protection additive to ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*; 29: 269 -274.

Cai X. (2007). Molecular evolution and structural analysis of the Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel subunit, Orai. *J Mol Biol* 368:1284–1291.

- Castaldo, P., Macri, M. L., Lariccia, V., Matteucci, A., Maiolino, M., Gratteri, S., et al. (2017). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger 1 inhibition abolishes ischemic tolerance induced by ischemic preconditioning in different cardiac models. *Eur. J. Pharmacol.* 794, 246–256. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.045.
- Cave AC, Hearse DJ. (1992). Ischemic preconditioning and contractile function: studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*; 24: 1113 -1123.
- Chen CL., Lin CF., Chiang CW., Jan MS., Lin YS. (2006). Lithium inhibits ceramide- and etoposide-induced protein phosphatase 2A methylation, Bcl-2 dephosphorylation, caspase-2 activation, and apoptosis. *Mol. Pharmacol.*, 70:510-517.
- Chen XH, Bezprozvanny I, Tsien RW. (1996). Molecular basis of proton block of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol* 108:363–374.
- Cohen MV, Liu GS, Downey JM. (1991). Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation*; 84: 341 -349.
- Cohen MV, Walsh RS, Goto M. (1995). Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release. *J Mol Cell Cardiol*; 27: 1527-1534.
- Cohen, M. V., Walsh, R. S., Goto, M., & Downey, J. M. (1995). Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(8), 1527–1534. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(95\)90293-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(95)90293-7)
- Cole WC, Mc Pherson CD, Sontag D. (1991). ATP -regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res*; 69: 571 -581.
- Collins SR, Meyer T. (2011). Evolutionary origins of STIM1 and STIM2 within ancient Ca<sup>2+</sup> signaling systems. *Trends Cell Biol* 21:202–211.
- Collins HE, He L, Zou, L, Qu, J, Zhou L, Litovsky S. (2014). Stromal interaction molecule 1 is essential for normal cardiac homeostasis through modulation of ER and mitochondrial function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H1231-1239. doi:10.1152/ajpheart.00075.2014.
- Collins, HE, Zhu-Mauldin X, Marchase, R. B., and Chatham, J. C. (2013). STIM1/Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H446-458. doi:10.1152/ajpheart.00104.2013.
- Correll RN, Goonasekera SA, van Berlo JH, Burr AR, Accornero F, Zhang H, Makarewich CA, York AJ, Sargent MA, Chen X, Houser SR, Molkentin JD. (2015). STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca<sup>2+</sup>(+) handling and cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*,87:38-47.
- Correll RN, Goonasekera SA, van Berlo JH, Burr AR, Accornero F, Zhang H, et al. (2015). STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca<sup>2+</sup> handling and cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 38–47. doi:10.1016/j.jmcc.2015.07.032.
- Covington ED, Wu MM, Lewis RS. (2010). Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1. *Mol Biol Cell* 21:1897–1907.
- Crespo LM, Grantham CJ, Cannell MB. Kinetics, stoichiometry, role of Na<sup>+</sup> -Ca<sup>2+</sup> exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature.* 1990;345:618–621.
- Das DK, Engelman RM, Kimura K. (1993).Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischemia. *Cardiovasc Res*; 27: 578 -584.
- Das DK, Maulik N, Sato M. (1999). Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem*; 196: 59-67.
- Dayton, C., Yamaguchi, T., Warren, A., & Korthuis, R. J. (2002). Ischemic preconditioning prevents postischemic arteriolar, capillary, and postcapillary venular dysfunction: Signaling

pathways mediating the adaptive metamorphosis to a protected phenotype in preconditioned endothelium. *Microcirculation*, 9(2), 73–89. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800122>

DeFily DV, Chilian WM. (1993). Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 265: H700-H706.

Del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. (2002). Absence of ischemic preconditioning protection in diabetic sheep hearts: role of sarcolemmal KATP channel dysfunction. *Mol Cell Biochem* 2002.

Del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. (2000). El preconditionamiento isquémico clásico protege contra el atontamiento cardíaco en ovejas conscientes (Resumen 51). *Medicina* 2000; 60: 745.

Del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. (2001). Glibenclamide effects on reperfusion-induced malignant arrhythmias and left ventricular mechanical recovery from stunning in conscious sheep. *Cardiovascular Research* 2001; 50: 474-485.

Del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. (2002). Ischemic preconditioning protection against stunning in conscious diabetic sheep; role of glucose, insulin, sarcolemmal and mitochondrial KATP channels. *Cardiovasc Res*; 55: 642-659.

Demaurex N, Poburko D, Frieden M. (2009). Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1383–1394.

Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M. C., Begg, M., et al. (2013). The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium* 53, 139–151. doi:10.1016/j.ceca.2012.11.005.

Domínguez-Rodríguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Sabourin, J., Gómez, A. M., Alvarez, J. L., and Benitah, J.-P. (2015). Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 74–78. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.07.002.

Dong H, Dunn J, Lytton J. (2002). Stoichiometry of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX1.1 measured in transfected HEK cells. *Biophys J*;82:1943–1952.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.

Ehara T, Matsuoka S, Noma A. (1989). Measurement of reversal potential of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *J Physiol (Lond)*;410:227–249.

Eridani Fuentes. (2017). "Estudio del efecto del Diazóxido en los niveles de calcio intracelular en miocitos cardíacos de ratas adultas". Tesis de Maestría en Ciencias Especialidad en Farmacología-CINVESTAV-IPN.

Fauconnier J, Ramanujam D, Chaanine A, Aubart F, Sassi Y, Merkle S, Cazorla O, Ouille A, Dupuis M, Hadri L, Jeong D, Muhlstedt S, Schmitt J, Braun A, Benard L, Saliba Y, Lagerbauer B, Nieswandt B, Lacampagne A, Hajjar RJ, Lompre AM, Engelhardt S. (2011). Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation*, 124:796-805.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S, Tanasa B, Hogan P, Lewis R, Daly M, Rao A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179–185.

Feske S., Gwack Y., Prakriya M., Srikanth S., Puppel SH., Tanasa B., Hogan P.G., Lewis R.S., Daly M., Rao A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441:179-185.

Fierro L, Parekh AB. (1999). Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL-1 cells. *J Membr Biol* 168:9 –17.

- Figueras J, Segura R, Bermejo B. (1996). Repeated 15-minute occlusions in pigs increases occlusions arrhythmias but decreases reperfusion arrhythmias that are associated with extracellular hypokalemia. *J Am Coll Cardiol*; 28: 1589 -1597.
- Fitch CA, Karp DA, Lee KK, Stites WE, Lattman EE, García-Moreno E. (2002). Experimental pKa values of buried residues: analysis with continuum methods and role of water penetration. *Biophys J* 82:3289 –3304.
- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. (1996). Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox -sensitivemechanism. *Circ Res*; 88: 802 -809.
- Frassetto SS, Schetinger MR, Webber A. (1999). Ischemic preconditioning reduces peripheral oxidative damage associated with brain ischemia in rats. *Braz J Med Biol Res*; 32: 1295-1302.
- Frund F, Sommerschild HT, Kirkeboen KA. (1997). Proarrhythmic effects of ischemic preconditioning in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol*; 92: 417 -425.
- Fujioka Y, Komeda M, Matsuoka S. (2000). Stoichiometry of Na<sup>+</sup> -Ca<sup>2+</sup> exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)*;523:339–351.
- Fukushima M, Tomita T, Janoshazi A, Putney JW. (2012). Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J Cell Sci* 125: 4354–4361.
- Garlid KD. (1996). Cation transport in mitochondria: the potassium cycle. *Biochem Biophys Acta*; 1275: 123 -126.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., D’Alonzo, A. J., et al. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 81, 1072–1082. doi:10.1161/01.res.81.6.1072.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., and Schindler, P. A. (1996). The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J. Biol. Chem.* 271, 8796–8799.
- Garnier, A., Rossi, A., & Lavanchy, N. (1996). Importance of the early alterations of energy metabolism in the induction and the disappearance of ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(8), 1671–1682. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0157>
- Gelpi RJ, Morales C, Cohen MV. (2002). Xanthine oxidase contributes to preconditioning's preservation of left ventricular developed pressure in isolated rat heart: developed pressure may not be an appropriate end-point for studies of preconditioning. *Basic Res Cardiol*; 97: 40-46.
- Ghosh, S., Standen, N. B., & Galiñanes, M. (2000). Preconditioning the human myocardium by simulated ischemia: Studies on the early and delayed protection. *Cardiovascular Research*, 45(2), 339–350. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00353-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00353-3)
- Gilabert JA, Bakowski D, Parekh AB. (2001). Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *EMBO J* 20: 2672–2679.
- Gilabert, J. A., and Parekh, A. B. (2000). Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *EMBO J.* 19, 6401–6407. doi:10.1093/emboj/19.23.6401.
- Gilabert, J. A., Bakowski, D., and Parekh, A. B. (2001). Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *EMBO J.* 20, 2672–2679. doi:10.1093/emboj/20.11.2672.

- Glitsch, M. D., Bakowski, D., and Parekh, A. B. (2002). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry depends on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *EMBO J.* 21, 6744–6754. doi:10.1093/emboj/cdf675.
- Gomma AH, Purcell HJ, Fox KM. (2001). Potassium channel openers in myocardial ischaemia: therapeutic potential of nicorandil. *Drugs*; 61: 1705 -1710.
- González, G., Zaldívar, D., Carrillo, E., Hernández, A., García, M., and Sánchez, J. (2010). Pharmacological preconditioning by diazoxide downregulates cardiac L-type Ca(2+) channels. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1172–1185. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00960.x.
- Gros GJ, Fryer RM. (2001). Mitochondrial KATP channels. trigger s or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? *Circ Res*; 87: 4431-433.
- Gross GJ, Auchampach JA. (2001). Blockade of ATP -sensitive potassium channel prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*; 70: 223-233.
- Gross GJ. (2001). The role of mitochondrial KATP channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol*; 95: 280 -284.
- Gross SA, Wissenbach U, Philipp SE, Freichel M, Cavalié A, Flockerzi V. (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channels. *J Biol Chem* 282:19375-19384.
- Grover GJ, D'Alonso AJ, Parham CS y col: Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 145-152.
- Grover GJ, Garlid KD: ATP -sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 677-695.
- Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C y col: Inhibition of the Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation* 1999; 98: 2519-2526.
- Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258, C755-786. doi:10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755.
- Guzman R, Valente EG, Pretorius J, Pacheco E, Qi M, Bennett BD, Fong DH, Lin FF, Bi V, McBride HJ. (2014). Expression of ORAI1, a plasma membrane resident subunit of the CRAC channel, in rodent and non-rodent species. *J Histochem Cytochem* 62: 864–878.
- Guzman R, Valente EG, Pretorius J, Pacheco E, Qi M, Bennett BD, Fong DH, Lin FF, Bi V, McBride HJ. (2014). Expression of ORAI1, a plasma membrane resident subunit of the CRAC channel, in rodent and non-rodent species. *J Histochem Cytochem* 62:864 – 878.
- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems D, Hogan P, Rao A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282: 16232–16243.
- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems D, Hogan P, Rao A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282:16232–16243.
- H. Zhang, A.Y. Sun, J.J. Kim, V. Graham, E.A. Finch, I. Nepliouev, G. Zhao, T. Li, W.J. Lederer, J.A. Stiber, G.S. Pitt, N. Bursac, P.B. (2015).RosenbergSTIM1-Ca<sup>2+</sup> signaling modulates automaticity of the mouse sinoatrial node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,112:E5618-E5627.
- Halestrap, A. P., Clarke, S. J., and Khaliulin, I. (2007). The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1007–1031. doi:10.1016/j.bbabi.2007.05.008.
- Hata K, Whittaker P, Kloner RA y col: Brief antecedent ischemia attenuates platelet -mediated thrombosis in damaged and stenotic canine coronary arteries: role of adenosine. *Circulation* 1998; 97: 692-702.

- Hawkins BJ, Irrinki KM, Mallilankaraman K, Lien YC, Wang Y, Bhanumathy CD, Subbiah R, Ritchie MF, Soboloff J, Baba Y, Kurosaki T, Joseph SK, Gill DL, Madesh M. (2010). S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *J Cell Biol* 190:391–405.
- He, X., Li, S., Liu, B., Susperreguy, S., Formoso, K., Yao, J., et al. (2017). Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E4582–E4591. doi:10.1073/pnas.1621384114.
- Hinata M, Yamamura H, Li L, Watanabe Y, Watano T, Imaizumi Y, et al. Stoichiometry of Na<sup>+</sup> - Ca<sup>2+</sup> exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)*. 2002;545: 453–461.
- Hinata, M., Yamamura, H., Li, L., Watanabe, Y., Watano, T., Imaizumi, Y., et al. (2002). Stoichiometry of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 545, 453–461. doi:10.1113/jphysiol.2002.025866.
- Hof T, Liu H, Salle L, Schott JJ, Ducreux C, Millat G, Chevalier P, Probst V, Guinamard R, Bouvagnet P. (2017). TRPM4 non-selective cation channel variants in long QT syndrome. *BMC Med. Genet.*, 18:31.
- Hojayev B, Jiang N, Wang ZV, Tandan S, Rakalin A, Rothermel BA, Gillette TG, Hill JA. (2012). STIM1-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup>(+) entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 52:136-147.
- Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A: ATP -sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol (Lond)* 1995; 519: 347 -360.
- Holmuhamedov, E. L., Wang, L., and Terzic, A. (1999). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J. Physiol.* 519 Pt 2, 347–360. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0347m.x.
- Holmuhamedov, E., Lewis, L., Bienengraeber, M., Holmuhamedova, M., Jahangir, A., and Terzic, A. (2002). Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1010–1016. doi:10.1096/fj.01-0996com.
- Hoover PJ, Lewis RS. (2011). Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci USA* 108:13299–13304.
- Horton, J. S., Buckley, C. L., Alvarez, E. M., Schorlemmer, A., and Stokes, A. J. (2014). The calcium release-activated calcium channel Orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy. *Channels Austin Tex* 8, 35–48. doi:10.4161/chan.26581.
- Hoth M, Button DC, Lewis RS. (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10607–10612.
- Hoth M, Penner R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465:359 –386.
- Hoth, M., Button, D. C., and Lewis, R. S. (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10607–10612. doi:10.1073/pnas.180143997.
- Hoth, M., Fanger, C. M., and Lewis, R. S. (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 137, 633–648. doi:10.1083/jcb.137.3.633.
- Hu, H., Sato, T., Seharaseyon, J., Liu, Y., Johns, D. C., O'Rourke, B., et al. (1999). Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal KATP channels and native cardiac mitochondrial KATP channels. *Mol. Pharmacol.* 55, 1000–1005.

Hulot JS, Fauconnier J, Ramanujam D, Chaanine A, Aubart F, Sassi Y, Merkle S, Cazorla O, Ouille A, Dupuis M, Hadri L, Jeong D, Muhlstedt S, Schmitt J, Braun A, Benard L., Saliba Y, Lagerbauer B., Nieswandt B., Lacampagne A., Hajjar RJ., Lompre AM., Engelhardt S. (2011). Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation*, 124:796-805.

Hulot JS, Fauconnier J, Ramanujam D, Chaanine A, Aubart F, Sassi Y, Merkle S, Cazorla O, Ouille A, Dupuis M, Hadri L, Jeong D, Muhlstedt S, Schmitt J, Braun A, Benard L, Saliba Y, Lagerbauer B, Nieswandt B, Lacampagne A, Hajjar RJ, Lompre AM, Engelhardt S. (2011). Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy *Circulation*, 124:796-805.

Hunton, D. L., Lucchesi, P. A., Pang, Y., Cheng, X., Dell'Italia, L. J., and Marchase, R. B. (2002). Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 14266–14273. doi:10.1074/jbc.M107167200.

Hunton, D. L., Zou, L., Pang, Y., and Marchase, R. B. (2004). Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1124-1132. doi:10.1152/ajpheart.00162.2003.

*J. Gen. Physiol.*, 143:345-359.

*J. Mol. Cell. Cardiol.*52:304-311.

Jahania MS, Lasley RD, Mentzer RM Jr: Ischemic preconditioning does not acutely improve load-insensitive parameters of contractility in in vivo stunned porcine myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 810 -817.

Jenkins D, Pugsley W, Yellon D: Ischaemic preconditioning in a model of global ischaemia: infarct size limitation but not reduction of stunning. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1623 -1632.

Ji, Y., Guo, X., Zhang, Z., Huang, Z., Zhu, J., Chen, Q.-H., et al. (2017). CaMKII $\delta$  mediates phenylephrine induced cardiomyocyte hypertrophy through store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 27, 9–17. doi:10.1016/j.carpath.2016.11.004.

Kang TM, Hilgemann DW. Multiple transport modes of the cardiac Na<sup>+</sup> /Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Nature*. 2004;427:544–548.

Kerschbaum HH, Cahalan MD. (1998). Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes. *J Gen Physiol* 111:521–537.

Kerschbaum HH, MD Cahalan MD. (1999). Single-channel recording of a store-operated Ca<sup>2+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes *Science*, 283:836-839.

Khananshvili, D. (2014). Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions. *Pflugers Arch.* 466, 43–60. doi:10.1007/s00424-013-1405-y.

Khananshvili, D. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2014) 466: 43. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1405-y>

Kida M, Fujiwara H, Ishida M y col: Ischemic preconditioning preserves creatine phosphate and intracellular pH. *Circulation* 1991; 84: 2495-2503.

Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodiumcalcium exchange current in single ventricular cells of guineapig. *J Physiol (Lond)*. 1987;384:199–222.

Kimura J, Noma A, Irisawa H. Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature*. 1986;319:596–597.

Kobara M, Tatsumi T, Matoba S y col: Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 417 -428.

Kollocassides KG, Seymor AM, Galinanes M y col: Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture: NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1045-1057.

Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N y col: Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72: 1293-1299.

Lardner A. (2011). The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol* 69:522–530.

Lascano EC, del Valle HF, Negroni JA y col: Role of ATP dependent potassium channels in the protection against ischemia-reperfusion damage in conscious sheep. *LA Arch Cardiovasc Sci (Latin American Archives of Cardiovascular Sciences)* 2001; 2:37 -46.

Lascano EC, del Valle HF, Negroni JA: Early and late preconditioning protect against reperfusion-induced arrhythmias following reversible sustained ischemia in conscious sheep. Segundo Congreso Virtual de Cardiología. FEDERACIÓN ARGENTINA DE CARDIOLOGÍA. Septiembre 1 a Noviembre 30 del 2001. Argentina.

Lascano EC, Negroni JA, del Valle HF y col: Left ventricular regional systolic and diastolic function in conscious sheep undergoing ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 77-86.

Lascano EC, Negroni JA, del Valle HF y col: Participación de los canales de potasio dependientes de ATP en el mecanismo de preconditionamiento. *REV FED ARG CARDIOL* 2002; 31: 91-99.

Lascano EC, Negroni JA, del Valle HF: Ischemic shortening of action potential duration as a result of KATP channel opening attenuates myocardial stunning by reducing calcium influx. *Mol Cell Biochem* 2002; 236: 53 -61.

Lawson CS, Avkiran M, Shattock MJ y col: Preconditioning and reperfusion arrhythmias in the isolated rat heart: true protection or temporal shift in vulnerability? *Cardiovasc Res* 1993; 27: 2274-2281.

Lawson CS, Downey JM: Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 542-550.

Lawson CS, Hearse DJ: Ischaemic preconditioning reduces rather than delays early ischaemia - induced arrhythmias in the isolated blood perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 24 (Suppl V): S88.

Lazdunski M, Frelin C, Vigne P: The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 1029 -1042.

Lesnefsky, E.J., Chen,Q., Tandler B., and Hoppel, C.L. (2017). Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: Implications for novel therapies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 57, 535-565. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335.

Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca<sup>2+</sup> store depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9301–9306.

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Meyer T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 15:1235–1241.

Liou J., Kim ML., Heo WD., Jones JT., Myers JW., Ferrell JE., Meyer T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr. Biol.*, 15:1235-1241.

- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., et al. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with distinct functional properties. *Curr. Biol. CB* 17, 794–800. doi:10.1016/j.cub.2007.03.065.
- Litjens T, Harland ML, Roberts ML, Barritt GJ, Rychkov GY. (2004). Fast Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of the store-operated Ca<sup>2+</sup> current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol* 558:85–97.
- Liu Y, Zheng X, Mueller GA, Sobhany M, Derose EF, Zhang Y, London RE, Birnbaumer L. (2012). Crystal structure of calmodulin binding domain of Orai1 in complex with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin displays a unique binding mode. *J Biol Chem* 287:43030 – 43041.
- Liu, J., Pang, Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, J. C., and Marchase, R. B. (2006). Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40, 303–312. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.11.003.
- Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B., and Marban, E. (1998). Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97, 2463–2469. doi:10.1161/01.cir.97.24.2463.
- Luo X, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Tandan S, Rakalin A, Rothermel BA, Gillette TG, Hill JA. (2012). STIM1-dependent store-operated Ca(2)(+) entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 52:136-147.
- Luo, X., Hojaye, B., Jiang, N., Wang, Z. V., Tandan, S., Rakalin, A., et al. (2012). STIM1-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 136–147. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.11.003.
- Ma, R., Chaudhari, S., and Li, W. (2016). Canonical Transient Receptor Potential 6 Channel: A New Target of Reactive Oxygen Species in Renal Physiology and Pathology. *Antioxid. Redox Signal.* 25, 732–748. doi:10.1089/ars.2016.6661.
- Malayev A, Nelson DJ. (1995). Extracellular pH modulates the Ca<sup>2+</sup> current activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in human macrophages. *J Membr Biol* 146:101–111.
- Malli R, Naghdi S, Romanin C, Graier WF. (2008). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid Ca<sup>2+</sup> overload. *J Cell Sci* 121:3133–3139.
- Mancarella S, Wang Y, Deng X, Landesberg G, Scalia R, Panettieri RA, Mallilankaraman K, Tang XD, Madesh M, Gill DL. (2011). Hypoxia-induced acidosis uncouples the STIM-Orai calcium signaling complex. *J Biol Chem* 286:44788 – 44798.
- Manji SS, Parker NJ, Williams RT, van Stekelenburg L, Pearson RB, Dziadek M, Smith PJ. (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1481:147–155.
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM y col: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88: 1264-1272.
- Mathes C, Fleig A, Penner R. (1998). Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J Biol Chem* 273: 25020 –25030.
- Matsuoka S, Hilgemann DW. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Ion and voltage dependencies of the transport cycle. *J Gen Physiol.* 1992;100: 963–1001.
- McCarl CA, Khalil S, Ma J, Oh-hora M, Yamashita M, Roether J, Kawasaki T, Jairaman A, Sasaki Y, Prakriya M, Feske S. (2010). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through ORAI1 is critical for T cell-mediated autoimmunity and allograft rejection. *J Immunol* 185: 5845–5858.

McNally BA, Somasundaram A, Yamashita M, Prakriya M. (2012). Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature* 482:241–245.

McNulty PH, Darling A, Whiting JM: Glycogen depletion contributes to ischemic preconditioning in the rat heart in vivo . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 271: K2283-H2289.

Miyama M, Fujiwara H, Kida M y col: Preconditioning improves energy metabolism during reperfusion but does not attenuate myocardial stunning in porcine hearts. *Circulation* 1993; 88: 223-234.

Molnár, T., Yarishkin, O., Iuso, A., Barabas, P., Jones, B., Marc, R. E., et al. (2016). Store-Operated Calcium Entry in Müller Glia Is Controlled by Synergistic Activation of TRPC and Orai Channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 3184–3198. doi:10.1523/JNEUROSCI.4069-15.2016.

Mosca SM, Cingolani HE: Comparison of the protective effects of ischemic preconditioning and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger blockade. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2000; 362: 7-13.

Mosca SM, Gelpi RJ, Cingolani HE: Adenosine and dipyridamole mimic the effects of ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 1403 -1409.

Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P, Schindl R, Hesch C, Polzinger B, Fritsch R, Kahr H, Madl J, Gruber H, Groschner K, Romanin C. (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 283:8014–8022.

Mullenheim J, Schlack W, Frassdorf J y col: Additive protective effects of late and early ischaemic preconditioning are mediated by the opening of KATP channels in vivo . *Pflugers Arch* 2001; 442: 178-187.

Müllenheim, J., Schlack, W., Frässdorf, J., Heinen, A., Preckel, B., & Thämer, V. (2001). Additive protective effects of late and early ischaemic preconditioning are mediated by the opening of KATP channels in vivo. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 442(2), 178–187. <https://doi.org/10.1007/s004240100514>

Mullins F, Park C, Dolmetsch R, Lewis R. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15495–15500.

Mullins LJ. The generation of electric currents in cardiac fibers of Na/Ca exchange. *J Gen Physiol.* 1977;70:681–695.

Mullins, L. J. (1979). The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am. J. Physiol*, 236(3): C103-C110.

Munch-Ellingsen J, Lokebo JE, Bugge E y col: Equal reduction in infarct size by ethylisopropyl - amiloride pretreatment and ischemic preconditioning in the in situ rabbit heart. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 13 -18.

Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* 88, 581–609. doi:10.1152/physrev.00024.2007.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.

Murry CE, Richard VJ, Jennings RB y col: Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991; 260: H796-H804.

Murry CE, Richard VJ, Reimer KA y col: Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990; 66: 913-931.

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>

Murry, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136. doi:10.1161/01.cir.74.5.1124.

Nagy, T., Champattanachai, V., Marchase, R. B., and Chatham, J. C. (2006). Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C57-65. doi:10.1152/ajpcell.00263.2005.

Nao BS, McClanahan TB, Groh MA y col: The time limit of effective preconditioning in dogs. *Circulation* 1990; 83 (Suppl III): 271.

Narasimhan, G., Carrillo, E. D., Hernández, A., García, M. C., and Sánchez, J. A. (2018). Protective Action of Diazoxide on Isoproterenol-Induced Hypertrophy Is Mediated by Reduction in MicroRNA-132 Expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 72, 222–230. doi:10.1097/FJC.0000000000000619.

Neely JR, Grotyohann LW: Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 1984; 55: 816 -824.

Negróni JA, Lascano EC, del Valle HF y col: ATP-sensitive potassium channels do not have a main role in mediating late preconditioning protection against arrhythmias and stunning in conscious sheep. *Basic Res Cardiol* 2002; 97: 55 -64.

Negróni JA1, Lascano EC, del Valle HF, C. A. (2002). MUSCARINIC RECEPTORS SUBTYPES IN HUMAN HEART. *Archiv Für Kreislaufforschung*, 1(97), 55–64. [https://doi.org/DOI: 10.1016/S0022-2828\(01\)90332-3](https://doi.org/DOI: 10.1016/S0022-2828(01)90332-3)

Nichols CG, Ripoll C, Lederer WJ: ATP -sensitive potassium channel modulation of guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res* 1991; 68: 280-287.

Ninomiya, K., Hashida, J., Geft, I., Chaux, E., Shell, W., Fishbein, M. C., ... Ganz, W. (2004). Brief repeat periods of ischemia have a cumulative effect and may cause myocardial necrosis. *The American Journal of Cardiology*, 47, 445. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(81\)90853-5](https://doi.org/10.1016/0002-9149(81)90853-5)

Noma A: ATP-regulated K channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147-148.

Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Sato, T., Ono, K., and Ito, H. (2009). Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 172–176. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.117.

Ohga K, Takezawa R, Arakida Y, Shimizu Y, Ishikawa J. (2008). Characterization of YM-58483/BTP2, a novel store-operated Ca<sup>2+</sup> entry blocker, on T cell-mediated immune responses in vivo. *Int. Immunopharmacol.*, 8:1787-1792.

Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, Chung W, Prakriya M, Feske S, Rao A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9:432–443.

Orci L, Ravazzola M, Le Coadic M, Shen WW, Demaurex N, Cosson P. (2009). STIM1- induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19358 –19362.

O'Rourke B: Myocardial KATP channels in preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 845.

Ovize M, Aupetit J -F, Rioufol G y col: Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995; 269: H72 - H79.

Ovize M, Kloner RA, Hale SL y col: Coronary cyclic flow variations precondition ischemic myocardium. *Circulation* 1992; 85: 779 -789.

Ovize M, Kloner RA, Pryzklenk K: Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 266: H137-H146.

Ovize M, Pryzklenk K, Hale SL y col: Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation* 1992; 85: 2247-2254.

Pagel PS, Krolikowski FK, Mraovic B y col: The role of mitochondrial and sarcolemmal KATP channels in canine ethanol-induced preconditioning in vivo . *Anesth Analg* 2002; 94: 841 -848.

Pagliari P, Gattullo D, Rastaldo R y col: Involvement of nitric oxide in ischemic preconditioning. *Ital Heart J* 2001; 2: 660-668.

Pain T, Yang XM, Critz SD y col: Opening of mitochondrial KATP channels trigger s the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 87: 460-466.

Pain, T., Yang, X. M., Critz, S. D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G. S., et al. (2000). Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 87, 460–466. doi:10.1161/01.res.87.6.460.

Parekh AB. (1998). Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *J Biol Chem* 273:14925–14932.

Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 136:876–890.

Parks C, Alam MA, Sullivan R, Mancarella S. (2016). STIM1-dependent Ca(2+) microdomains are required for myofilament remodeling and signaling in the heart. *Sci. Rep.*, 6:25372.

Parks, C., Alam, M. A., Sullivan, R., and Mancarella, S. (2016). STIM1-dependent Ca(2+) microdomains are required for myofilament remodeling and signaling in the heart. *Sci. Rep.* 6, 25372. doi:10.1038/srep25372.

Pasdois, P., Beauvoit, B., Tariosse, L., Vinassa, B., Bonoron-Adèle, S., and Dos Santos, P. (2008). Effect of diazoxide on flavoprotein oxidation and reactive oxygen species generation during ischemia-reperfusion: a study on Langendorff-perfused rat hearts using optic fibers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2088-2097. doi:10.1152/ajpheart.01345.2007.

Peppiatt CM, Collins TJ, Mackenzie L, Conway SJ, Holmes AB, Bootman MD, Berridge MJ, Seo JT, Roderick HL. (2003). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*, 34:97-108.

Piot, C. A., Padmanaban, D., Ursell, P. C., Sievers, R. E., & and Christopher L. Wolfe. (1997). Ischemic Preconditioning Decreases Apoptosis in Rat Hearts In Vivo. *Circulation*, (96), 1598–1604. <https://doi.org/10.1161/01.CIR>

Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Lemaire, C., Veksler, V., Garnier, A., et al. (2013). Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front. Physiol.* 4, 102. doi:10.3389/fphys.2013.00102.

Pitts BJ. Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Coupling to the sodium pump. *J Biol Chem.* 1977;254:6232–6235.

Polder H.R., Weskamp M., Linz K., Meyer R. (2005) Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques. In: Dhein S., Mohr F.W., Delmar M. (eds) Practical Methods in Cardiovascular Research. Springer, Berlin, Heidelberg.

Poteser, M., Graziani, A., Rosker, C., Eder, P., Derler, I., Kahr, H., et al. (2006). TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 13588–13595. doi:10.1074/jbc.M512205200.

Poulsen SH, Jensen SE, Gotzsche O y col: Evaluation and prognostic significance of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography in the early phase of a first acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1997; 18:1882-1889.

Prakriya M, Lewis R. (2006). Regulation of CRAC channel activity by recruitment of silent channels to a high open-probability gating mode. *J Gen Physiol* 128:373–386.

Prakriya, M., and Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 95, 1383–1436. doi:10.1152/physrev.00020.2014.

Przyklenk K, Kloner RA: Preconditioning: a balanced perspective. *Br Heart J* 1995; 74: 575-577.

Przyklenk K, Hata K, Kloner RA: Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation* 1997; 96: 1305-1312.

Przyklenk K, Kloner R: Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 40: 517 -547.

Quintana A, Schwarz EC, Schwindling C, Lipp P, Kaestner L, Hoth M. (2006). Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem* 281:40302– 40309.

Ramasamy R, Liu H, Anderson S y col: Ischemic preconditioning stimulates sodium and proton transport in isolated rat hearts. *J Clin Invest* 1995; 96: 1464 -1472.

Reczek CR, Chandel NS. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 33:8 – 13.

Reeves JP, Hale CC. The stoichiometry of the cardiac sodiumcalcium exchange system. *J Biol Chem.* 1984;259:7733–7739.

Reimer KA, Hill ML, Jennings RB: Prolonged depletion of ATP and adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 1981; 13: 229 -239.

Reimer, K. A., Hill, M. L., & Jennings, R. B. (1981). Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 13(2), 229–239. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(81\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0022-2828(81)90219-4)

Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. (2009). Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1342–1351.

Sabourin J, Bartoli F, Antigny F, Gomez AM, Benitah JP. (2016). Transient receptor potential canonical (TRPC)/Orai1-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> channels: new targets of aldosterone in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 291 (2016), pp. 13394-13409.

Sakamoto J, Miura T, Tsuchida A y col: Reperfusion arrhythmias in the murine heart: their characteristics and alteration after ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1999; 94: 489 - 495.

Sakamoto, J., Miura, T., Tsuchida, A., Fukuma, T., Hasegawa, T., & Shimamoto, K. (1999). Reperfusion arrhythmias in the murine heart: Their characteristics and alteration after ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 94(6), 489–495. <https://doi.org/10.1007/s003950050165>

Saliba, Y., Keck, M., Marchand, A., Atassi, F., Ouillé, A., Cazorla, O., et al. (2015). Emergence of Orai3 activity during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 105, 248–259. doi:10.1093/cvr/cvu207.

Sampieri A, Zepeda A, Asanov A, Vaca L. (2009). Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member. *Cell Calcium* 45:439–446.

Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H y col: Role of mitochondrial and sarcolemmal KATP channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H256-H263.

Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ y col: Role of phasic dynamism of p38 mitogen -activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res* 2001; 88: 175-180.

Sánchez, J. A., García, M. C., Sharma, V. K., Young, K. C., Matlib, M. A., and Sheu, S. S. (2001). Mitochondria regulate inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat heart. *J. Physiol.* 536, 387–396. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0387c.xd.

Sato, T., Sasaki, N., Seharaseyon, J., O'Rourke, B., and Marbán, E. (2000). Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection. *Circulation* 101, 2418–2423. doi:10.1161/01.cir.101.20.2418.

Saul, S., Gibhardt, C. S., Schmidt, B., Lis, A., Pasiaka, B., Conrad, D., et al. (2016). A calcium-redox feedback loop controls human monocyte immune responses: The role of ORAI Ca<sup>2+</sup> channels. *Sci. Signal.* 9, ra26. doi:10.1126/scisignal.aaf1639.

Schafer S, Carr LJ, Prussel E y col: Effects of glycogen on ischemic injury in isolated rat hearts: insights into preconditioning. *Am J Physiol Heart Cir Physiol* 1995; 268: H935-H944.

Schulz R, Cohen MV, Behrends M y col: Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2001; 181-198.

Schulz R, Gres P, Heusch G: Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2175-H2181.

Schulz R, Post H, Vahlaus C y col: Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon. Its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation* 1998; 948: 1022-1029.

Schulz R, Rose J, Heusch G: Involvement of activation of ATP -dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 267: H1341 -H1352.

Schwartz, L. M., Sebbag, L., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (2001). Duration and reinstatement of myocardial protection against infarction by ischemic preconditioning in open chest dogs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(9), 1561–1570. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1426>

Scrimgeour N, Litjens T, Ma L, Barritt GJ, Rychkov GY. (2009). Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. *J Physiol* 587:2903–2918.

Sheu SS, Fozzard HA. Transmembrane Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> electrochemical gradients in cardiac muscle and their relationship to force development. *J Gen Physiol.* 1982;80:325–351.

Shigematsu S, Sato T, Abe T y col: Pharmacological evidence for the persistent activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in early phase of reperfusion and its protective role against myocardial stunning. *Circulation* 1995; 92: 2266-2275.

- Shiki K, Hearse DJ: Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion -induced arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 253: H1470-H1476.
- Shipolini AR, Yokoyama H, Galiñanes M y col: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity does not contribute to protection by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Circulation* 1997; 96: 3617-3625.
- Shuttleworth TJ. (2012). Orai3—the “exceptional” Orai? *J Physiol* 590:241–257.
- Shuttleworth TJ. (2012). Orai3—the ‘exceptional’ Orai? *J. Physiol.*, 590:241-257.
- Simard C, Hof T, Keddache Z, Launay P, Guinamard R. (2013). The TRPM4 non-selective cation channel contributes to the mammalian atrial action potential. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 59:11-19.
- Simkhovich, B. Z., Kloner, R. A., & Przyklenk, K. (1998). Temporal changes in the subcellular distribution of protein kinase C in rabbit heart during global ischemia. *Basic Research in Cardiology*, 93(2), 122–126. <https://doi.org/10.1007/s003950050072>
- Singaravelu K, Nelson C, Bakowski D, de Brito OM, Ng SW, Di Capite J, Powell T, Scorrano L, Parekh AB. (2011). Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* 286:12189 –12201.
- Smyth J, Dehaven W, Bird G, Putney Jr J. (2008). Ca<sup>2+</sup>-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J Cell Sci* 121:762–772.
- Sobie EA, Lederer WJ. (2012). Dynamic local changes in sarcoplasmic reticulum calcium: physiological and pathophysiological roles
- Somasundaram A, Shum AK, McBride HJ, Kessler JA, Feske S, Miller RJ, Prakriya M. (2014). Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells. *J Neurosci* 34:9107–9123.
- Steenbergen C, Perlman ME, Lomond RE y col: Mechanism of preconditioning: ionic alterations. *Circ Res* 1993; 131: 1106-1112.
- Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P. (2008). STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 10: 688-697.
- Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z.-S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., et al. (2008). STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 10, 688–697. doi:10.1038/ncb1731.
- Szerencsei RT, Prinsen CF, Schnetkamp PP. Stoichiometry of the retinal cone Na/Ca-K exchanger heterologously expressed in insect cells: comparison with the bovine heart Na/Ca exchanger. *Biochemistry*. 2001;40:6009–6015.
- Tillay P, Yang X -M, Critz SD y col: Opening of mitochondrial KATP channels trigger s the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 87: 460.
- Touchberry CD, Elmore CJ, Nguyen TM, Andresen JJ, Zhao X, Orange M, Weisleder N, Brotto M, Claycomb WC, Wacker MJ. (2011). Store-operated calcium entry is present in HL-1 cardiomyocytes and contributes to resting calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 416:45-50.
- Toyoda Y, Friehs I, Parker RA y col: Differential role of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2694-H2703.

- Trebak M, Bird GS, McKay RR, Putney JW. (2002). Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J. Biol. Chem.*, 277:21617-21623.
- Troupes CD, Wallner M, Borghetti G, Zhang C, Mohsin S, von Lewinski D, Berretta RM, Kubo H, Chen X, Soboloff J, Houser S. (2017). Role of STIM1 (stromal interaction molecule 1) in hypertrophy-related contractile dysfunction. *Circ. Res.*, 121:125-136.
- Valero R, Senovilla A, Núñez L, Villalobos C. (2008). The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium* 44, 259–269. doi:10.1016/j.ceca.2007.12.002.
- Valverde, C. A, Kornyejev, D. Ferreiro M., Petrosky, A. D., Mattiazzi, A., and Escobar, A. L. (2010). Transient Ca<sup>2+</sup> depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 85, 671–680. doi:10.1093/cvr/cvp371.
- Van Winkle DM, Kuzume K, Dote K y col: Infarct limitation by protein kinase C (PKC) is attenuated by blockade of ATP-sensitive potassium (KATP) channels. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: A142.
- Van Winkle DM, Thornton J, Downey JM. (1991). Cardioprotection from ischemic preconditioning is lost following prolonged reperfusion in the rabbit. *Coronary Artery Dis*;2:613-619.
- Van Winkle DM, Thornton JD, Downey DM y col: The natural history of preconditioning: cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. *Coron Art Dis* 1991; 2: 613 -619.
- Vanden Hoek TL, Becker LB, Zhao Z y col: Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induced preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 18092-18098.
- Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Renné T, Stoll G, Nieswandt B. (2008). The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med* 205:1583–1591.
- Vegh A, Komori S, Szekeres L y col: Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 487-495.
- Vegh A, Papp JG, Parratt JR: Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20 h after rapid cardiac pacing. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 1081-1082.
- Vegh A, Szekeres L, Parrat JR: Transient ischaemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 1991; 1051 -1053.
- Vig M., Beck A., Billingsley JM., Lis, A., Parvez S., Peinelt C., Koomoa DL., Soboloff J., Gill DL., Fleig A., Kinet JP., Penner R. (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr. Biol.*, 16:2073-2079.
- Voelkers M, Salz M, Herzog N, Frank D, Dolatabadi N, Frey N, Gude N, Friedrich O, Koch WJ, Katus HA, Sussman MA, Most P. (2010). Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 48:1329-1334.
- Voelkers, M., Salz, M., Herzog, N., Frank, D., Dolatabadi, N., Frey, N., et al. (2010). Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 1329–1334. doi:10.1016/j.jmcc.2010.01.020.
- Völkers, M., Dolatabadi, N., Gude, N., Most, P., Sussman, M. A., and Hassel, D. (2012). Orai1 deficiency leads to heart failure and skeletal myopathy in zebrafish. *J. Cell Sci.* 125, 287–294. doi:10.1242/jcs.090464.
- Vourinen K, Ylialo K, Peuhkurinen K y col: Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium. Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F1F0-ATPase. *Circulation* 1995; 91: 2810-2818.

- Wainwright CL, Parrat JR: Electrocardiographic and haemodynamic effects of myocardial preconditioning in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22 (Suppl III): S77.
- Wakabayashi S, Goshima K. Kinetic studies on sodium-dependent calcium uptake by myocardial cells and neuroblastoma cells in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1981;642:158–172.
- Walker DM, Walker JM, Yellon DM: Global myocardial ischemia protects the myocardium from subsequent regional ischemia. *Cardioscience* 1993; 4: 263 -266.
- Wang P, Umeda PK, Sharifov OF, Halloran BA, Tabengwa E, Grenett HE, Urthaler F, Wolkowicz PE. (2012). Evidence that 2-aminoethoxydiphenyl borate provokes fibrillation in perfused rat hearts via voltage-independent calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.*, 681:60-67.
- Wang, S., Cone, J., and Liu, Y. (2001). Dual roles of mitochondrial K(ATP) channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H246-255. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.1.H246.
- Weinbrenner C, Wang P, Downey JM: Loss of glycogen during preconditioning is not a prerequisite for protection of the rabbit heart. *Basic Res Cardiol* 1996; 91: 374-381.
- Wescott AP, Jafri MS, Lederer WJ, Williams GS. (2016). Ryanodine receptor sensitivity governs the stability and synchrony of local calcium release during cardiac excitation-contraction coupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 92:82-92.
- Wissenbach U, Philipp SE, Gross SA, Cavalié A, Flockerzi V. (2007). Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine ORAI and STIM genes. *Cell Calcium* 42:439–446.
- Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FLJ y col: Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation* 1993; 87: 881 -892.
- Wu MM, Covington ED, Lewis RS. (2014). Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Mol Biol Cell* 25:3672–3685.
- Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J. (2006). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* 27:821– 826.
- Yang BC, Nicolini FA, Nichols WW y col: Failure of brief ischemic episodes to protect against myocardial dysfunction caused by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *Am Heart J* 1994; 128: 1192 -1200.
- Yaniv Y, Sirenko S, Ziman BD, Spurgeon HA, Maltsev VA, Lakatta EG. (2013). New evidence for coupled clock regulation of the normal automaticity of sinoatrial nodal pacemaker cells: bradycardic effects of ivabradine are linked to suppression of intracellular Ca<sup>(2+)</sup> cycling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 62:80-89.
- Yao Z, Gross GJ: Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration and infarct size in dogs. *Circulation* 1994; 89: 1769-1775.
- Yasui K, Kimura J. Is potassium co-transported by the cardiac Na-Ca exchange? *Pflugers Arch*. 1990;415:513–515.
- Yellon DM, Baxter GF, García-Dorado D y col: Ischemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 21-33.
- Yu SP, et al., 1997 Choi DW. (1997). "Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate". *The European Journal of Neuroscience*. 9 (6): 1273–81. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01482.x

- Yu, J., Deliu, E., Zhang, X.-Q., Hoffman, N. E., Carter, R. L., Grisanti, L. A., et al. (2013). Differential activation of cultured neonatal cardiomyocytes by plasmalemmal versus intracellular G protein-coupled receptor 55. *J. Biol. Chem.* 288, 22481–22492. doi:10.1074/jbc.M113.456178.
- Yuan JP., Zeng W., Dorwart MR., Choi YJ., Worley PF., Muallem S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat. Cell Biol.*, 11:337-343.
- Zhang L, McCloskey MA. (1995). Immunoglobulin E receptor-activated calcium conductance in rat mast cells. *J Physiol* 483:59–66.
- Zhang S, Yu Y, Roos J, Kozak J, Deerinck T, Ellisman M, Stauderman K, Cahalan M. STIM1 is a Ca<sub>2</sub> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sub>2</sub> store to the plasma membrane. *Nature* 437:902–905.
- Zhang SL., Yu Y., Roos J., Kozak JA., Deerinck TJ., Ellisman MH., Satauderman K.A., Cahalan MD. (2005). STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane *Nature*, 437:902-905.
- Zhang X, Zhang W, Gonzalez-Cobos JC, Jardin I, Romanin C, Matrougui K, Trebak M. (2014). Complex role of STIM1 in the activation of store-independent Orai1/3 channels
- Zhao, G., Li, T., Brochet, D. X. P., Rosenberg, P. B., and Lederer, W. J. (2015). STIM1 enhances SR Ca<sup>2+</sup> content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4792-4801. doi:10.1073/pnas.1423295112.
- Zheng L, Stathopoulos P, Li G, Ikura M. (2008). Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca<sub>2</sub> sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem Biophys Res Commun* 369:240 –246.
- Zhu J, Ferrier GR: Ischemic preconditioning: antiarrhythmic effects and electrophysiological mechanisms in isolated ventricle. *Am J Physiol* 1998; 274: H66 -H75.
- Zhu-Mauldin X, Marsh SA, Zou L, Marchase RB, Chatham JC. (2012). Modification of STIM1 by O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) attenuates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 287:39094-39106.
- Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M. (2004). Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J. Biol. Chem.*, 279:12427-12437.
- Zweifach A, Lewis RS. (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* 105:209 –226.
- Zweifach A, Lewis RS. (1995). Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 270:14445–14451.
- Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1995). Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 14445–14451. doi:10.1074/jbc.270.24.14445.

## 15. ANEXOS

### 15.1 MEDICIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ CITOSÓLICO

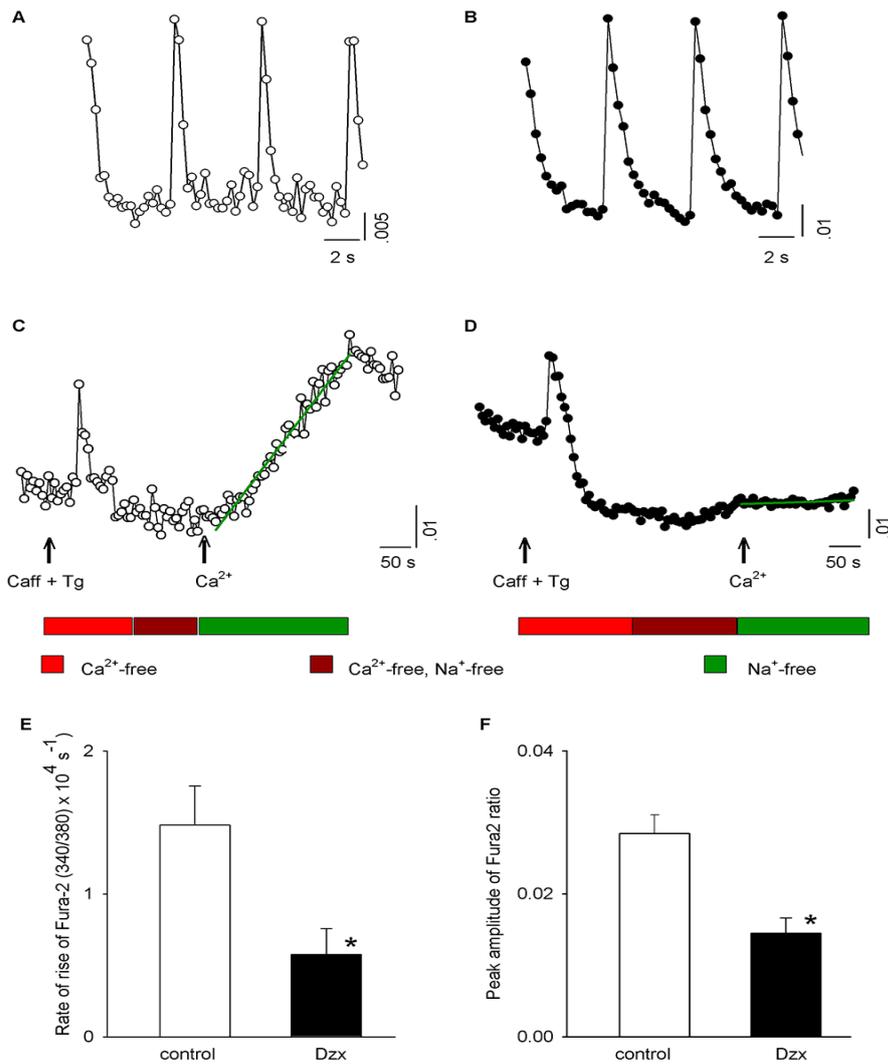
**Resultado obtenido de la tesis de Maestría en Ciencias Especialidad en Farmacología-CINVESTAV-IPN:**

**Eridani Fuentes. (2017). "Estudio del efecto del Diazóxido en los niveles de calcio intracelular en miocitos cardíacos de ratas adultas"**

Los cardiomiocitos se cargan con el éster acetoximetílico fluorescente con permeabilidad celular (Fura-2 AM) durante 45 minutos a temperatura ambiente. El Fura-2 AM se diluye en la solución de Tyrode hasta una concentración final de  $\sim 5 \mu\text{M}$  a partir de una solución madre en DMSO que contiene 9 mM de Fura-2 AM y ácido plurónico F127 al 25% p/v. Las células se lavan con solución Tyrode y se adhieren durante 20–30 minutos a temperatura ambiente antes de realizar mediciones de  $[Ca^{2+}]_i$  en cubreobjetos recubiertos con laminina. Las imágenes radiométricas de la fluorescencia de Fura-2 AM se monitorizan utilizando un microscopio equipado con un monocromador, que permite un cambio de alta velocidad entre longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm. Las emisiones de fluorescencia se capturan utilizando un filtro y una cámara digital. La adquisición de imágenes y el análisis de la relación se realizaron utilizando el software Imaging Workbench 6.0. La  $[Ca^{2+}]_i$  se estima como la relación de fluorescencia de Fura-2 AM (340/380). Para depletar al  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, se utiliza cafeína (10 mM) y Tg ( $2 \mu\text{M}$ ). Se utiliza N-metil-D-glucamina (NMG) para reemplazar al  $Na^+$  extracelular equimolarmente (solución libre de  $Na^+$ ).

### 15.2 INACTIVACIÓN DE LOS SOC EN CÉLULAS PRECONDICIONADAS

Para obtener más información sobre la activación de los SOC en los cardiomiocitos preconditionados, se midió el  $Ca^{2+}$  intracelular utilizando Fura-2 AM. La Figura 9A muestra señales de  $Ca^{2+}$ , expresadas como la relación 340/380, asociadas con potenciales de acción generados en un cardiomiocito testigo. La Figura 9C muestra el cambio en  $Ca^{2+}$  intracelular para el mismo cardiomiocito en condiciones de depleción del RS, así como después de que el  $Ca^{2+}$  se reintrodujo en la solución externa. Como se esperaba, el  $Ca^{2+}$  intracelular aumentó con el tiempo, y la tasa de su aumento se calculó como la pendiente de la línea recta ajustada a los datos. Las Figuras 9B y D muestran los resultados correspondientes de un cardiomiocito preconditionado. La reincorporación de  $Ca^{2+}$  externo produjo un aumento muy pequeño en el  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que indica que los SOC apenas se activaron. La Figura 9E-F resume los resultados de varios experimentos similares a los ilustrados en la Figura 9C-D. Se ilustran los cambios en la tasa de aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular, que es un indicador del número de SOC abiertos y la amplitud máxima. Ambos factores disminuyeron significativamente debido al PPC.



**FIGURA 9. El preconditionamiento farmacológico inhibe la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por la depleción del RS.** (A y B) señales de  $Ca^{2+}$  generadas por potenciales de acción en un experimento de control (A) y en un cardiomiocito pretratado con Dzx (B). (C) Mediciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  del mismo cardiomiocito descrito en (A) siguiendo el protocolo ilustrado debajo de los datos. La tasa de aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular asociada con la restauración del  $Ca^{2+}$  externo se calculó como la pendiente de la línea recta. (D) El experimento correspondiente del cardiomiocito pretratado con Dzx ilustrado en (B) se realizó siguiendo el protocolo ilustrado debajo de los datos. (E) El gráfico muestra el promedio ( $\pm$  SEM) de la tasa de aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular a partir de las réplicas de los experimentos que se muestran en C y D. (F) Los valores máximos correspondientes del  $Ca^{2+}$  intracelular.  $n = 10-14$ .  $p^* < 0.05$ .

# Pharmacological Preconditioning Using Diazoxide Regulates Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels in Adult Rat Cardiomyocytes

Raul Sampieri<sup>1</sup>, Eridani Fuentes<sup>1</sup>, Elba D. Carrillo<sup>1</sup>, Ascencion Hernandez<sup>1</sup>, Maria C. Garcia<sup>1</sup> and Jorge A. Sanchez<sup>2\*</sup>

- <sup>1</sup>Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), Mexico
- <sup>2</sup>Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), Mexico

Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels and store-operated Ca<sup>2+</sup> channels (SOCs) are the major routes of Ca<sup>2+</sup> entry into mammalian cells. We previously reported that pharmacological preconditioning (PPC) leads to a decrease in the amplitude of Cav1.2 channel currents in the heart. In this study, we examined the changes in SOC function induced by PPC. We measured adult cardiomyocyte membrane currents using the whole-cell patch-clamp technique. In addition, we evaluated reactive oxygen species (ROS) production and intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in cardiomyocytes using fluorescent probes. Diazoxide was used to induce PPC, and depletion of internal stores of Ca<sup>2+</sup> was achieved using thapsigargin. Store depletion generated inward currents with strong rectification, which were suppressed by the SOC blocker GSK-7975-A. These currents were completely abolished by PPC, an effect that was largely prevented by 5-hydroxydecanoate, a selective mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker, or an intracellular mitochondrial energizing

solution. Buffering of ROS and intracellular Ca<sup>2+</sup> with N-acetylcysteine and BAPTA-AM, respectively, also prevented the effects of PPC on SOC currents. Refilling of intracellular stores was largely suppressed by PPC, as determined by measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> using a Fura-2 acetoxymethyl ester. These results indicate that influx of Ca<sup>2+</sup> through SOCs is inhibited by their ROS and Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation during PPC and that downregulation of SOCs by PPC may play a role in cardioprotection following ischemia-reperfusion.

**Keywords:** Orai channels, STIM, SOCS, cardiomyocyte, Pharmacological preconditioning, Diazoxide, ROS, Ischemia-reperfusion

**Received:** 03 Sep 2019; **Accepted:** 19 Dec 2019.

**Copyright:** © 2019 Sampieri, Fuentes, Carrillo, Hernandez, Garcia and Sanchez. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

\* **Correspondence:** Dr. Jorge A. Sanchez, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), Pharmacology, México City, 07360, DF, Mexico, jsanchez@cinvestav.mx