



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

---

**TESIS DOCTORAL**

**PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN EL PRE Y  
POSTACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICOS EN  
CORAZONES DE RATAS HIPERTENSAS  
ESPONTÁNEAS (SHR)**

**LUISA FERNANDA GONZÁLEZ ARBELÁEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. SUSANA M. MOSCA**

**Co-DIRECTORA: DRA. IRENE L. ENNIS**

**• 2014 •**

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis doctoral es el resultado del esfuerzo en el cual, de una forma u otra, participaron muchas personas; leyendo, opinando y corrigiendo, además de la paciencia, el ánimo y la compañía en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a Susana Mosca, directora, amiga y confidente, por haber seguido su intuición y darme la oportunidad de hacer parte del grupo, por el apoyo, enseñanzas y colaboración en todo momento.

A Guille, por su amistad, porque siempre está ahí brindándome una mano y por su buena compañía. A Ale Ciocci por toda la colaboración.

Al director del centro, en ese momento la Dra Alicia Mattiazzi y ahora El Dr Martín Vila Petroff, por permitirme llevar a cabo mis tareas investigativas en el Centro de Investigaciones Cardiovascular CIC.

A las chicas, amigas, hermanas y punto clave en este proceso y en muchos otros aspectos de mi vida cotidiana. Rulos, Juli, Gigi, Caro, Mari, Loren, Vero C, por el apoyo, aguante, compañía, risas, lagrimas..... y creo que me quedo corta con las palabras, las quiero y GRACIAS. Omin, gracias también por hacer parte no de las chicas, pero si del resto de los aspectos.

A Irene, por los consejos, buenos momentos y siempre estar presente con sus enseñanzas.

A todos los que hacen parte del Centro, con los que comparto el día a día, haciendo que cada momento sea agradable y que la jornada de trabajo sea una actividad y no una obligación.

A mi mamà, mujer luchadora y emprendedora que siempre està ahí apoyándonos en todas las decisiones, viviendo uno a uno nuestros logros. A la Tata, mi segunda madre, por el apoyo, el cariño, la ternura.... A mis, tios, primos, cuñis, suegro y familia, Infinitas gracias.

A mi papá, que aunque ya no está con nosotros, siempre estuvo orgulloso de los logros de su niña, así tuvieran que ser a unos cuantos kilómetros de distancia, gracias papito y sé que donde estés, estas feliz y cuidándonos como lo hiciste siempre. A mis hermanos que siempre están ahí con una palabra, un abrazo, una sonrisa.... El entusiasmo y positivismo.

A Martita, Marcelo y Abe, amigos, confidentes y parte de mi familia argentina, porque siempre estuvieron, están y seguirán estando, en las buenas y no tan buenas.

Y por último y muy importante, a mi esposo y a mi hijo Camilo, mi familia. Sin ellos todo lo que hago no tendría sentido, gracias mi amor por la paciencia, fortaleza, consejos amor, etc .A ti hijo hermoso, que todos los días llenas mi vida de alegría, todo lo que hago, trato de hacerlo lo mejor posible por ti y para ti, te amo.

“Ai Ei Eió, Mae Oxum” Salve senhora nossa!!!



ÍNDICE



●	Introducción	5
●	Objetivos	22
●	Materiales y métodos	25
●	Resultados	27
	1. Preacondicionamiento y postacondicionamiento isquémico	29
	2. Intervenciones farmacológicas	35
	2.1. Tratamiento con inhibidor de la GSK-3 $\beta$ : indirubina-3-monoxima,5-yodo (IMI)	35
	2.2. Tratamiento con el inhibidor de PI3K/Akt (wortmanina)	42
	2.3. Tratamiento con celeritrina, inhibidor de la proteína cinasa C (PKC)	48
	2.4. Tratamiento con ciclosporina A, inhibidor de la formación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)	56
	3. Coimmunoprecipitación de P-GSK-3 $\beta$ y P-PKC $\epsilon$	63
●	Discusión	65
●	Conclusiones	75
●	Bibliografía citada	78



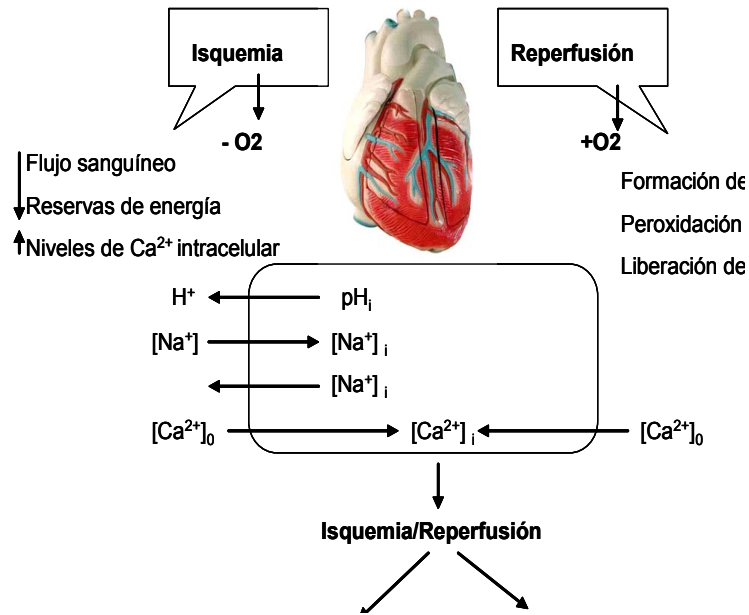
# INTRODUCCIÓN



## Isquemia y Reperfusión

La célula miocárdica, como todas las células del organismo, consume  $O_2$  y elimina  $CO_2$  y  $H_2O$  debido al resultado de su metabolismo aeróbico. Esta tarea conduce a la formación, sobre todo a partir de ácidos grasos y carbohidratos, de fosfatos de alta energía, [ATP (adenosintrifosfato) y CP (creatinafosfato)], que la célula utilizará para el mantenimiento de la asimetría iónica transmembrana y la actividad mecánica. Es así que la concentración intracelular de sodio ( $[Na^+]_i$ ) es mantenida en niveles bajos gracias a la actividad de la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa. Este complejo enzimático, utilizando como fuente de energía la hidrólisis del ATP, promueve la salida de  $Na^+$  desde el interior de la célula al espacio extracelular y al mismo tiempo permite el ingreso de  $K^+$  al compartimiento intracelular. Por otra parte, la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es mantenida en valores aproximadamente mil veces menores que los encontrados en el espacio extracelular gracias al funcionamiento de la bomba  $Ca^{2+}$  ATPasa del sarcolema y del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) (Ytrehus y col, 1994; Murphy y col, 1999). La  $Ca^{2+}$  ATPasa es capaz de transferir la energía del ATP a un intermediario fosforilado de alta energía, que la utiliza para transportar un ión  $Ca^{2+}$ , en contra de su gradiente de concentración, por cada molécula de ATP hidrolizada (Carafoli y Stauffer, 1994).

Cuando el flujo coronario se reduce (isquemia), resulta insuficiente la disponibilidad de oxígeno para la función mitocondrial y lleva rápidamente a la interrupción de la síntesis de ATP aeróbico. El consiguiente incremento de los fosfatos inorgánicos estimulan la generación de ATP anaeróbico, por la vía glucolítica, y se produce un aumento de la producción de lactato. Esta vía es la que suple temporalmente la deficiencia de la vía aeróbica. Cuando las condiciones de hipoxia continúan, la acidificación intracelular produce la activación del intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE) para restaurar el pH intracelular, la activación del NCX, debido al aumento de la  $[Na^+]_i$  y la inhibición de la  $Na^+/K^+$ ATPasa. Esto ocasiona un desequilibrio iónico, la despolarización de la membrana celular y la acumulación de  $Ca^{2+}$  citosólico. Esta sobrecarga de  $Ca^{2+}$  contribuye al daño celular por la activación de proteasas que modifica la integridad de la membrana y, si el período de isquemia es prolongado, desencadenan la muerte celular (Crow y cols, 2004).



**Figura 1:** Eventos que suceden en la isquemia/reperfusion

Inicialmente, las mitocondrias son capaces de amortiguar el aumento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero esta sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial lleva a la pérdida de la impermeabilidad de la membrana mitocondrial y de su potencial. Si la isquemia se extiende, la transferencia de electrones se altera, lo cual resulta en un aumento de la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS). (Chen y cols, 2008). Finalmente, los daños dependen de la duración del evento isquémico, la cual puede, paradójicamente, amplificar la injuria.

El proceso de reperfusion (restablecimiento del flujo coronario) está asociado con cambios bioquímicos y funcionales del miocardio que pueden determinar la supervivencia ó la muerte celular. Aunque la restauración del flujo sanguíneo es un prerrequisito para salvar a la célula miocárdica, la reperfusion en sí misma puede acelerar o adicionar injuria a la ya generada por la isquemia.

Durante esta etapa la normalización del pH extracelular (7.4) y el mantenimiento de la acidosis intracelular, conducen a la activación del NHE y secundariamente al NCX, llevando a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con la re-introducción de  $\text{O}_2$  a la célula miocárdica tiene lugar la producción abrupta de las ROS.

La isquemia-reperfusión puede producir tres tipos de alteraciones: *el atontamiento miocárdico, el infarto al miocardio y las arritmias*, que dependen de la duración de la isquemia.

*Atontamiento miocárdico:*

Este término fue definido por Braunwald y Kloner (1982) como la disminución transitoria de la contractilidad que se observa durante la reperfusión después de cortos períodos de isquemia (aproximadamente 15 a 20 minutos) y en ausencia de daño irreversible.

Las dos hipótesis que permiten explicar las alteraciones del atontamiento miocárdico son la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  y la producción de ROS (Bolli, 1990; Kloner y col 1998; Gao y col, 1997; Van Eyk y col, 1998). La injuria producida por el  $Ca^{2+}$  es en parte mediada por la proteólisis que ocurre como resultado de la activación de proteasas (calpaínas) dependientes de  $Ca^{2+}$ . Especialmente la calpaína ataca a la troponina I (TnI) clivándola y provocando una respuesta disminuida de los miofilamentos al  $Ca^{2+}$  (Gao y col, 1997).

*Infarto de miocardio:*

Se produce cuando la isquemia se prolonga más allá de 20 a 30 min, causando alteraciones ultraestructurales del miocardio que llevan a la muerte celular. Es así, que producir una oclusión coronaria sostenida provoca un infarto agudo de miocardio (IAM) y puede resultar en muerte temprana por paro cardíaco debido a arritmias o a una pérdida suficiente de la contractilidad del ventrículo izquierdo. La restauración del flujo coronario a través de la arteria ocluida es el principal tratamiento del IAM y la aplicación de la reperfusión temprana para restaurar el aporte sanguíneo a la zona de riesgo isquémica es central para limitar la extensión de la injuria irreversible. Sin embargo, es reconocido que la reperfusión puede estar asociada con posterior injuria (Yellon y Baxter, 2000; Downey y Cohen, 2006). Por lo tanto, es apropiado hablar del IAM como una patología por isquemia-reperfusión.

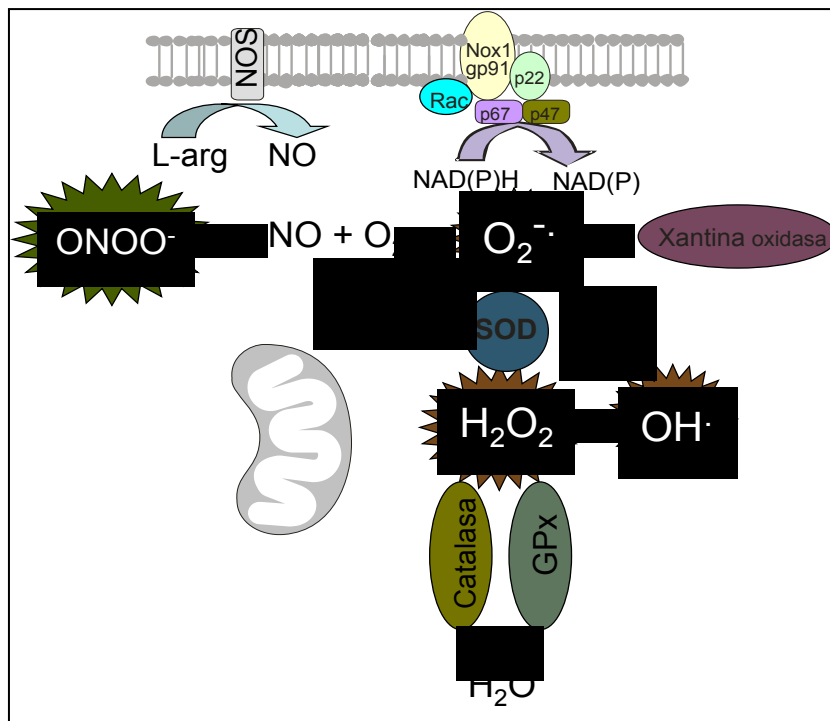
La necrosis y la apoptosis son dos procesos que contribuyen a la muerte celular. Aún cuando existen controversias la mayor parte de las evidencias disponibles sugieren que en el infarto miocárdico el número de células apoptóticas es muy bajo comparado con el de células necróticas. Estos mecanismos serían puestos en marcha cuando se produce la



formación y apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (Crompton M, 1999; Di Lisa y col, 2001; Halestrap y col, 2004) en el cual las ROS y el  $\text{Ca}^{2+}$  participan activamente.

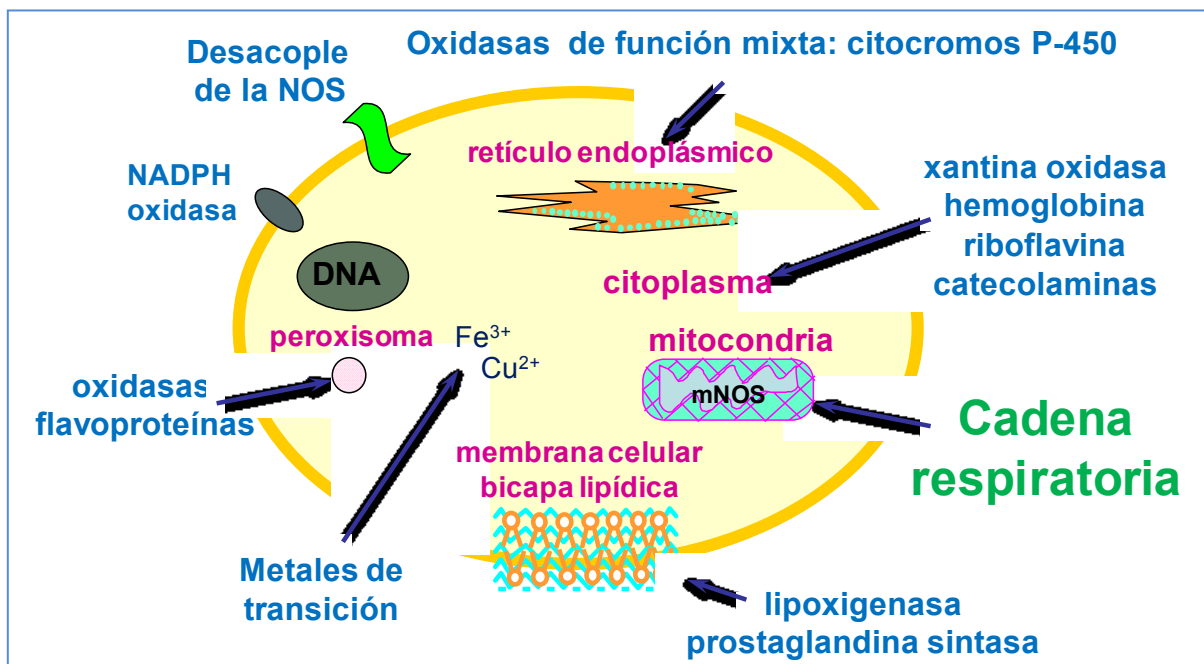
### Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

La generación de radicales libres durante la reperfusión ha sido implicada como responsable en la patogénesis del daño por reperfusión. Particularmente, el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ha sido señalado como el responsable de la peroxidación de las membranas celulares. Dentro de las ROS, también se encuentran, el anión hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) y el óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), y las especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Se incrementan durante la reperfusión del miocardio isquémico y representan uno de los mayores detonantes del daño por reperfusión. Bajo condiciones de estado estacionario, las ROS son producidas en la mitocondria cuando se reduce el oxígeno a agua. En estas condiciones las ROS son parte importante de la homeostasis celular, interviniendo en procesos de señalización, de diferenciación, de mitosis y en la respuesta inmune (Sun y col, 2005).



**Figura 2:** Generación de especies reactivas del oxígeno radicales y no radicales

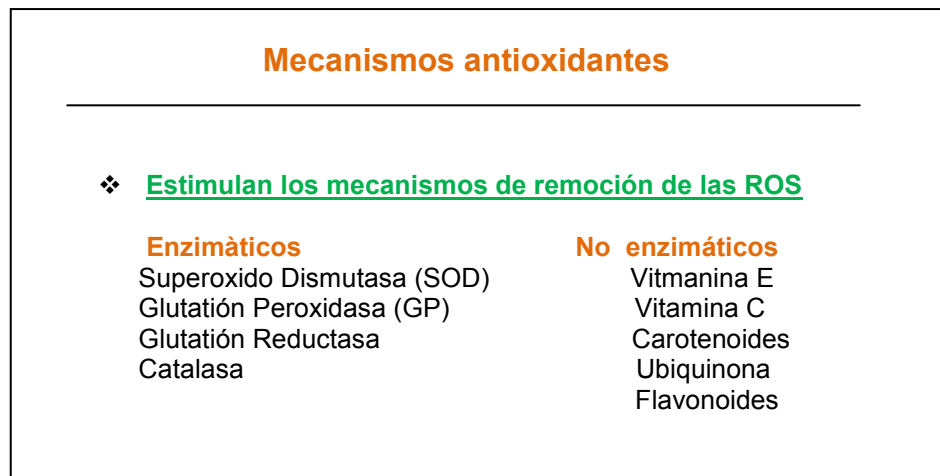
A concentraciones mayores a las fisiológicas, las ROS son consideradas como los principales responsables del daño celular. En el corazón, son sintetizadas por los cardiomiocitos, el endotelio vascular coronario y las células inflamatorias como los neutrófilos. Causan la oxidación de los lípidos de membranas, la desnaturalización de proteínas y provocan además la ruptura del ADN. Las ROS tienen un papel dual actuando como moléculas de señalización o bien activadoras de mecanismos de daño. El desempeño de una u otra función está basado en diversos factores que se relacionan con la concentración sitio-específica de las ROS, la transformación en especies mucho más reactivas y la activación o el cambio de función de las enzimas generadoras de ROS. Por ejemplo, la actividad basal de la xantina deshidrogenasa cambia a actividad de oxidasa bajo condiciones de isquemia. Además, las citocinas y trombinas que se liberan en la reperfusión pueden activar a la NADPH oxidasa del endotelio, favoreciendo la producción de ROS (Zatta y col, 2006).



**Figura 3:** Producción celular de ROS

### Sistemas antioxidantes

El organismo ha adquirido a lo largo de la evolución mecanismos de defensa contra los radicales libres. Estos mecanismos intentan prevenir la producción de los mismos, detener o retardar la reacción de oxidación en cadena que desencadena el radical, reparar los daños que causan a las macromoléculas o degradar las lesionadas. Los mecanismos antioxidantes suelen actuar de forma coordinada, ejercen su función en localizaciones subcelulares concretas, y se agrupan en dos sistemas de defensa antioxidante: sistema enzimático y sistema no enzimático (Hussain, Slikker y Ali, 1995)

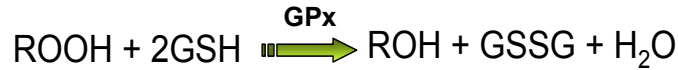


**Figura 4:** Mecanismos antioxidantes

El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: superóxido dismutasa, (SOD), catalasa (CAT) y glutación peroxidasa (GPx); otras tres enzimas, glutación reductasa (GR), glutación-S-transferasa (GST) y  $\gamma$ -glutamyl cisteinil sintetasa (GCS), sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, colaboran indirectamente con la GPx ya que contribuyen a regular el *pool* intracelular de glutación reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos (Hussain, Slikker y Ali, 1995).

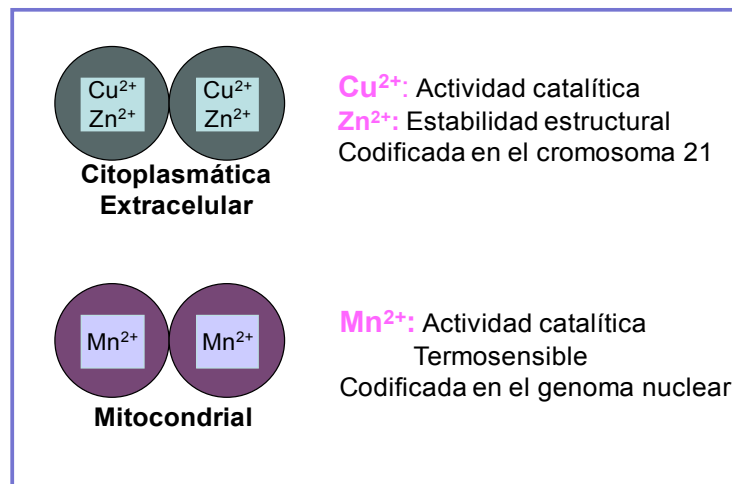
El glutación reducido (GSH): es un tripéptido formado por (glutamato-glicina-cisteína). Éste no solamente actúa como "scavenger" ó atrapante de las ROS, sino que regula el estado

redox intracelular. El sistema del glutatión consiste en el GSH, la GPx y la glutatión reductasa (GRed). La GPx cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros peróxidos convirtiendo el GSH a su forma oxidada (GSSG):



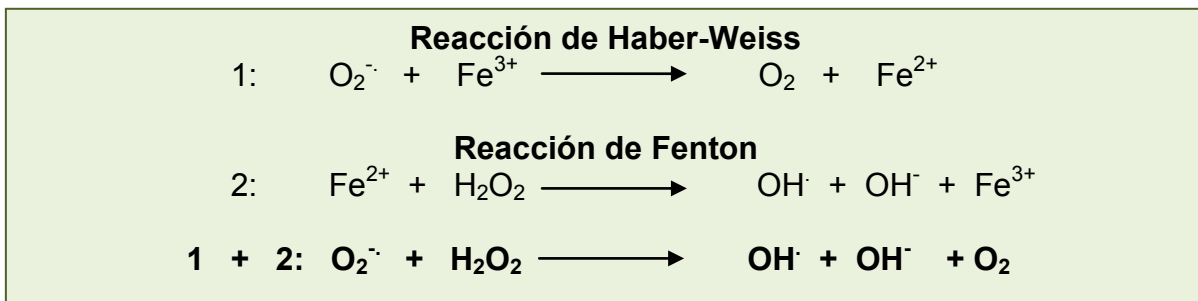
El GSSG es posteriormente reducido de nuevo a GSH por la GRed. En condiciones normales, más del 95% del glutatión celular está en forma reducida, así que el ambiente intracelular es primordialmente reductor. La fuerza reductora del GSH es una medida de su poder de captación de ROS, donación de electrones y de grupos sulfidrilos.

La Superoxido Dismutasa (SOD): representa otro de los grandes sistemas antioxidantes del organismo. Se distinguen la SOD dependiente de Mn, que se localiza dentro de la mitocondria, la SOD dependiente de Cu-Zn que se encuentra en el citosol y la SOD extracelular (EC) que se localiza fuera de la célula (van Deel y col, 2008; Kinnula y Crapo, 2004). Todas las SOD catalizan la reacción de conversión del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en la molécula peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 5:** Superoxido dismutasa (SOD)

Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos se encuentran la albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, ferritina, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas E y C, etc. En la siguiente figura, se realiza una síntesis de las vías de regulación de los sistemas antioxidantes frente a la formación de ROS. Como puede observarse el radical  $O_2^{\cdot-}$  mediante la captación de electrones y la participación de la enzima SOD y de los iones  $Fe^{3+}$  (reacciones de Fenton y de Haber Weiss) se convierte en las especies  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ .



Además de las enzimas SOD, GPx y catalasa que actúan directamente sobre las ROS existen otros “soportes” antioxidantes que incluyen GRed y enzimas involucradas en la vía de las pentosas fosfato que mantienen los niveles celulares de GSH y NADPH, cofactores necesarios para SOD y GPx.

### **La mitocondria**

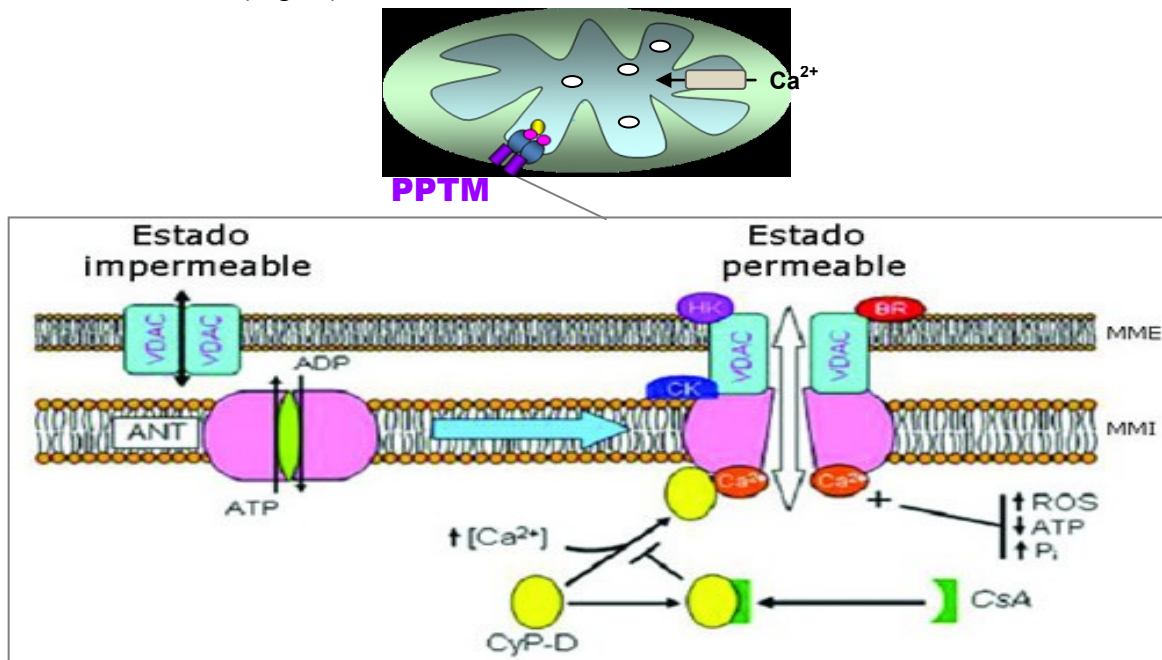
La mitocondria es el organelo donde ocurre la mayor síntesis de ATP por la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, motivo por el que tiene particular importancia en la célula. Además es la principal fuente de ROS intracelular y tiene la capacidad de almacenar calcio. Si bien niveles descontrolados de ROS y una sobrecarga de calcio pueden ser tóxicos para las células, en niveles regulados son factores importantes en la transducción de señales (Murphy y Steenbergen, 2007).

### **Poros de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)**

Frente al estrés producido por la isquemia y reperfusión, la mitocondria responde con la formación del PPTM, un poro no específico multimérico. La formación del PPTM permite el

paso de agua y solutos de peso molecular mayor de 1.5 kDa. Es un canal que funciona con alta conductancia, es dependiente de voltaje y no selectivo. Bajo condiciones fisiológicas normales la membrana mitocondrial interna es impermeable a la mayoría de los solutos y el PPTM no se forma. En condiciones de estrés, como la isquemia-reperfusión, la formación del poro en la membrana interna resulta en la pérdida de la impermeabilidad y rápido colapso del potencial de la membrana mitocondrial. La formación del PPTM ocurre durante la reperfusión y de acuerdo con el tiempo de apertura del mismo se puede desencadenar la apoptosis, la necrosis ó ambas (Crompton y col, 1988; Duchen y col, 1993; Lemasters y col, 1997; Halestrap y col, 1998; Di Lisa y col, 2001). Entonces, la formación o la inhibición del PPTM durante la reperfusión determina la muerte o la sobrevivida celular (Halestrap y col, 2004).

Halestrap y col. (1998) propusieron que el PPTM se produce como resultado de la unión de la ciclofilina D (CyP-D) de la matriz mitocondrial y la adenina nucleótido translocasa (ANT) a la membrana mitocondrial interna. Esta unión se ve favorecida por la modificación del grupo tiol de la ANT ó de otros grupos tioles por las ROS, cuya producción puede ser aumentada por el aumento del  $Ca^{2+}$  intramitocondrial (Kanno y col, 2004). Es decir, la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  y las ROS mitocondriales son los principales inductores de la formación del PPTM (Fig. 5)



**Figura 5:** Componentes y formación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria

**Canal aniónico sensible a potencial (VDAC):** Es la proteína de mayor abundancia en la membrana externa de la mitocondria. Posee un peso molecular de 31 kDa y puede existir en distintos estados conformacionales de diferente selectividad y permeabilidad. Como su nombre lo indica es sensible al potencial de la membrana pero no puede transportar nucleótidos de adenina, ión calcio, ni otros metabolitos (Murphy y Steenbergen, 2007). En este momento su importancia en la formación del poro está en discusión.

**Transportador de Nucleótidos de Adenina (ANT):** Es una proteína de la membrana interna de la mitocondria, tiene un peso molecular de 32 kDa. Su función es transportar ADP y ATP a través de la membrana interna mitocondrial (Armstrong, 2006), se une a CypD cuando se ensambla el PPTM (Woodfield y cols., 1998).

**Ciclofilina D (CypD):** Esta proteína tiene un peso molecular de 17 kDa, se encuentra en la matriz mitocondrial y posee actividad peptidilpropil cis-trans isomerasa. Se postula como una proteína clave en la formación del mPTP (Amstrong, 2006).

Crompton y col. (1988) y Broekemeier y col (1989) observaron que el PPTM puede ser inhibido por la ciclosporina A (CsA) en bajas concentraciones. El efecto inhibitor de la CsA se puede reducir moderadamente aumentando la concentración de  $Ca^{2+}$  (Bernardi y col, 1992), por ello su efecto se describe mejor como "desensibilización del PPTM para el  $Ca^{2+}$ ". Es importante recalcar que el PPTM todavía se puede abrir en la presencia de CsA, hecho que exige un cuidadoso control para evaluar si el poro se encuentra realmente inhibido en presencia de CsA tanto in vitro como in vivo (soriano y cols, 2004).

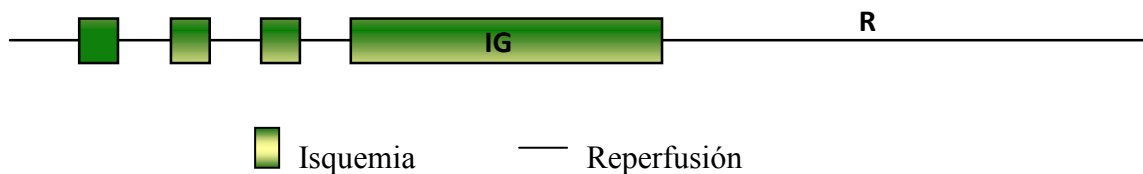
### **Estrategias Cardioprotectoras**

El término cardioprotección se refiere específicamente a intervenciones capaces de disminuir el tamaño del infarto u otras alteraciones determinadas por la isquemia-reperusión como son las arritmias y el deterioro de la función contráctil. En el estudio del miocardio y la isquemia-reperusión, son tan variados los mecanismos de daño, como las estrategias descritas para su protección. A pesar de que estas estrategias son relativamente nuevas, la idea nace en los años 80, donde se observó que reperusiones cortas con flujo coronario bajo en comparación con el normal, mejoraban la actividad

contráctil del corazón, reduciendo parcialmente el daño por reperfusión (Okamoto y col 1986).

### **Preacondicionamiento Isquémico (PI)**

Numerosos trabajos nombran como un mecanismo cardioprotector al “preacondicionamiento isquémico”. El primer reporte citado fue en 1986 por el grupo de Murry y cols (1986), donde se observó que el tamaño del infarto resultante de una isquemia prolongada, podía ser reducido significativamente si el corazón se sometía a episodios breves de isquemia y reperfusión antes de la isquemia de mayor duración. Estudios posteriores confirmaron esta estrategia cardioprotectora en diversas especies tales como el cerdo (Schott y col 1990) y el conejo (Liu y col 1991).



Konomidis y col. (1994) demostraron que la aplicación de episodios cortos de isquemia previos a la isquemia de 90 min mejoraba la sobrevivencia de miocitos cardíacos humanos cultivados. También en 1994, Kloner y Yellon, observaron que pacientes con enfermedad coronaria desarrollaban menos dolor en el segundo que en el primer test de ejercicio cuando esos test estaban separados por un corto período de reposo.

Investigaciones recientes proponen que el PI está compuesto de varias etapas siendo la primera la llamada “trigger” ó “gatillo” que comprende los ciclos preacondicionantes de isquemia-reperfusión que llevan a la activación de ligandos cardioprotectores, siendo la adenosina el primero propuesto por Liu y col. en 1991. Investigaciones posteriores, mencionan a la bradiquinina, acetilcolina, opioides y fenilefrina como posibles mediadores (Cohen y col, 2001). La interacción de dichos ligandos con receptores de membrana lleva a la activación de distintas quinasas, tales como la proteína quinasa C (PKC) (Liu y col, 1994), la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK) (Mocanu y col, 2000), el complejo fosfatidilinositol-3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) (Mocanu y Yellon, 2007), la



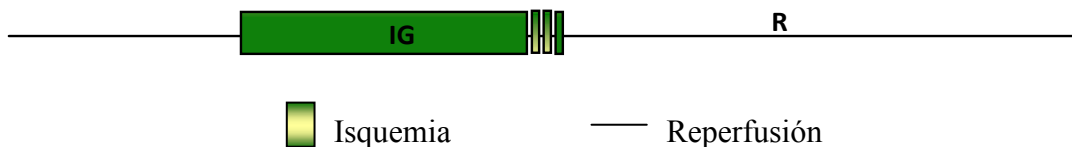
glucógeno sintetasa quinasa-3  $\beta$  (Tong y col, 2002) y el NO. Esta última molécula, de forma directa ó indirecta a través de la activación de la guanilato ciclasa (GC) es considerada un factor importante en la cardioprotección dada por el PI (Rakhit y col, 1999; Bolli, 2001).

La apertura de los canales mitocondriales de potasio dependientes de ATP también está implicada en los mecanismos cardioprotectores del PI (Yang y col, 2010).

### **Postacondicionamiento Isquémico**

En el año 2003, Zhao y col, reportaron otro mecanismo endógeno con potente efecto cardioprotector llamado "postacondicionamiento isquémico" (POS). Este mecanismo consiste en la aplicación de períodos cortos de isquemia y reperfusión al inicio de la reperfusión y representa una estrategia con mayor aplicabilidad clínica, principalmente en pacientes con infarto agudo de miocardio. Estudios confirman que el POS reduce el daño por isquemia y reperfusión, atenuando el tamaño del infarto (Kim y col, 2004).

La duración de los periodos alternos de isquemia y reperfusión en el POS es medida generalmente en segundos, y se dice que son ciclos más cortos en especies pequeñas (de 10 - 15 segundos en ratas y ratones) y ciclos un poco más largos en especies grandes (30 segundos en perros y conejos y 60 segundos en humanos), (Staat, L'Huillier y col., 2005).



En el inicio de la reperfusión ocurre una elevada producción de ROS (Garlick y col, 1987 y Kevin y col, 2003) y entre los efectos cardioprotectores del POS está la reducción de la generación de dichas especies reactivas (Lefer y col, 1991).

Por otro lado, se ha demostrado que el POS mantiene los niveles del sistema antioxidante de glutatión. Es decir que el POS es capaz de disminuir el estrés oxidativo a través de dos mecanismos, disminuyendo la producción de ROS y manteniendo el nivel de los antioxidantes endógenos (Serviddio y col, 2005).

## **Mecanismos cardioprotectores del PI y POS**

Se sabe que el PI genera un aumento en los niveles de adenosinas, bradiquininas y opiodes, los cuales se unen a sus receptores que están acoplados a proteína G, iniciando una cascada de transducción de señales que involucran a PI3K, Akt, GSK-3 $\beta$  y PKC, entre otras moléculas. La activación de estas cascadas, conducen a la activación del canal mitocondrial de potasio dependiente de ATP (mKATP) y a la inhibición de la apertura del PPTM (Downey y cols., 2007).

Se dice que el PI tiene distintos efectos benéficos para la mitocondria: disminuye la sobrecarga de ión calcio, disminuye el estrés oxidativo generado en la reperfusión, mantiene el potencial de membrana, mejora la función respiratoria, reduce la liberación de citocromo c y la apoptosis (Hausenloy y cols., 2004).

El efecto protector observado con el POS, es comparable a los efectos observados con el PI. De hecho, el POS puede reducir los niveles de necrosis, apoptosis y la formación de ROS (Vinten-Johansen, Przyklenk y col., 2011).

Son múltiples las rutas que se activan durante el PI o el POS que convergen en la mitocondria, vía modulación de diferentes quinasas, entre ellas, PI3K/Akt, GSK-3 $\beta$  y la isoforma  $\epsilon$  de la PKC, (Hausenloy, Lecour y Yellon, 2011).

### **Proteína PI3K/AKT:**

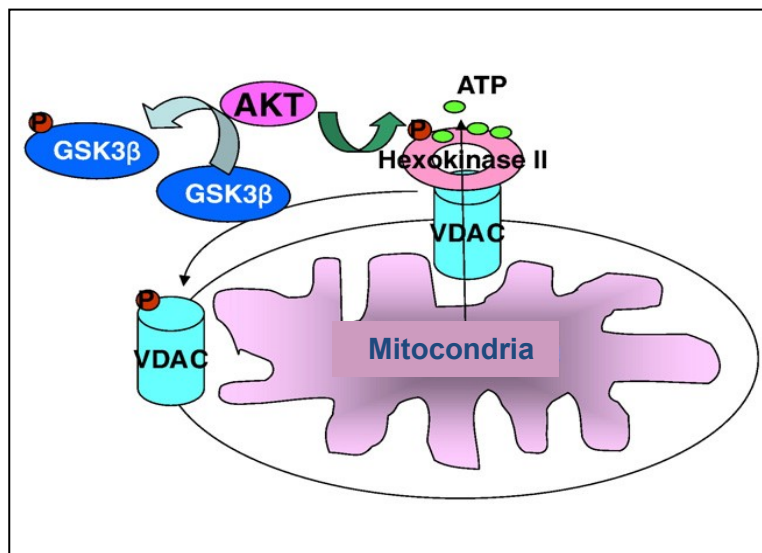
La PI3K, es una quinasa, lipídica heterodimérica, compuesta de una subunidad reguladora y otra catalítica (Marone y col, 2008). La principal función de la PI3K es fosforilar el segundo mensajero fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI-4,5-P2) a-fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5- P3). A través de esta función dicha quinasa juega un papel importante en la regulación de las respuestas celulares a los estímulos externos. Estos procesos incluyen el crecimiento y la supervivencia, el metabolismo, el control del tamaño celular, la respuesta inmune, y la comunicación célula-célula (Wymann y Marone 2005). Por consiguiente, PI-3-K ha sido blanco de estrategias terapéuticas para una amplia gama de enfermedades. A través de PI-3,4,5-P3, se activan moléculas blanco, por medio de su unión al dominio de homología (PH). Este dominio tiene 2 propósitos: uno es añadir restos lipídicos a las proteínas hidrófilas y el otro es exponer el dominio de activación de las

moléculas blanco (Ingleby y Hemmings, 1994). Entre la proteínas que tienen estos dominios una de las más caracterizadas y más importantes es la serina / treonina quinasa Akt (Duronio y col, 1998).

La Akt ó proteína quinasa B juega un papel vital en muchos procesos celulares tales como la proliferación y la supervivencia (Lawlor y Alessi 2001). Akt puede ser activada por muchos tipos de estímulos (Datta y col. 1999), incluyendo factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), hormonas como la insulina y factores de estrés, tales como la temperatura. Akt es la más ampliamente asociada con la PI3K. La activación de Akt comienza una vez que la PI3K cataliza la producción de fosfatidilinositoles-3,4-bifosfato y fosfatidilinositoles-3,4,5-trifosfato (Vanhaesebroeck y Alessi 2000). Estos lípidos reclutan Akt desde el citosol a la membrana plasmática para facilitar su fosforilación en Thr308 y Ser473 por quinastas dependientes de fosfoinosítidos (Datta y col. 1999; (Vanhaesebroeck y Alessi 2000; Lawlor y Alessi 2001). La posterior liberación de Akt activada desde la membrana permite que se fosforilen varios sustratos en el citosol, y que además se transloque al núcleo (Meier y col 1997; Borgatti y col, 2000; Brami-Cherrier y col. 2002). Uno de los primeros sustratos de Akt identificados fue la GSK-3- $\beta$  (Cruz y col, 1995). Tanto GSK-3- $\beta$ , como Akt son proteínas claves que afectan funciones celulares fundamentales (Grimes y Jope 2001). La GSK-3 $\beta$  es generalmente considerada una enzima constitutivamente activa que se mantiene predominantemente en el citosol, pero tanto su actividad y su localización intracelular están sujetas a regulación dinámica. La actividad está regulada por fosforilación, a menudo alcanzada por las vías de señalización que activa Akt, y que fosforilan a la GSK-3 $\beta$  en Ser9, inhibiendo su actividad (Cross y col, 1995).

Experimentos recientes muestran la presencia de Akt en la mitocondria (Bangyan, 2009). Aunque se sabe mucho acerca de los sistemas de señalización que regulan su actividad en el citosol y en el núcleo, es escasa la información acerca de estas enzimas en la mitocondria. En condiciones de hipoxia, se puede inducir la asociación de Akt con la mitocondria (Pelicano y col, 2006). En esta organela, Akt puede directamente fosforilar a la hexoquinasa II en el sitio Thr473 y esta fosforilación aumenta la asociación de la hexoquinasa II con la membrana mitocondrial (Miyamoto y col, 2008). Por lo tanto, a través

de la fosforilación de la hexoquinasa II y la promoción de su asociación con la estructura de poro mitocondrial, Akt mantiene la integridad mitocondrial y promueve la glucólisis y la supervivencia celular (Nakashima y col, 1986; Azoulay-Zohar y col, 2004). (ver fig 6). Sólo hay un único informe que identifica la presencia de GSK-3 $\beta$  en las mitocondrias (Hoshi y col, 1996). Dadas las importantes funciones tanto de Akt y GSK-3 $\beta$  se han examinado si las señales de Akt son dirigidas a las mitocondrias. Los resultados muestran que la mitocondria posee un reservorio de Akt que es rápidamente modulado por señales intracelulares y que la subunidad  $\beta$  de la ATP sintetasa y la GSK3 $\beta$  fueron fosforiladas por Akt (Gautam, Bijur y Jope, 2003).



**Figura 6:** Regulación del metabolismo mitocondrial por Akt.

### **Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3 $\beta$ ):**

La GSK-3 se caracterizó por su capacidad de fosforilar e inhibir la glucógeno sintasa, una etapa reguladora clave en la síntesis de glucógeno para almacenamiento de la glucosa (Embi y col, 1980). Existen 2 isoformas homólogas de GSK-3, la  $\alpha$  y la  $\beta$  (Ross y col, 1999). La GSK-3  $\alpha$  participa principalmente en la producción de amiloide y la GSK-3 $\beta$  es una figura central en muchas vías de señalización, ya que fosforila diversos sustratos metabólicos, proteínas de señalización y factores de transcripción (Grimes y Jope, 2001).

Estudios recientes muestran que la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en Ser9 mejora la tolerancia del miocardio frente a las lesiones por isquemia- reperfusión (Foster et al, 2006). Uno de los efectos es la disminución del tamaño del infarto observada en el PI. También se demostró que la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en Ser9 la inhibe, reduciendo su actividad quinasa (Juhaszova y col 2004). La administración de inhibidores de GSK-3 $\beta$ , tales como el cloruro de Li y la indirubina-3-monoxima-5-yodo, imitando el efecto de la fosforilación en Ser9, reduce la necrosis de las células cardíacas producida por isquemia-reperfusión (Gross, Hsu y Gross, 2004; Li, Bijur y Jope, 2002; Sutherland, Leighton y Cohen, 1993). Una hipótesis atractiva para el mecanismo por el cual la P-GSK-3 $\beta$  protege a los cardiomiocitos de la lesión por isquemia/reperfusión, es la supresión de la apertura del PPTM (Juhaszova y col 2004). Trabajos previos sugieren que los efectos de la inhibición de la GSK-3 $\beta$  se centran principalmente en la mitocondria y la apertura limitada del PPTM (Juhaszova y col., 2004).

Diversas vías de señalización que están dirigidas hacia Akt o PKC, convergen para causar un grado de protección similar al PPTM (como efector final), fosforilar e inhibir la actividad de la GSK-3 $\beta$ . Se ha encontrado que sirven también como un punto clave próximo a los componentes que forman el complejo del PPTM y limitar su apertura (Juhaszova y col., 2004).

### **Proteína quinasa C (PKC):**

La PKC es una serina/treonina quinasa que se activa por cofactores lipídicos. Existen múltiples isoformas de PKC en el corazón, cada una de las cuales tiene un sustrato específico. Las formas clásicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) son dependientes de DAG y de Ca<sup>2+</sup>. Las isoformas  $\delta$ ,  $\eta$  y  $\epsilon$  son independientes de la concentración de Ca<sup>2+</sup> y sólo necesitan DAG. La importancia de PKC en el PI fue reportada por el grupo de Mitchell y col en 1995. Sin embargo la primera evidencia de que PKC puede mediar el efecto protector del PI fue presentada por Ytrehus y col en el 2004.

También la PKC es un elemento clave en la cardioprotección derivada del POS, Zatta y col, 2006, reportaron una reducción significativa en el tamaño del infarto, en ratas a las

cuales se les aplicó un protocolo de POS (3 ciclos de 10 segundos de isquemia/reperfusión), al inicio de la reperfusión y que este efecto fue atenuado con la administración de celeritrina, un inhibidor específico de PKC. La administración de la celeritrina 5 minutos antes de la reperfusión, anula el efecto del POS sobre el tamaño de infarto, mientras que la aplicación del 4 $\beta$ -phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), un activador de la proteína PKC en lugar del POS, resulta cardioprotector (Philipp y col., 2006).

En conjunto, estos datos sustentan la participación de PKC en la protección por el POS.

En modelos murinos, se sabe que las isoformas de la PKC que predominan son la  $\delta$  y la  $\epsilon$ . Ambas isoformas están involucradas en el daño por isquemia/reperfusión. La isoforma  $\delta$  se transloca a la mitocondria en los primeros minutos de la reperfusión, induciendo una mayor producción de anión superóxido. Es decir que la translocación de PKC $\delta$  se relaciona con una alteración mitocondrial y liberación de citocromo C (Churchill y Szveda, 2005). Por otro lado, la isoforma  $\epsilon$  de la PKC fue relacionada con el efecto cardioprotector, a través de una inhibición de la formación del PPTM (Zatta y col, 2006).

recientemente fue demostrado que PKC $\epsilon$  interactúa con los componentes del poro en la mitocondria cardiaca (Baines y col., 2003). La inmunoprecipitación de mitocondrias cardiacas de ratón, revelaron la asociación física de la proteína PKC $\epsilon$  con ANT y VDAC, así como, la fosforilación directa de de VDAC por PKC $\epsilon$ , siendo esta la forma como PKC $\epsilon$  puede regular la apertura del PPTM, y proteger a la célula contra la muerte inducida por reperfusión (Buday y Mochly-Rosen., 2007).

• • •  
**OBJETIVOS**  
• • •

## **Objetivo general**

Estudiar los efectos y vías de señalización involucradas en el preacondicionamiento isquémico (PI) y postacondicionamiento isquémico (POS) en corazones de ratas hipertensas espontáneas (SHR) sometidas a protocolos isquemia-reperfusión.

## **Objetivos específicos**

- 1.- Examinar los efectos del PI (con 1 y 3 ciclos) y POS sobre el tamaño infarto y la función miocárdica postisquémica en corazones aislados de SHR sometidos a 45 min de isquemia global y 60 min de perfusión.
- 2.- Determinar el papel de la enzima glucógeno sintetasa quinasa  $3\beta$  (GSK-3  $\beta$ ), en el citosol y en la mitocondria, en los efectos de las intervenciones aplicadas. Para ello, utilizaremos una herramienta farmacológica como es el inhibidor específico de GSK-3 $\beta$ , indirubina-3-monoxima-5-yodo (IMI).
- 3.- Evaluar la participación de la fosfatidilinositol-3'-quinasa (PI3K/Akt), en el citosol y en la mitocondria, en los efectos de las intervenciones aplicadas. Para ello, usaremos como herramienta farmacológica a la wortmanina, inhibidor de PI3K/Akt.
- 4.- Estudiar el rol de la isoforma  $\epsilon$  de la proteína quinasa C (PKC $\epsilon$ ), en el citosol y en la mitocondria, en los efectos de las intervenciones aplicadas. Para ello, utilizaremos como herramienta farmacológica a la celeritrina, inhibidor de PKC.
- 5.- Estudiar la participación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM) en los efectos de las intervenciones aplicadas. Para ello, se usará la ciclosporina A (CsA), inhibidor específico de la ciclofilina D (componente citosólico del PPTM) para evitar la formación del poro.
- 6.- Evaluar la sensibilidad del PPTM al calcio en una suspensión de mitocondrias aisladas de corazones sometidos a los distintos protocolos.
- 7.- Evaluar el daño oxidativo analizando en homogenatos de corazones sometidos a los distintos protocolos, la peroxidación lipídica y el contenido de glutatión reducido (GSH).
- 8.- Determinar las posibles asociaciones físicas de P-GSK-3 $\beta$  y P-PKC $\epsilon$  con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) de la mitocondria en el PI y POS.



• • •

# MATERIALES Y MÉTODOS

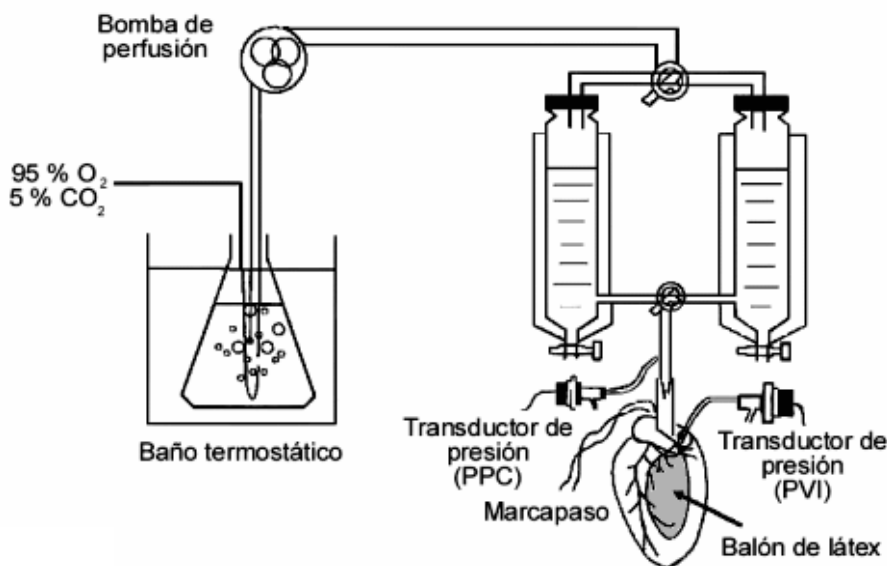
• • •

## ANIMALES

Se utilizaron ratas machos hipertensas espontáneas (SHR) de 5 a 6 meses de edad obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos (publicación N° 85-23, revisada en el año 1996).

### Obtención del corazón aislado

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Se les abrió rápidamente el tórax, se aisló la aorta y se cortaron las conexiones cardíacas liberando al corazón de grasa y tejido conectivo, sacándolo del animal. La aorta se ligó con hilo de lino a una cánula colocada en un sistema de perfusión de Langendorff. Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor de 50 seg para evitar el deterioro del preparado. El corazón fue perfundido con una solución de Ringer compuesta por: ClNa 120 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 1.35 mM, ClK 4.7 mM, SO<sub>4</sub>Mg 1.2 mM, CO<sub>3</sub>HNa 20 mM y glucosa 11.1 mM, la cual fue termostaticada a 37°C y equilibrada con una mezcla gaseosa de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>, para obtener un valor de pH de aproximadamente 7.40.



**Figura 1:** Representación esquemática del modelo experimental

Luego de un breve período de estabilización, se produjo el bloqueo aurículo-ventricular dañando con una fina aguja el tejido conductor del septum auricular. La estimulación eléctrica se realizó a través de dos electrodos que fueron suturados a la pared ventricular derecha para mantener la frecuencia cardíaca constante en un valor de  $280 \pm 10$  lat/min. Para evaluar la actividad mecánica se colocó un balón de látex atado a un tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral. El extremo opuesto del tubo fue conectado a un transductor de presión (AD Instruments) que permitió medir la presión del ventrículo izquierdo (PVI) (Figura 1). El globo de látex y el tubo de polietileno se llenaron con un volumen de agua suficiente para lograr una presión diastólica final (PDF) de entre 8-12 mmHg. Dicho volumen se mantuvo constante durante todo el experimento. La presión de perfusión coronaria fue monitoreada en el punto de canulación de la aorta y ajustada a valores entre 60 y 75 mmHg. El flujo coronario, controlado por una bomba peristáltica fue de aproximadamente 10-12 ml/min en todos los grupos experimentales. La PVI fue adquirida usando un conversor analógico-digital y el programa de adquisición Chart V4.2.3 (AD Instruments). A través de esta señal se obtuvieron los parámetros mecánicos necesarios para evaluar la función miocárdica.

## **PROTOCOLOS EXPERIMENTALES**

### **1- Control (C)**

Perfusión durante 140 min.

### **2- Control Isquémico (CI)**

- a) Estabilización (E): 35 min
- b) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- c) Reperfusión (R): 1 hora



### **3- Preacondicionamiento Isquémico (1 ciclo, PI)**

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG /10 min R
- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

d) Reperusión (R): 1 hora



#### 4- Preacondicionamiento Isquémico (3 ciclos, 3PI)

a) Estabilización (E): 15 min

b) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG /5 min R

c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

d) Reperusión (R): 1 hora



#### 5- Postacondicionamiento isquémico (POS)

a) Estabilización (E): 35 min

b) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

c) 3 ciclos de IG-R: 30 seg IG/ 30 seg R

d) Reperusión (R): 1 hora



#### 6- Tratamiento con 1 mM de indirubina-3'-monoxima,5-yodo (IMI, inhibidor específico de GSK-3 $\beta$ ) previamente a la isquemia (IMIpri)

a) Estabilización (E): 25 min

b) IMI: 10 min

c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

d) Reperusión (R): 1 hora



**7- Tratamiento con 1 mM de indirubina-3'-monoxima,5-yodo (IMI, inhibidor específico de GSK-3 $\beta$ ) previamente a la isquemia (IMI3pre)**

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) IMI: 15 min
- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- d) Reperusión (R): 1 hora



**8- Tratamiento con IMI en el inicio de la reperusión (IMIpos)**

- a) Estabilización (E): 35 min
- b) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- c) IMI: 3 min
- d) Reperusión (R): 1 hora



**9- CI + 100  $\mu$ M wortmanina (inhibidor de PI3K/Akt)**

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) Wortmanina (W): 15 min
- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- d) Reperusión (R): 1 hora



**10- PI + 100  $\mu$ M wortmanina (inhibidor de PI3K/Akt)**

- a) Estabilización (E): 5 min
- b) Wortmanina (W): 15 min

- c) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG /10 min R
- d) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- e) Reperusión (R): 1 hora



### 11- 3PI + 100 $\mu$ M wortmanina

- a) Estabilización (E): 10 min
- b) Wortmanina (W): 15 min
- c) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG /5 min R
- d) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- e) Reperusión (R): 1 hora



### 12- POS + 100 $\mu$ M wortmanina

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) Wortmanina (W): 15 min
- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- d) 3 ciclos de IG-R: 30 seg IG/ 30 seg R
- e) Reperusión (R): 1 hora



### 13- Cl + 1 $\mu$ M celeritrina (inhibidor de PKC)

- a) Estabilización (E): 20 min.
- b) Celeritrina (Ce): 15 min

c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

d) Reperusión (R): 1 hora



#### 14- PI + 1 $\mu$ M celeritrina

a) Estabilización (E): 5 min

b) Celeritrina (Ce): 15 min

c) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG /10 min R

d) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

e) Reperusión (R): 1 hora



#### 15- 3PI + 1 $\mu$ M celeritrina

a) Estabilización (E): 10 min

b) Celeritrina (Ce): 15 min

c) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG /5 min R

d) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min

e) Reperusión (R): 1 hora



#### 16- POS + 1 $\mu$ M celeritrina

a) Estabilización (E): 20 min.

b) Celeritrina (Ce): 15 min

- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- d) 3 ciclos de IG-R: 30 seg IG/ 30 seg R
- e) Reperusión (R): 1 hora



**17- CI + 0.5  $\mu$ M ciclosporina A (inhibidor del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria)**

- a) Estabilización (E): 20 min.
- b) Ciclosporina A (CsA): 15 min
- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- c) Reperusión (R): 1 hora



**18- PI + 0.5  $\mu$ M ciclosporina A**

- a) Estabilización (E): 5 min
- b) Ciclosporina A (CsA): 15 min
- c) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG /10 min R
- d) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- e) Reperusión (R): 1 hora



**19- 3PI + 0.5  $\mu$ M ciclosporina A**

- a) Estabilización (E): 10 min
- b) Ciclosporina A (CsA): 15 min



- c) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG /5 min R
- d) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- e) Reperusión (R): 1 hora



**20- POS + 0.5  $\mu$ M ciclosporina A**

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) Ciclosporina A (CsA): 15 min
- c) Isquemia global normotérmica (IG): 45 min
- d) 3 ciclos de IG-R: 30 seg IG/ 30 seg R
- e) Reperusión (R): 1 hora



Estos protocolos experimentales fueron repetidos 3 veces. Una serie fue utilizada para la determinación del tamaño del infarto. La otra para todas las determinaciones bioquímicas. La tercera serie fue usada para el aislamiento de mitocondrias.

**PARÁMETROS MEDIDOS**

Presión arterial sistólica

Este parámetro se controló semanalmente en la cola de las ratas en forma indirecta usando el método pletismográfico (Byrom y Wilson, 1938) y siguiendo las modificaciones detalladas en el trabajo realizado por Fritz y Rinaldi (2007).

Determinación del tamaño del infarto

Al término del período de reperfusión el corazón fue retirado del sistema de perfusión de Langendorff y el ventrículo izquierdo (VI), una vez pesado, se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Al cabo de este tiempo el VI fue cortado en trozos de 2 mm de espesor a lo largo del eje mayor desde la punta a la base, los cuales fueron pesados y sumergidos en una solución al 1 % de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) durante 15 min (Fishbein y col, 1981). El colorante ingresa a las células y al ser reducido queda atrapado en su interior tiñéndolas de color rojo. Sólo las células que conservan actividad deshidrogenasa, pueden retener este colorante. En consecuencia, las células que se encuentran vivas, quedarán teñidas de color rojo, mientras que las células muertas no se teñirán, permitiendo así la diferenciación del tejido infartado (Figura 2). Los trozos de corazón fueron guardados en formalina al 10% por 24 horas luego de lo cual se escanearon y, usando un programa de análisis de imágenes (Scion Image 1.62), se determinaron los pesos de las áreas de infarto y de las áreas de riesgo. El peso total del infarto se calculó como  $(A1 \times P1) + (A2 \times P2) + (A3 \times P3) + (A4 \times P4) + (A5 \times P5) + (A6 \times P6)$ , donde A es el área de infarto de cada trozo y P el peso respectivo. Como en esta preparación el corazón entero constituye el área de riesgo (AR), el peso total del área de riesgo fue calculado de la misma forma que el peso del infarto pero teniendo en cuenta el peso y el área total de cada trozo. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje de AR (Suzuki y col., 2001).



**Figura 2.** Trozos de VI teñidos con TTC.

### Función sistólica y diastólica miocárdicas

La función sistólica fue evaluada a través de la presión desarrollada del VI (PD) que se calculó restando a la PVI la PDF. La función diastólica fue evaluada a través de la PDF.

## **DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS**

### Preparación del homogenato del tejido cardíaco

Al final de la reperfusión, luego de finalizado cada uno de los protocolos experimentales, los corazones se retiraron del sistema de perfusión de Langendorff. Una porción del VI fue homogeneizada en la proporción de 1 g de tejido en 5 ml de buffer compuesto por  $\text{KPO}_4\text{H}_2$  25 mM y ClK 140 mM a pH = 7.4. El tejido fue homogeneizado durante 1 min a una temperatura entre 0-2 °C con el homogenizador Polytron. Una alícuota del homogenato fue centrifugado 10 min a 3000 rpm y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Otra alícuota fue usada para medir el contenido de glutatión reducido (GSH).

### **ESTRÉS OXIDATIVO**

#### 1- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la estimación de la peroxidación lipídica se utilizó la determinación de TBARS, (Buege y Aust, 1978). El ensayo consistió en lo siguiente: a 0.5 ml del sobrenadante se le agregó 1.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.67 % y 0.5 ml de agua bidestilada. La preparación se agitó 10 seg y se incubó a 100 °C durante 15 min. Al término de este período se observó la formación de un producto de color rosado. Las muestras fueron enfriadas y centrifugadas 10 min a 2500 rpm. En el sobrenadante obtenido se leyó la absorbancia a 535 nm contra un blanco con mezcla de reacción y sin muestra. Los resultados fueron expresados como nmoles por mg de proteína (nmoles/mg de prot), utilizando el coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2- Glutatión reducido (GSH)

Para la determinación del contenido de GSH se midieron los grupos sulfidrilos no unidos a proteínas. El fundamento de la reacción consiste en que el 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) es reducido por los grupos sulfidrilos a 2-nitro-5 mercaptobenzoico, que es de color amarillo intenso. El ensayo consistió en lo siguiente: a una alícuota (820 µl) del homogenato se agregó 180 µl de TCA al 28 %. Las muestras se agitaron y luego se centrifugaron 10 min a 7.000 rpm. A 250 µl del sobrenadante se le agregaron 250 µl de

TCA al 5 %, 1 ml de Tris HCl a una concentración de 0.4 M (pH = 8.9) y 25 µl del colorante DTNB preparado en metanol a una concentración final de 10 mM. Se midió la absorbancia a 414 nm dentro de los 5 min de agregado el DTNB contra un blanco con la mezcla de reacción sin muestra. Se realizó una curva de calibración usando distintas concentraciones de GSH. Los resultados obtenidos se expresaron como µg por mg de proteína (µg/mg prot) (Sedlak y Lindsay, 1958).

### 3- Western Blot

Otra porción del VI fue homogeneizada en frío en un buffer para el ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) compuesto por 300 mM sacarosa, 1 mM dithiothreitol (DTT), 4 mM Acido acético de etilen glicol (EGTA), 20 mM TRIS pH 7.4, 1% Triton X, 10% cóctel de proteasa, 25 µM fluoruro de sodio (FNa), 1 µM Ortovanadate. Luego, la muestra fue centrifugada a 1000 x g por 15 min a 4 °C para remover núcleos y restos celulares. El sobrenadante fue seguidamente centrifugado a 10 000 x g por 30 min. El sobrenadante resultante fue ahora centrifugado a 100 000 x g por 1 hora y se obtuvo así la **fracción citosólica**. El residuo de la centrifugación de 10 000 x g, correspondiente a la **fracción mitocondrial** fue resuspendido y otra vez centrifugado a 10 000 x g por 30 min (Baines, Zhang, Wang y col, 2002). Las mitocondrias lavadas fueron entonces resuspendidas. 100 µg de proteína mitocondrial y 60 µg de la citosólica fueron sembradas en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para la corrida electroforética (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) durante 2 horas. El teñido con Ponceau S confirmó el uso de la misma cantidad de proteína en todas las muestras sembradas en el gel. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con 5 % de leche descremada en solución salina conteniendo TRIS (pH 7.5) y 0.1 % Tween 20 (TBS-T) e incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-pSer9 GSK-3β (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-Akt (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-MnSOD (1:1000, Abcam) y anti-pPKCε (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Luego las membranas fueron lavadas 4 veces por 10 min en una solución salina con buffer TRIS y Tween 20 (TBS-T) antes del agregado del anticuerpo secundario policlonal de conejo (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). Las bandas fueron analizadas por un sistema de quimioluminiscencia

(ECL Plus; Amersham Biosciences). Las señales de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) y del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) de la membrana mitocondrial externa usando los anticuerpos específicos (anti-GAPDH y anti-VDAC) fueron usadas como control de las fracciones citosólica y mitocondrial, respectivamente.

#### 4- Coimmunoprecipitación

100 µl de los sobrenadantes obtenidos de la primera homogeneización de los corazones fueron aplicados a 50 µl de la proteína Sepharose A (suspensión al 50%) por 1 hora a 4 °C. Después de la centrifugación durante 5 min a 9000 rpm a 4 °C los lisados fueron incubados toda la noche en heladera con un anticuerpo policlonal de conejo anti-VDAC (5 µl, 6.7 mg IgG) y 100 µl de Sepharose A. La resina fue lavada 2 veces para remover uniones proteicas no específicas. Después de la centrifugación a 9000 rpm x 5min, la resina fue resuspendida en buffer SDS-PAGE. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de acrilamida al 7.5% o 10%. Los inmunoblots fueron confirmados con los anticuerpos anti-pSer9-GSK-3β (1:1000) y anti-P-PKCε (1:1000).

#### 5- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue evaluada por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando la albúmina de suero bovino como estándar.

#### **Aislamiento de mitocondrias**

Al término de la reperusión el VI fue utilizado para el aislamiento de las mitocondrias por centrifugación diferencial (Mela y Seitz, 1979). El VI fue inicialmente lavado en una solución fría de aislamiento (SA) compuesta por 75 mM sacarosa, 225 mM manitol y 0.01 mM EGTA neutralizada con el buffer TRIS a pH 7.4. Luego se lo trozó, se descartó la solución de lavado y se reemplazó por SA nueva (5 ml), transfiriendo esta suspensión a un homogeneizador de mano. Antes de comenzar el proceso de homogeneización se agregó 0.8 mg de una proteinasa (bacterial, tipo XXIV, Sigma, llamada primeramente Nagarse). El proceso de homogeneización total no llevó más de 14 min realizado en 2 etapas de 7 min cada una (con el agregado de 5 ml de SA fresca cada vez). El homogenato fue

cuidadosamente transferido después de cada etapa a un tubo de centrifuga de policarbonato. Después de una centrifugación de 5 min a 480 x g para descartar núcleos y restos celulares el sobrenadante fue centrifugado a 7 700 x g por 10 min para sedimentar a las mitocondrias. Este sedimento fue lavado 2 veces con SA y un último enjuague con SA sin EGTA centrifugando cada vez a 7 700 x g por 5 min.

#### Determinación de la sensibilidad al $\text{Ca}^{2+}$ del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)

La respuesta de la suspensión mitocondrial al  $\text{Ca}^{2+}$  fue evaluada incubando mitocondrias aisladas en una solución conteniendo ClK 120 mM, (3-[N-Morfolino]-ácido propanesulfónico) (MOPS) 20 mM, TRIS-ClH 10 mM y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}_5$  mM ajustada a pH = 7.4 (Baines, Bolli, y col, 2003). Aproximadamente 0.3 mg de la suspensión mitocondrial energizada con 6 mM de succinato, fueron incubados durante 5 min y luego tratados con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . El PPTM se abre en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y los solutos entran libremente a la matriz mitocondrial provocando la hinchazón de la organela. Este cambio es observado como disminución de la dispersión de luz y fue seguido usando un espectrofluorómetro Hitachi F4500 con control de temperatura y agitación continua a 520 nm como longitud de onda de excitación y emisión (Facundo, de Paula, y Kowaltowski, 2007). La dispersión de la luz (DL) fue calculada para cada muestra como la diferencia entre la observada antes y después del agregado de  $\text{CaCl}_2$ .

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Para establecer las diferencias significativas entre dos grupos experimentales se utilizó la prueba de t-Student. Para la comparación de más de dos grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. En todos los casos el valor de 0,05 se consideró como el límite de significación estadística.

• • •  
**RESULTADOS**  
• • •

En la Tabla a continuación se muestran los datos del peso corporal (PC), peso del corazón (PCo), el índice de hipertrofia (relación PVI/PC) y la presión arterial sistólica (PAS) de las ratas SHR asignadas a los siguientes grupos: control (C); control isquémico (CI); un ciclo de PI; 3 ciclos de PI (3PI); POS; tratado con IMI durante las reperfusiones de los protocolos de PI, 3PI y POS (IMIpre, IMI3pre e IMIpos); PI, 3PI y POS en presencia de wortmanina (PI + wort, 3PI + wort y POS + wort); CI con celeritrina (CI + Ce); PI con celeritrina (PI + Ce); 3 PI con celeritrina (3PI + Ce); POS con celeritrina (POS + Ce); CI con ciclosporina (CI + CsA); PI con ciclosporina (PI + CsA); 3PI con ciclosporina (3PI + CsA) y POS con ciclosporina (POS + CsA).

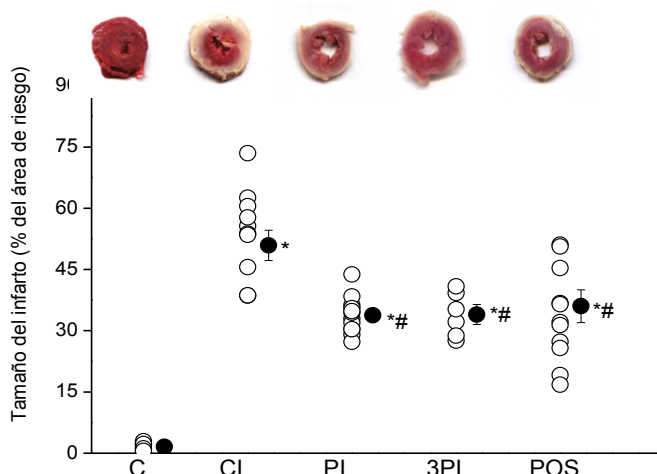
<b>Grupo</b>	<b>PC (g)</b>	<b>PVI (mg)</b>	<b>IH</b>	<b>PAS (mmHg)</b>
<b>C</b>	336 ± 12	1.50 ± 0.04	4.5 ± 0.1	216 ± 5
<b>CI</b>	328 ± 10	1.53 ± 0.07	4.7 ± 0.2	204 ± 8
<b>PI</b>	329 ± 13	1.43 ± 0.04	4.4 ± 0.2	208 ± 8
<b>3PI</b>	341 ± 15	1.51 ± 0.04	4.4 ± 0.1	210 ± 6
<b>POS</b>	325 ± 13	1.52 ± 0.07	4.7 ± 0.2	213 ± 4
<b>IMIpre</b>	330 ± 14	1.54 ± 0.03	4.7 ± 0.1	218 ± 4
<b>IMI3pre</b>	302 ± 5	1.56 ± 0.05	4.1 ± 0.2	220 ± 7
<b>IMIpos</b>	322 ± 10	1.52 ± 0.05	4.7 ± 0.2	230 ± 10
<b>PI + wort</b>	340 ± 12	1.60 ± 0.07	4.7 ± 0.2	215 ± 7
<b>3PI + wort</b>	321 ± 13	1.60 ± 0.08	4.9 ± 0.2	226 ± 9
<b>POS + wort</b>	332 ± 15	1.52 ± 0.05	4.6 ± 0.2	230 ± 11
<b>CI + Ce</b>	328 ± 11	1.50 ± 0.03	4.6 ± 0.1	218 ± 7
<b>PI + Ce</b>	331 ± 17	1.55 ± 0.07	4.7 ± 0.5	203 ± 4
<b>3PI + Ce</b>	320 ± 10	1.07 ± 0.01	4.2 ± 0.2	212 ± 5
<b>POS + Ce</b>	326 ± 14	1.20 ± 0.07	4.3 ± 0.3	219 ± 6
<b>CI + CsA</b>	329 ± 13	1.49 ± 0.09	4.8 ± 0.2	210 ± 4
<b>PI + CsA</b>	320 ± 19	1.54 ± 0.06	4.8 ± 0.2	209 ± 4
<b>3PI + CsA</b>	340 ± 10	1.57 ± 0.03	4.7 ± 0.2	235 ± 12
<b>POS + CsA</b>	330 ± 12	1.57 ± 0.05	4.7 ± 0.2	214 ± 5



## 1. Preacondicionamiento y Postacondicionamiento Isquémicos

### Tamaño del infarto:

En la Figura 1, se muestran los valores individuales y promedios del tamaño del infarto medido al final del periodo de reperfusión en corazones de SHR pertenecientes a los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. En el **grupo C** el valor promedio fue de **1,6 ± 0,4 %**, en el **grupo CI** **51 ± 4 %**, y en los grupos **PRE**, **3PI** y **POS** **34 ± 1%**, **34 ± 2 %** y **36 ± 4 %** respectivamente.



**Figura 1:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos control (C, n = 8), control isquémico (CI, n = 10), un ciclo de preacondicionamiento isquémico (PI, n = 12), 3 ciclos de preacondicionamiento isquémico (3PI, n = 6) y postacondicionamiento isquémico (POS, n = 11). \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

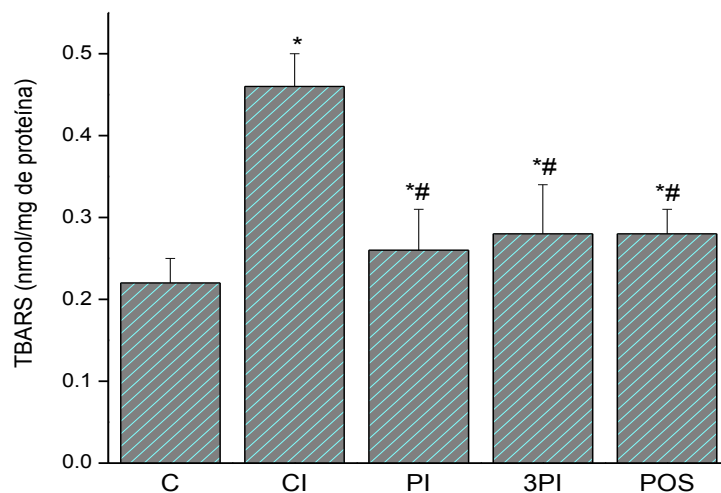
### Función sistólica y diastólica miocárdicas:

En los corazones del grupo C, la contractilidad observada al final de los 140 min de perfusión disminuyó sólo un 10% con respecto al valor de estabilización. La presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (**PDVI**) fue de **80 ± 3 mmHg vs 91 ± 1 mmHg**. Sin embargo, en los corazones sometidos a isquemia-reperfusión (grupo CI) la PD se recuperó escasamente (aproximadamente 1%). Similares recuperaciones de la

contractilidad se obtuvieron después de la aplicación de las intervenciones cardioprotectoras (PI, 3PI y POS). La función diastólica, medida a través de la presión diastólica final (PDF), no se modificó con la perfusión (grupo C) pero aumentó significativamente durante la reperfusión en el grupo CI. **Desde un valor de  $10 \pm 1$  mmHg** observado al final de los 35 min de estabilización llegó hasta  **$86 \pm 8$  mmHg al final de la reperfusión**. En los grupos **PI, 3PI y POS** los valores observados fueron superiores y/o similares ( **$112 \pm 7$ ,  $112 \pm 2$  y  $91 \pm 10$  mmHg**, respectivamente).

#### Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

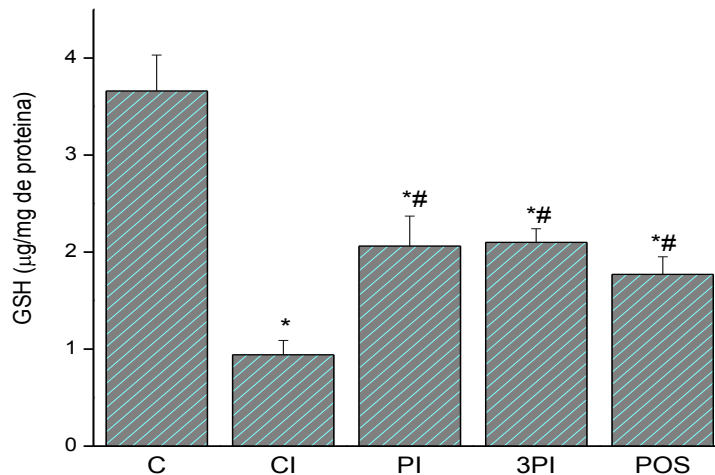
En la Figura 2 se muestra la concentración de TBARS (indicador de la peroxidación lipídica) en homogenatos de miocardio. En el **grupo C** fue de  **$0,22 \pm 0,03$  nmol/mg proteína**. La aplicación de la isquemia y la reperfusión produjo un aumento significativo de TBARS cuyo valor al final del período de reperfusión fue de  **$0,46 \pm 0,04$  nmol/mg proteína**. Cuando los corazones fueron sometidos a los protocolos de **PI, 3PI y POS** los niveles de TBARS disminuyeron, alcanzando valores de  **$0,26 \pm 0,05$ ,  $0,28 \pm 0,06$  y  $0,28 \pm 0,03$  nmoles/mg prot**, respectivamente.



**Figura 2:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína, en los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

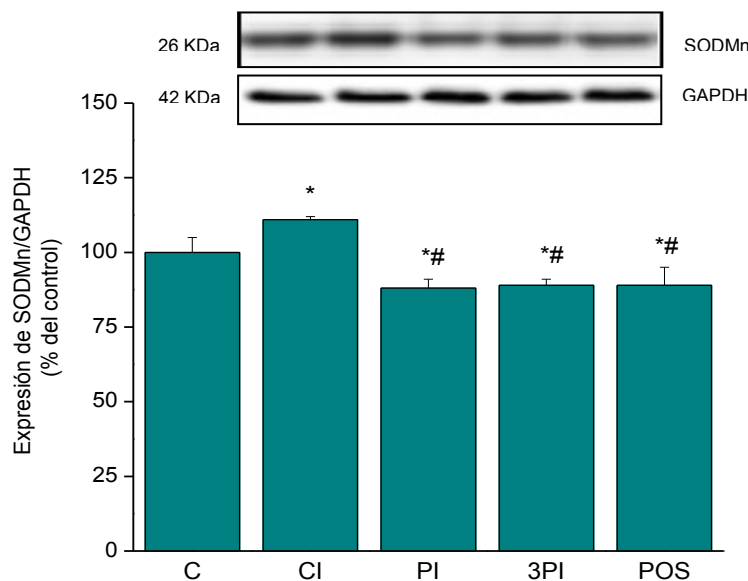
#### Glutathión reducido (GSH):

En la Figura 3 se muestra el contenido miocárdico del GSH. El valor en los corazones del grupo **C** fue de **3,7 ± 0,4 µg/mg de proteína** y disminuyó en aquellos sometidos a isquemia-reperfusión (**grupo CI**) a **0,8 ± 0,1 µg/mg proteína**. Con las intervenciones se preservaron parcialmente los niveles de GSH, siendo de **2,1 ± 0,3**, **2,1 ± 0,1** y **1,8 ± 0,2 µg/mg proteína para los grupos PI, 3PI y POS**, respectivamente.



**Figura 3:** Contenido de glutatión reducido (GSH), expresado en µg por mg de proteína, en los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

Expresión de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SODMn) citosólica:

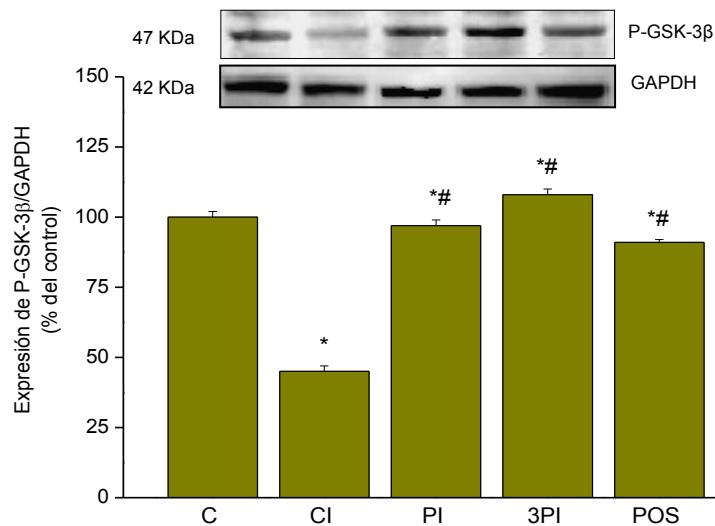


**Figura 4:** Expresión de SODMn/GAPDH, como porcentaje del control, en corazones de los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

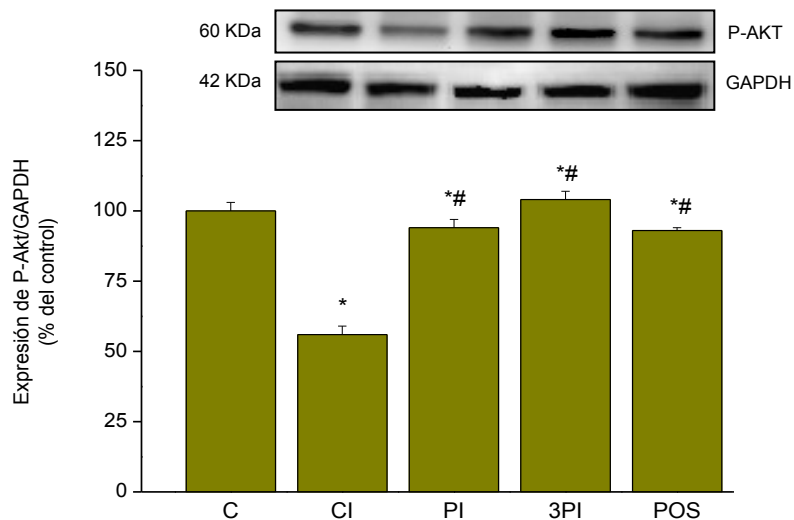
La expresión de la enzima SODMn en el citosol aumentó en el grupo **CI (111 ± 1%)** y disminuyó significativamente en los **grupos PI, 3PI y POS**, siendo los valores de **88 ± 3 %**, **89 ± 3 %**, **89 ± 2 %**, respectivamente (Figura 4).

Expresión de GSK-3β y Akt fosforiladas, en la fracción citosólica:

La expresión de GSK-3β fosforilada (P-GSK-3β) en la fracción citosólica disminuyó significativamente en el grupo **CI (45 ± 4 %)** y las intervenciones recuperaron parcialmente su contenido, alcanzando valores de **97 ± 2 %**, **108 ± 2 %** y **91 ± 1%** en los **grupos PI, 3PI y POS**, respectivamente.



**Figura 5:** Expresión de P-GSK-3β en la fracción citosólica, como porcentaje del control, en los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

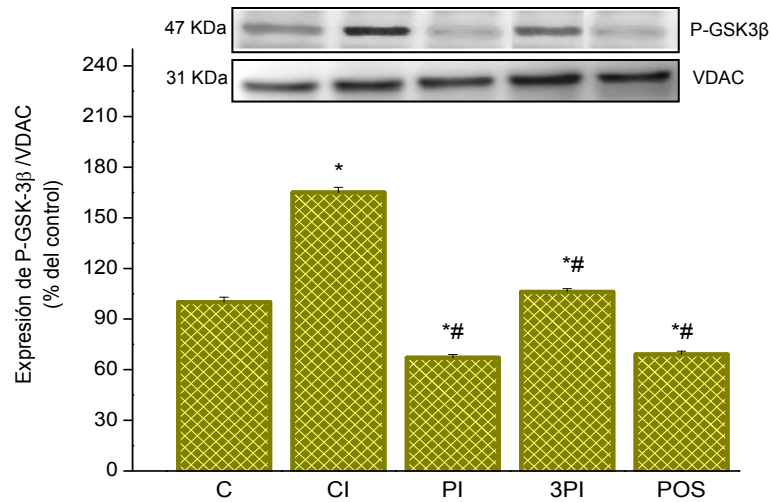


**Figura 6:** Expresión de P-Akt en la fracción citosólica, como porcentaje del control, en los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

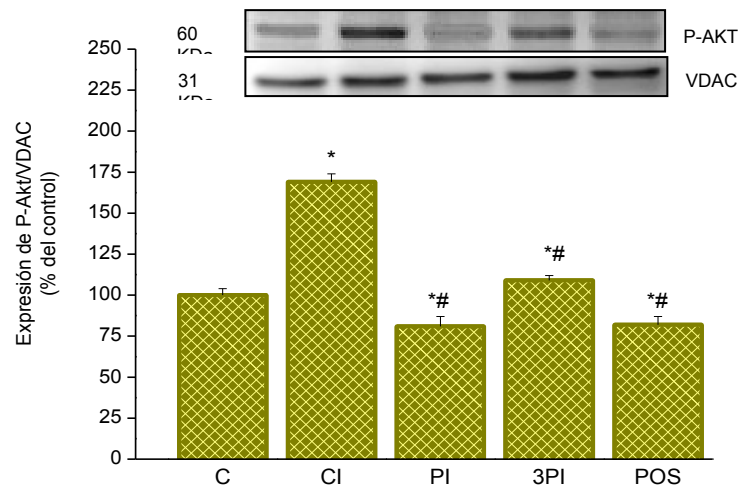
El nivel de P-Akt disminuyó significativamente en el grupo **CI (56 ± 3 %)** y con los tratamientos se recuperó parcialmente, siendo los valores de **94 ± 3 %**, **104 ± 3 %** y **93 ± 1%** para **PI, 3PI y POS**, respectivamente.

Expresión de las proteínas P-GSK-3β y P-Akt en la fracción mitocondrial:

En la Figura 7 se observa que la expresión de P-GSK-3β en la fracción mitocondrial, normalizada según la expresión de VDAC, aumentó en los corazones del grupo **CI (165 ± 3 %)** con respecto a los del grupo **C (100 ± 3 %)**. Las intervenciones disminuyeron ese valor, siendo de **67 ± 1 %**, **106 ± 2 %** y **69 ± 1 %** en los grupos **PI, 3PI y POS**, respectivamente. P-Akt mostró el mismo comportamiento, aumentando en el grupo **CI** y disminuyendo en los corazones intervenidos. Los valores fueron de **169 ± 5 %**, **81 ± 6 %**, **109 ± 3 %** y **82 ± 5 %** en los **grupos CI, PI, 3PI y POS**, respectivamente (Figura 8).



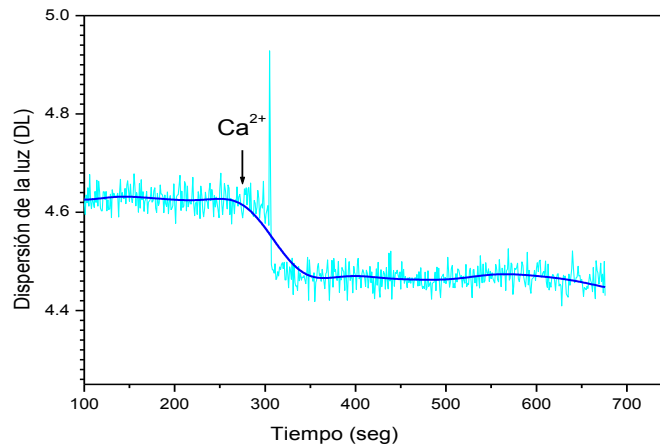
**Figura 7:** Expresión de P-GSK-3 $\beta$  en la fracción mitocondrial, como porcentaje del control, en los corazones de los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.



**Figura 8:** Expresión de P-Akt en la fracción mitocondrial, como porcentaje del control, en los corazones de los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 7 para cada grupo \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

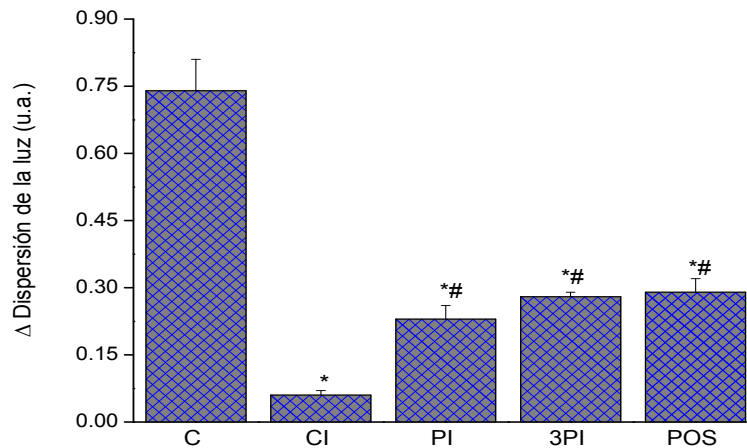
Medida de la sensibilidad del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM) al calcio:

El agregado de calcio a una suspensión mitocondrial produce una disminución de la dispersión de la luz como muestra el registro típico de la Figura 9.



**Figura 9:** Dispersión de la luz (DL) producida por el agregado de calcio a una suspensión mitocondrial en función del tiempo.

Las mitocondrias obtenidas de corazones del grupo **C** mostraron un decaimiento de DL de **0,74 ± 0,07** unidades arbitrarias (u.a.) ante el agregado de 200 μM de calcio. En aquellas obtenidas de los corazones del grupo **CI** el valor fue de **0,06 ± 0,01 u.a.** En mitocondrias aisladas de los **grupos PI, 3PI y POS** los cambios de DL fueron de **0,23 ± 0,03 u.a., 0,28 ± 0,01 u.a y 0,29 ± 0,03 u.a.**, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10:** Cambios de la dispersión de la luz producido por el agregado de una dosis de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  a mitocondrias aisladas de corazones de los grupos C, CI, PI, 3PI y POS. n = 5 para cada grupo.

\*  $p < 0,05$  con respecto a C; #  $p < 0,05$  con respecto a CI.

**De los resultados hasta aquí presentados podemos inferir que el PI, 3PI y POS producen:**

- 1.- Disminución del tamaño del infarto**
- 2.- No hubo modificación de la recuperación postisquémica de la función miocárdica**
- 2.-Disminución de la peroxidación lipídica y preservación parcial del contenido de GSH**
- 3.- Disminución de la expresión de SODMn en el citosol**
- 4.- Aumento de P-GSK-3 $\beta$  y de P-Akt en la fracción citosólica**
- 5.-Disminución de P-GSK-3 $\beta$  y P-Akt en la fracción mitocondrial**
- 6.- Aumento de la sensibilidad del PPTM al calcio**

## **2. Intervenciones farmacológicas**

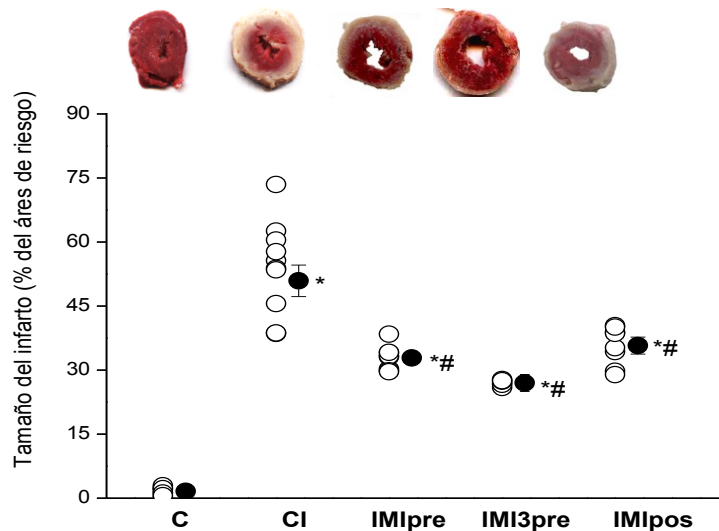
### **2.1. Tratamiento con inhibidor de la GSK-3 $\beta$ : indirubina-3-monoxima,5-yodo (IMI):**

Los corazones fueron tratados con IMI, un inhibidor específico de la GSK-3 $\beta$ , a una dosis de 1 $\mu\text{M}$ . La administración de dicho inhibidor fue realizada antes de la isquemia (IMI pre), durante los 3 ciclos de PI (IMI3pre) ò en los primeros 3 min de la reperfusión (IMI pos).



### Tamaño del infarto:

En la Figura 11 se muestran los valores promedios de los tamaños del infarto medidos al final del periodo de reperfusión de corazones pertenecientes a los grupos C, CI, IMIpre, IMI3pre, e IMIpos. En el grupo **CI** el tamaño del infarto fue de **51 ± 4 %**, el cual disminuyó significativamente con el tratamiento con el inhibidor, ya sea administrándolo antes, durante los 3 ciclos del PI o después de la isquemia global de 45 min. Así los **grupos IMIpre, IMI3pre e IMIpos** mostraron tamaños de infarto de **33 ± 1%, 27 ± 1% y 36 ± 2%**, respectivamente. Los valores de **IMIpre e IMIpos** fueron similares a los obtenidos con **PI y POS**. Sin embargo, el de **IMI3pre** fue significativamente menor que el obtenido en el grupo **3PI**.

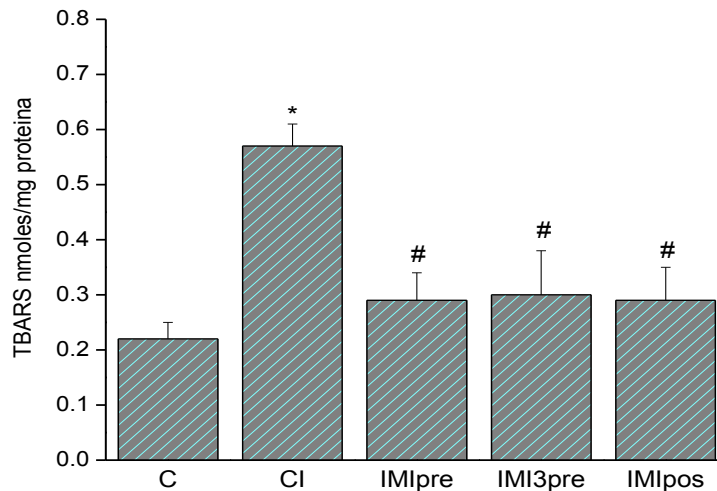


**Figura 11:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo en los grupos control (C, n = 8), control isquémico (CI, n = 10) y tratados con IMI antes de la isquemia (IMIpre, n = 8) ó al inicio de la reperfusión (IMIpos, n = 8) y en el grupo de 3 ciclos de preconditionamiento isquémico con IMI (IMI3pre, n = 5). \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

### Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

La concentración de TBARS fue de **0,57 ± 0,04 nmoles/mg proteína** en el **grupo CI**, la cual disminuyó significativamente con el tratamiento con IMI, el inhibidor de GSK-3β, administrado antes (15 ó 20 min) ó después de la isquemia (Figura 12).

Los valores fueron  $0,29 \pm 0,05$  nmoles/mg prot en el grupo IMIpre,  $0,30 \pm 0,08$  nmoles/mg prot en el grupo IMI3pre y  $0,29 \pm 0,06$  nmoles/mg proteína en el grupo IMIpos. Estos valores fueron similares a los observados en los grupos PI, 3PI y POS

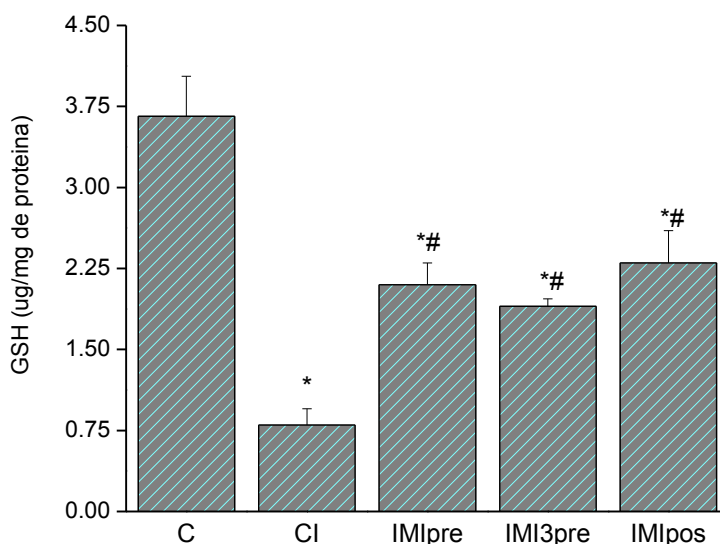


**Figura 12:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína, en los grupos C (n = 5), CI (n = 5), IMI (pre y pos) e IMI3pre. n = 5 para cada grupo con IMI. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

### Glutación reducido (GSH):

La Figura 13 muestra los niveles de GSH en los grupos tratados con IMI. El contenido de GSH de los corazones sometidos a **isquemia-reperfusión** fue de  $0,8 \pm 0,1$   $\mu\text{g/mg}$  **proteína**, el cual fue significativamente menor que el observado en corazones no isquémicos. El tratamiento con IMI logró preservar parcialmente el nivel de dicho antioxidante obteniendo valores mayores que los del grupo CI.

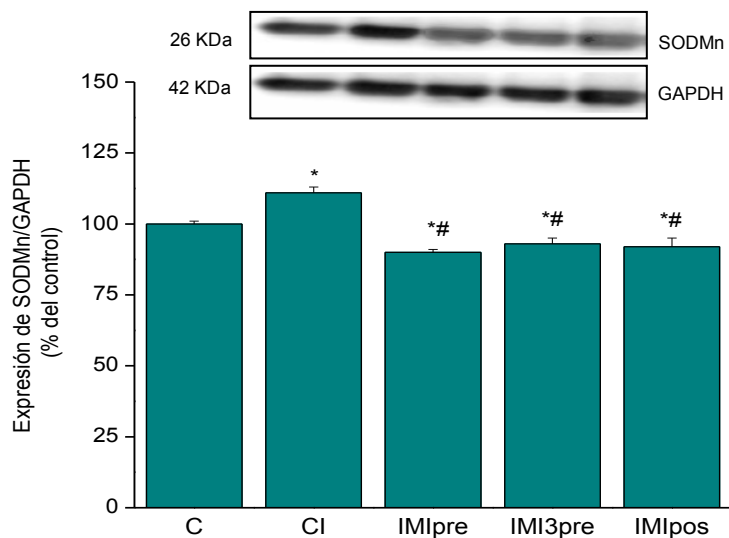
Estos valores fueron de  $2,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$  proteína para el grupo **IMlpre**,  $1,9 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{mg}$  proteína en el grupo **IMlpos** y  $2,3 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$  proteína en el grupo **IMI3pre**. Estos valores fueron similares a los observados en los grupos PI, 3PI y POS.



**Figura 13:** Contenido de glutatión reducido (GSH), expresado en  $\mu\text{g}$  por mg de proteína, en los grupos C (n = 7), C (n =7), IMlpre, IMI3pre, IMlpos. n = 5 para cada grupo con IMI. \* p < 0,05 con respecto a CI.

*Expresión de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD Mn) citosólica:*

En la Figura 14 se muestran los valores observados en la expresión de SODMn en los grupos tratados con IMI. En el grupo **CI** se observa un aumento de la expresión de SODMn ( $111 \pm 1 \%$ ) que fue significativamente atenuado en los grupos tratados con IMI, siendo los valores de  $90 \pm 1 \%$ ,  $93 \pm 2 \%$  y  $92 \pm 1 \%$  en **IMlpre**, **IMI3pre** e **IMlpos**, respectivamente. Estos valores fueron similares a los observados en los grupos PI, 3PI y POS.

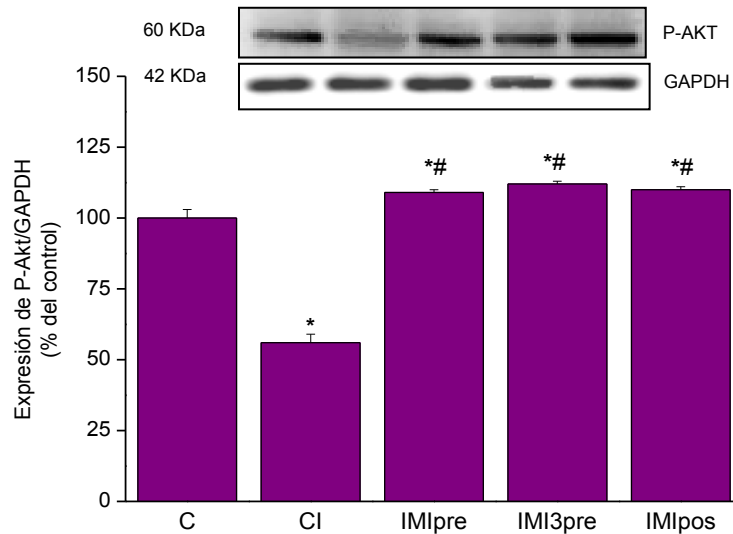


**Figura14:** Expresión citosólica de SOD Mn, expresado como porcentaje del control C (n = 7), en corazones de los grupos CI (n = 7), IMIpre, IMI3pre e IMIpos. n = 5 para cada grupo tratado con IMI. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

Contenido de GSK-3β y Akt fosforiladas, en la fracción citosólica:

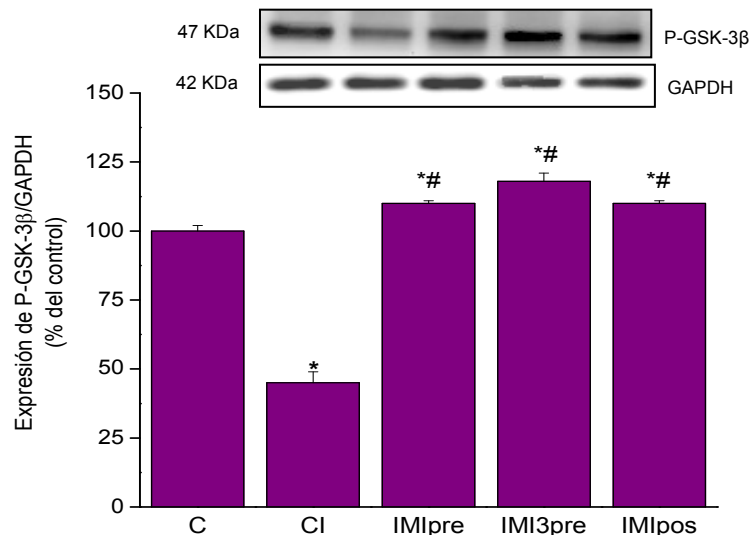
En la Figura 15, se muestra la expresión de P-GSK-3β y P-Akt en la fracción citosólica, normalizadas con GAPDH. La expresión de P-GSK-3β disminuyó en los corazones sometidos a isquemia-reperfusión (**grupo CI**) a un valor de **45 ± 4 %** con respecto a los corazones **no isquémicos (100 ± 2 %)**. El tratamiento farmacológico (IMI) aumentó la expresión de dicha enzima. Los valores alcanzados fueron de **110 ± 1 %**, **118 ± 3 %** y **110 ± 1 %**, para los grupos **IMIpre**, **IMI3pre** e **IMIpos**, respectivamente. Estos valores fueron significativamente mayores que los observados en los grupos PI, 3PI y POS.

La expresión de P-Akt en el grupo **C** fue de **100 ± 3%**, disminuyó en el **CI** a **56 ± 3%** y aumentó en los grupos tratados siendo los valores de **109 ± 1%**, **112 ± 1** y **110 ± 1%** para **IMIpre**, **IMI3pre** e **IMIpos**, respectivamente (Figura 16). Estos valores fueron significativamente mayores que los observados en los grupos **PI**, **3PI** y **POS**.



**Figura 15:** Expresión de la P-GSK-3 $\beta$  en la fracción citosólica, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones de los grupos, CI (n =7), IMIpre, IMI3pre e IMIpos. n = 5 para cada grupo tratado con IMI. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

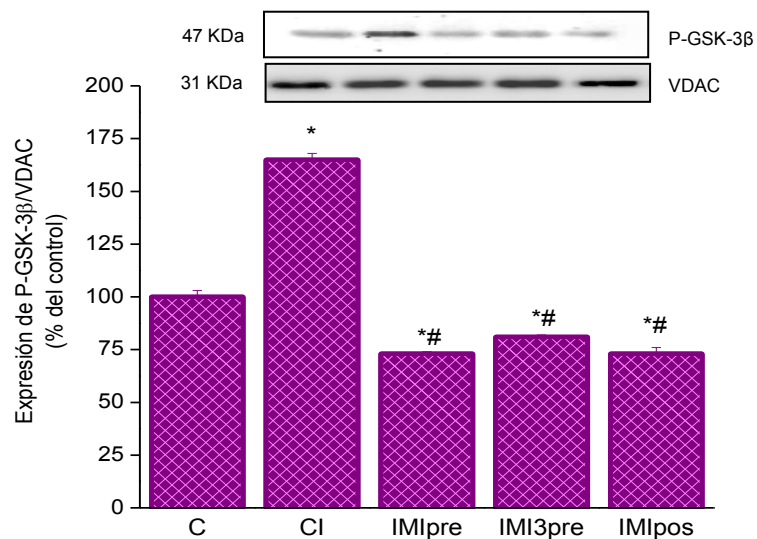
La expresión de P-Akt en el grupo **C** fue de **100 ± 3%**, disminuyó en el **CI a 56 ± 3%** y aumentó en los grupos tratados siendo los valores de **109 ± 1%**, **112 ± 1%** y **110 ± 1%** para **IMIpre, IMI3pre e IMIpos**, respectivamente (Figura 16).



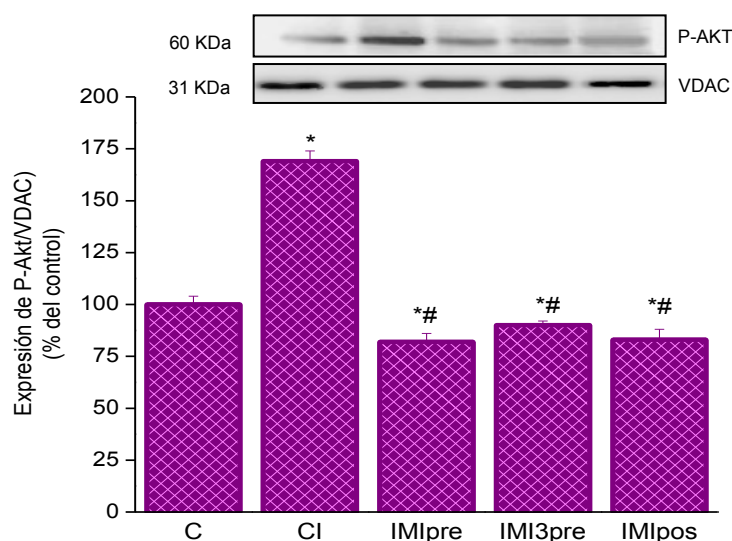
**Figura 16:** Expresión de P-Akt en las fracción citosólica, expresada como porcentaje de expresión de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones de los grupos CI (n =7), IMIpre, IMI3pre e IMIpos. n = 5 para cada grupo tratado con IMI. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

Contenido de GSK-3 $\beta$  y Akt fosforiladas en la fracción mitocondrial:

La expresión de P-GSK-3 $\beta$  en la fracción mitocondrial fue de  $100 \pm 3 \%$  y  $165 \pm 3\%$ , para los grupos **C** y **CI**. En los grupos tratados con IMI los valores fueron de  $73 \pm 1\%$ ,  $81 \pm 3 \%$  y  $73 \pm 1 \%$  para **IMIp**, **IMI3pre** e **IMIpos**, respectivamente (Figura 17). El contenido de P-Akt fue de  $100 \pm 4 \%$  y  $169 \pm 5\%$  para los grupos C y CI, respectivamente. Con el tratamiento con IMI los valores de P-Akt fueron de  $82 \pm 4 \%$ ,  $90 \pm 2 \%$  y  $83 \pm 5 \%$  para **IMIp**, **IMI3pre** e **IMIpos**, respectivamente (Figura 18). Los valores de ambas proteínas de los grupos **IMIp** e **IMIpos** fueron similares a los observados en los grupos **PI** y **POS**. Sin embargo, los obtenidos en el grupo **IMI3pre** fueron significativamente menores que aquellos hallados en el **3PI**.

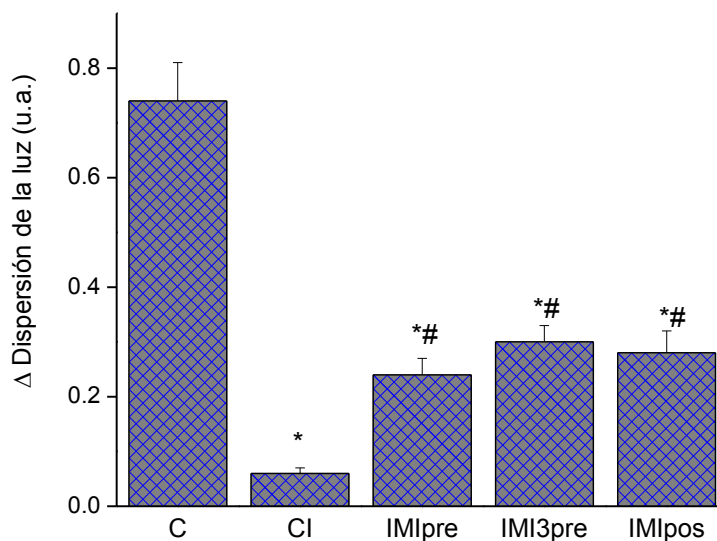


**Figura 17:** Expresión de P-GSK-3 $\beta$  en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones, CI (n =7), IMIp, IMI3pre e IMIpos. n = 5 para cada grupo tratado con IMI. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.



**Figura 18:** Expresión de P-Akt en las fracción mitocondrial como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones, CI (n =7), IMIpre, IMI3pre e IMI pos. n = 5 para cada grupo tratado co IMI. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

Medida de la sensibilidad del PPTM al calcio:



**Figura 19:** Cambios de la dispersión de la luz (DL), expresada en unidades arbitrarias (u.a.) producida por el agregado de calcio a muestras mitocondriales pertenecientes a los grupos C, CI e IMI (pre, IMI3pre y pos). n = 5 para cada grupo. \* p < 0,05 con respecto a CI.

Como se observa en la Figura 19 el tratamiento con el inhibidor de la enzima GSK-3 $\beta$  recuperó parcialmente la sensibilidad del PPTM al calcio en comparación a la observada

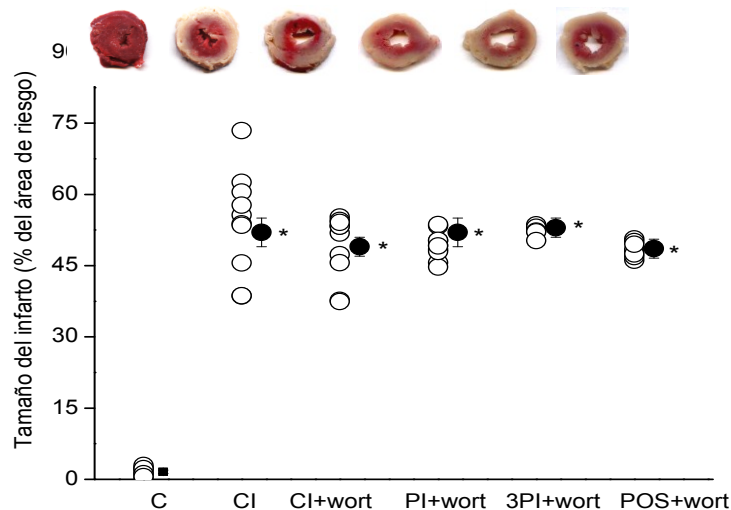
en el grupo CI. El cambio de la dispersión de la luz fue de  $0.24 \pm 0.03$  u.a.,  $0.30 \pm 0.03$  u.a. y  $0.28 \pm 0.04$  u.a. en los grupos IMIpre, IMI3pre e IMI pos, respectivamente. Estos valores fueron similares a los observados en los grupos PI, 3PI y POS.

**De los resultados hasta aquí presentados podemos inferir que el tratamiento con IMI- inhibidor de la enzima GSK-3 $\beta$ - produce:**

- 1.- Disminución del tamaño del infarto**
- 2.- Disminución de la peroxidación lipídica y preservación parcial del contenido de GSH**
- 3.- Disminución de la expresión de SODMn en el citosol**
- 4.- Aumento de P-GSK-3 $\beta$  y de P-Akt en la fracción citosólica**
- 5.- Disminución de P-GSK-3 $\beta$  y de P-Akt en la fracción mitocondrial**
- 6.- Aumento de la sensibilidad del PPTM al calcio**

## 2.2 Tratamiento con el inhibidor de PI3K/Akt (wortmanina):

### Tamaño del infarto:



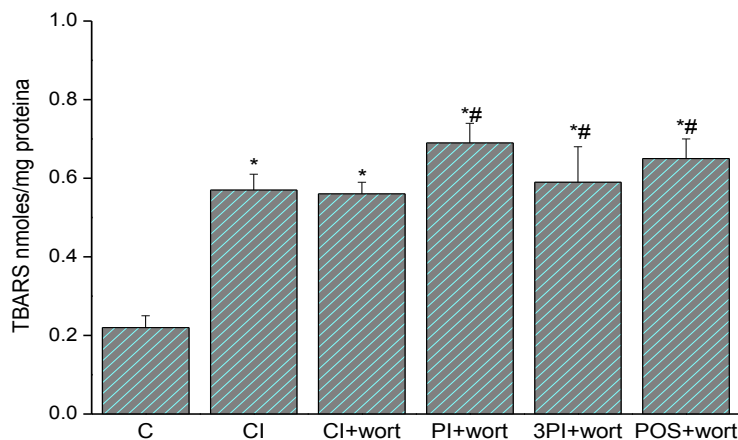
**Figura 20:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos C (n = 8), CI (n = 10), CI + wort (n = 10), PI + wort (n = 10), 3PI + wort (n = 6) y POS + wort (n = 10). \* p < 0,05 con respecto a C.



En la Figura 20 se observan los valores correspondientes a los tamaños de infarto para los grupos C, CI, PI, 3PI y POS en presencia de wortmanina (wort). La presencia del inhibidor de PI3K/Akt, no tuvo ningún efecto en el grupo CI ( $49 \pm 2 \%$  vs.  $52 \pm 3 \%$ ) y anuló la protección ejercida por las intervenciones, siendo el tamaño del infarto  $56 \pm 7 \%$  para el grupo PI + wort,  $53 \pm 1 \%$  para 3PI + wort y  $49 \pm 1 \%$  para POS + wort.

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

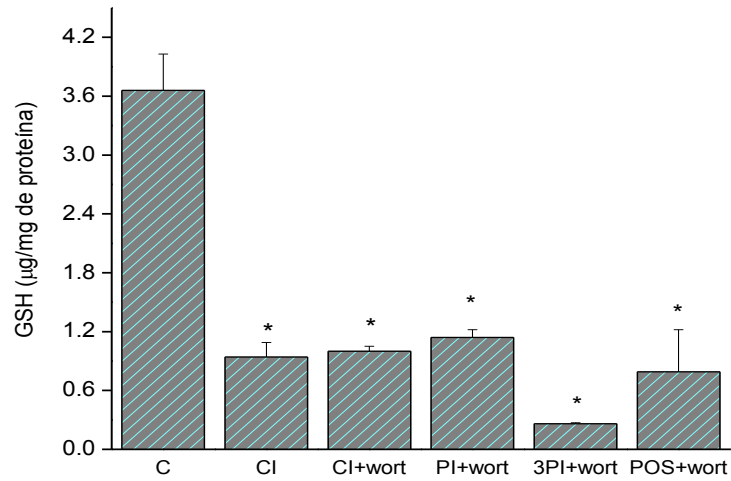
En la Figura 21 se observa que la wortmanina anuló la protección dada por las intervenciones PI, 3PI y POS, alcanzando la concentración de TBARS valores similares a los obtenidos en los corazones controles isquémicos. Estos fueron de  $0,69 \pm 0,05$ ,  $0,59 \pm 0,09$  y  $0,65 \pm 0,05$  nmoles/mg proteína para los grupos PI + wort, 3PI + wort y POS + wort, respectivamente vs.  $0,56 \pm 0,03$  nmoles/mg proteína en el grupo CI + wort.



**figura 21:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína, en los grupos C (n = 5), CI (n = 5), CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo con wortmanina. \* p < 0,05 con respecto a C y # p < 0.05 con respecto a CI.

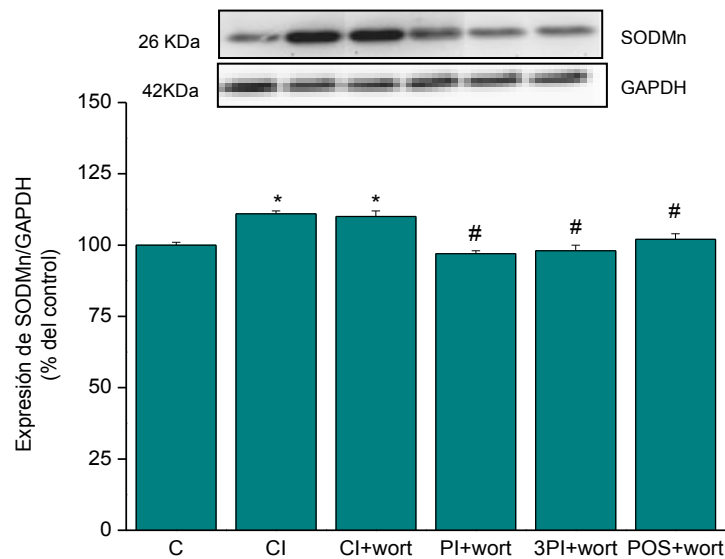
Glutación reducido (GSH):

En la Figura 22 se muestra que el tratamiento con wortmanina anula la protección dada por el PI y POS observándose una disminución del contenido de GSH. Los valores obtenidos fueron:  $1,0 \pm 0,05$ ,  $1,10 \pm 0,09$ ,  $0,26 \pm 0,01$  y  $0,79 \pm 0,40$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína para los grupos CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort, respectivamente.



**Figura 22:** Contenido de glutatión reducido (GSH), expresado en µg por mg de proteína, en los grupos, C (n = 7), C (n =7)I, CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo con wortmanina. \* p< 0,05 con respecto a C.

*Expresión de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn (SODMn) citosólica:*

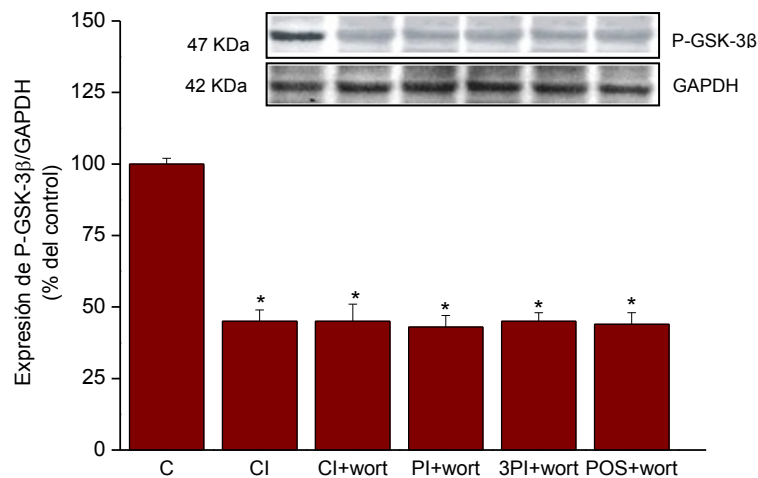


**Figura 23:** Expresión citosólica de (SODMn), en corazones de los grupos C (n =7), CI (n =7), CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo tratado con wortmanina. \* p< 0,05 con respecto a C; # p< 0.05 con respecto a los corazones intervenidos no tratados con wortmanina.

En la Figura 23 se muestran los valores observados correspondientes a la expresión de SODMn en los grupos tratados con wortmanina. En los corazones controles isquémicos (**grupo CI**) el tratamiento con el inhibidor de PI3K/Akt no afectó la expresión de dicha enzima (**111 ± 1 % vs. 110 ± 2 %**). Sin embargo, en los corazones intervenidos la wortmanina anuló la disminución de SODMn, alcanzando valores similares a los observados en el grupo **CI**. Estos fueron **97 ± 1 %**, **98 ± 2 %** y **102 ± 2 %** en los grupos **PI + wort**, **3PI+wort** y **POS + wort**, respectivamente.

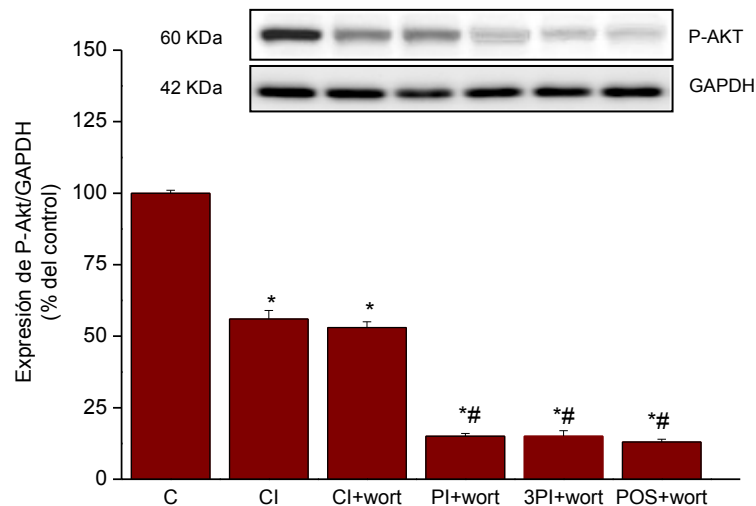
Contenido de GSK-3beta y Akt fosforiladas en la fracción citosólica:

En la Figura 24 se muestra la expresión de P-GSK-3β en la fracción citosólica, normalizada con GAPDH, en presencia de wortmanina. Se observa que el tratamiento no modificó la expresión de dicha enzima en el grupo CI pero produjo una disminución significativa en los grupos PI, 3PI y POS. Los valores obtenidos fueron **45 ± 6 %**, **43 ± 4 %**, **45 ± 3 %** y **44 ± 4%** para los grupos **CI + wort**, **PI + wort**, **3PI + wort** y **POS + wort**, respectivamente.



**Figura 24:** Expresión de la P-GSK-3β en la fracción citosólica, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7) en corazones, CI (n =7) CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo tratado con wortmanina. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0.05 con respecto a CI.

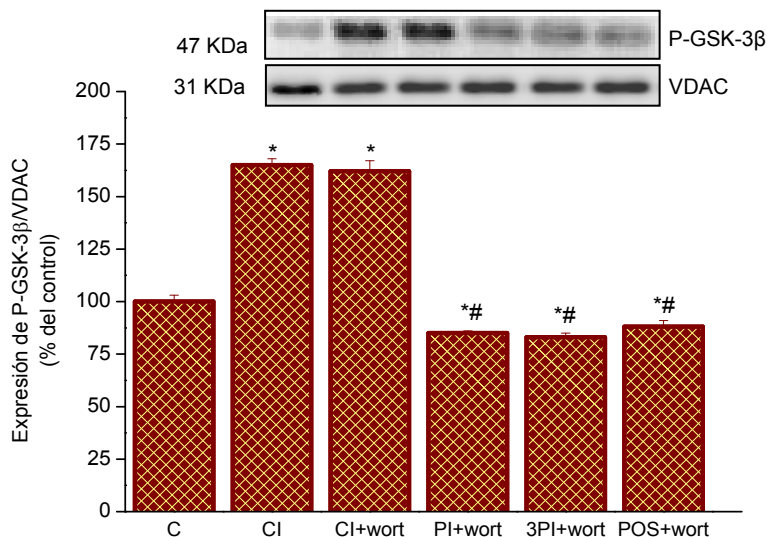
Efectos similares se observaron cuando se analizaron los valores de P-Akt (Figura 25). Así, la wortmanina disminuyó la expresión de P-Akt alcanzando valores significativamente menores que los obtenidos en el **CI** y el **CI + wort** (**15 ± 1 %**, **15 ± 2 %** y **13 ± 1 %** para los **grupos PI + wort**, **3PI + wort** y **POS + wort**, respectivamente).



**Figura 25:** Expresión de P-Akt en la fracción citosólica, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones, CI (n =7), CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo tratado con wortmanina. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0.05 con respecto a CI.

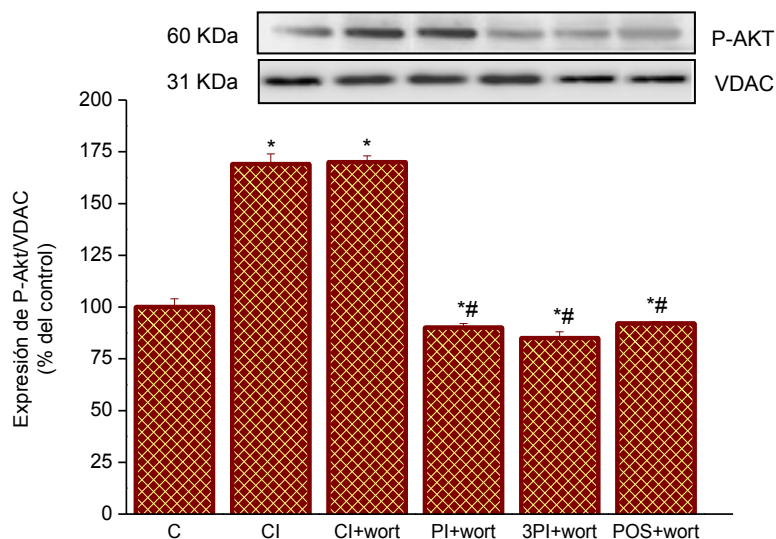
Contenido de GSK-3β y Akt fosforiladas en la fracción mitocondrial:

En la fracción mitocondrial, el nivel elevado de P-GSK-3β observado en los grupos CI y CI + wort, disminuyó frente a las intervenciones PI, 3PI y POS. La wortmanina aumentó la expresión de P-GSK-3β en PI y POS y disminuyó en el 3PI. Los valores fueron: **85 ± 2 %**, **83 ± 2 %** y **88 ± 3 %** en los **grupos PI + wort**, **3PI + wort** y **POS + wort**, respectivamente).



**Figura 26:** Expresión de P-GSK-3β en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones, CI (n =7), CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort, n = 6 para cada grupo tratado con wortmanina. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0.05 con respecto a CI.

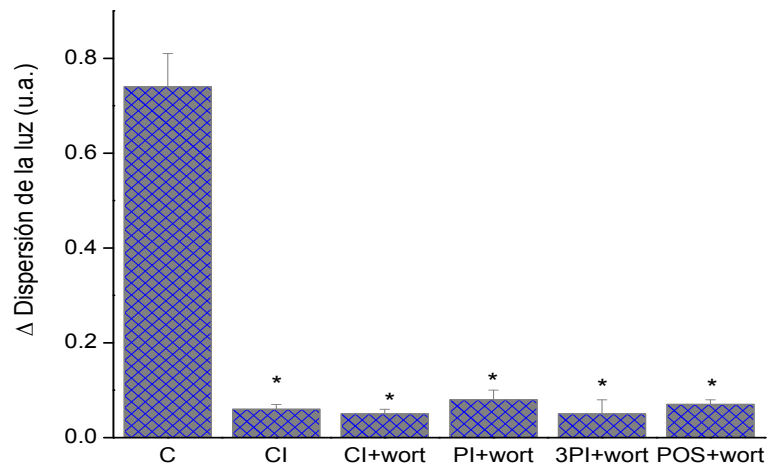
La expresión de P-Akt mostró cambios similares a los observados en P-GSK-3β. Aquí también la wortmanina revirtió el efecto del PI, 3 PI y POS (Figura 27), observándose un aumento de P-Akt en los **grupos PI + wort y POS + wort (90 ± 2 % y 92 ± 1%, respectivamente)** y una disminución en el **grupo 3PI + wort (85 ± 3 %)**.



**Figura 27:** Expresión de P-Akt en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7) en corazones, CI (n =7), CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo tratado con wortmanina. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

### Medida de la sensibilidad del PPTM al calcio:

La Figura 28 muestra que la restauración parcial de la sensibilidad del PPTM al calcio lograda por el PI y POS fue anulada por la inhibición de la PI3K/Akt con wortmanina. Los cambios de la dispersión de la luz fueron  $0.08 \pm 0.02$  u.a.,  $0.05 \pm 0.03$  u.a. y  $0.07 \pm 0.01$  u.a. en los grupos, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort, respectivamente.



**Figura 28:** Cambios de la dispersión de la luz, medidos en unidades arbitrarias (u.a.), producidos por el agregado de una dosis de 200  $\mu$ M de  $Cl_2Ca$  a muestras de mitocondrias obtenidas de corazones de los grupos C (n=5), CI (n=5), CI + wort, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 6 para cada grupo tratado con wortmanina. \* p < 0,05 con respecto a CI

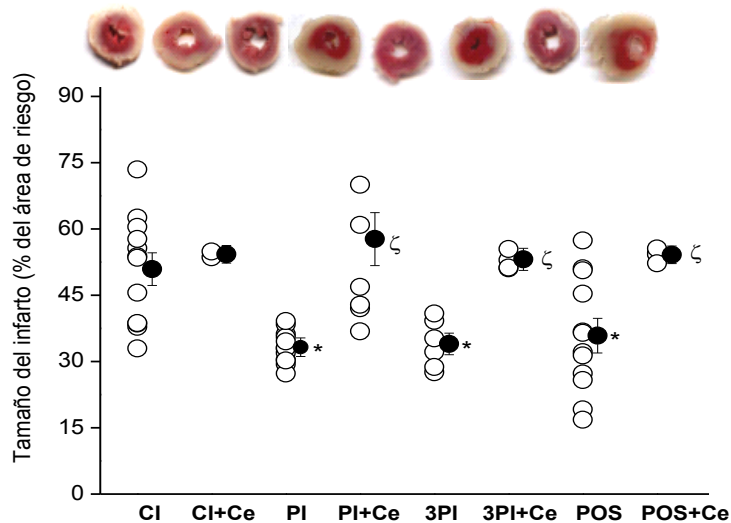
**De los resultados hasta aquí presentados podemos inferir que la protección dada por el PI, 3PI y POS fue anulada por la inhibición de PI3K/Akt con wortmanina. Los efectos observados fueron:**

- 1.- Aumento del tamaño del infarto**
- 2.- Aumento de la peroxidación lipídica y disminución del contenido de GSH**
- 3.- Disminución de la expresión de SODMn en citosol**
- 4.- Disminución de la expresión de P-GSK-3 $\beta$  y de P-Akt en la fracción citosólica**
- 5.- Aumento de la expresión de P-GSK-3 $\beta$  y de P-Akt en la fracción mitocondrial en PI y POS y disminución en 3PI.**
- 6.- Disminución de la sensibilidad del PPTM al calcio**

### 2.3. Tratamiento con celeritrina, inhibidor de la proteína cinasa C (PKC)

#### Tamaño del infarto:

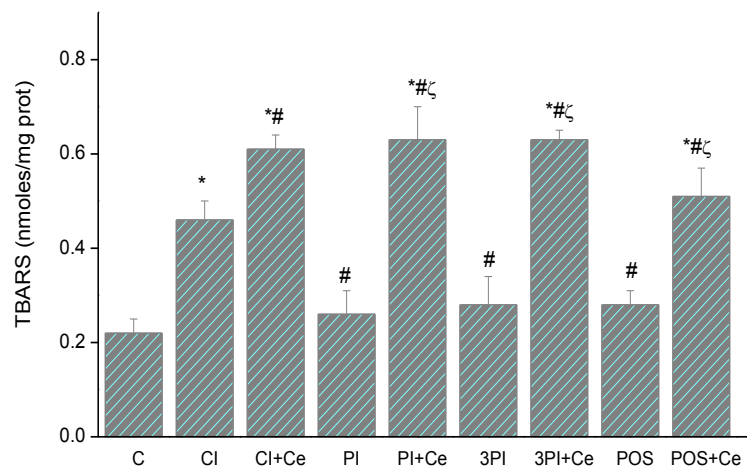
En la Figura 31 se observan los valores correspondientes a los tamaños de infarto para los grupos C, CI, PI, 3PI y POS en presencia y ausencia del inhibidor celeritrina (Ce). La inhibición de PKC anuló la protección ejercida por el PI, el 3PI y el POS siendo los valores del tamaño del infarto de  $58 \pm 7 \%$ ,  $53 \pm 1 \%$ , de  $54 \pm 1 \%$  en los grupos **PI + Ce**, **3PI + Ce** y **POS + Ce**, respectivamente.



**Figura 29:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CI (n = 10), CI + Ce (n = 5) PI (n = 12), PI + Ce (n = 6), 3PI (n = 6), 3PI + Ce (n = 5), POS (n = 11) y POS + Ce (n = 5). \* p < 0,05 con respecto a CI; ζ p < 0,05 con respecto a las intervenciones sin Ce

#### Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

En la Figura 30 se observa que la concentración de TBARS obtenida por las intervenciones PI, 3PI y POS fue anulada por el tratamiento con celeritrina alcanzando valores que superaron el hallado en los corazones controles isquémicos. En presencia de celeritrina la concentración de TBARS fue de  $0,63 \pm 0,07$ ,  $0,63 \pm 0,02$  y  $0,51 \pm 0,06$  nmoles/mg proteína para los grupos **PI + Ce**, **3PI + Ce** y **POS + Ce**, respectivamente.

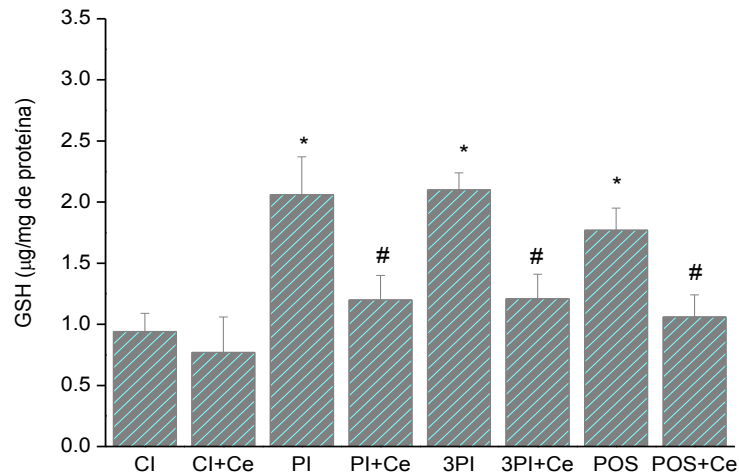


**Figura 30:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína, en los grupos C (n = 5), CI (n = 5), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 7 para cada grupo con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI; ζ p < 0,05 con respecto a las intervenciones en ausencia de Ce.

Glutación reducido (GSH):

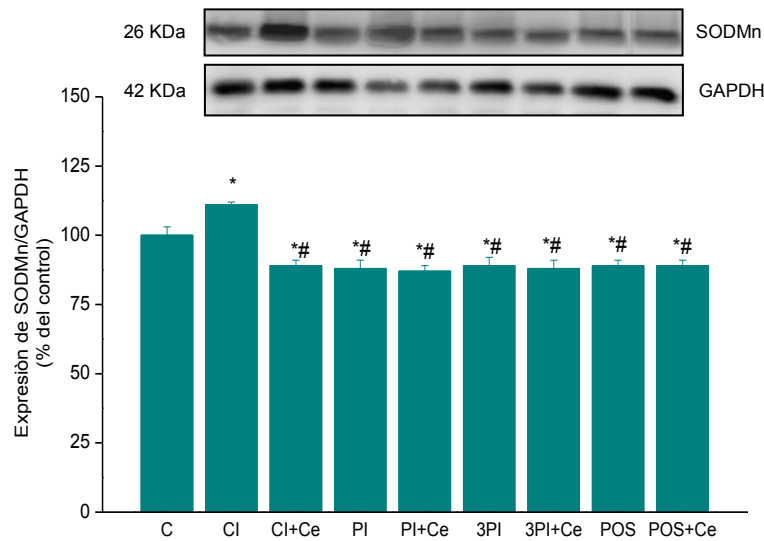
En la Figura 31 se muestra que el tratamiento con celeritrina anula la protección dada por el PI, 3PI y POS observándose una disminución del contenido de GSH. En presencia de celeritrina los valores obtenidos fueron: **1,20 ± 0,21, 1,21 ± 0,20 y 1,06 ± 0,18 µg/mg proteína para los grupos PI + Ce, 3PI + Ce y POS + Ce**, respectivamente.





**Figura 31:** Contenido de glutatión reducido (GSH), expresado en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de proteína, en los grupos C ( $n = 7$ ), CI ( $n = 7$ ), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI+Ce, POS y POS + Ce.  $n = 7$  para cada grupo con Ce. \*  $p < 0,05$  con respecto a CI, #  $p < 0,05$  con respecto a las intervenciones en ausencia de Ce.

Expresión de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn (SODMn) citosólica:

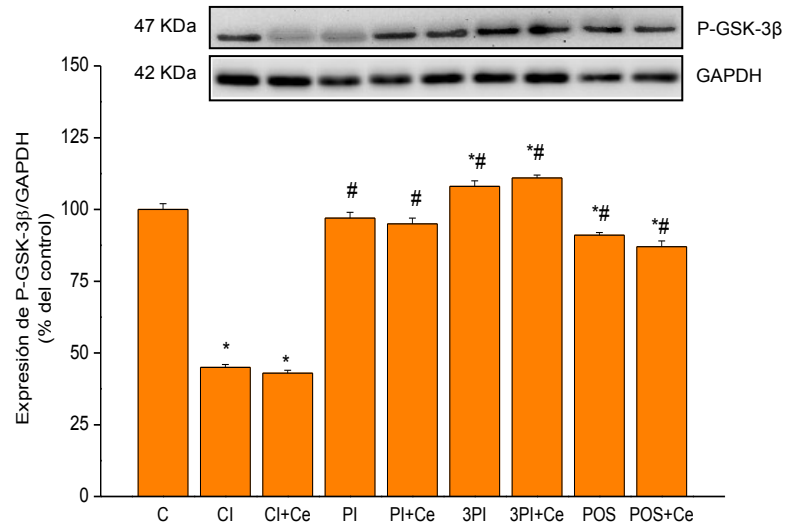


**Figura 32:** Expresión citosólica de (SODMn) en corazones de los grupos C ( $n = 7$ ), CI ( $n = 7$ ), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI+Ce, POS y POS + Ce.  $n = 7$  para todos los grupos tratados con Ce \*  $p < 0,05$  con respecto a C; #  $p < 0,05$  con respecto a CI.

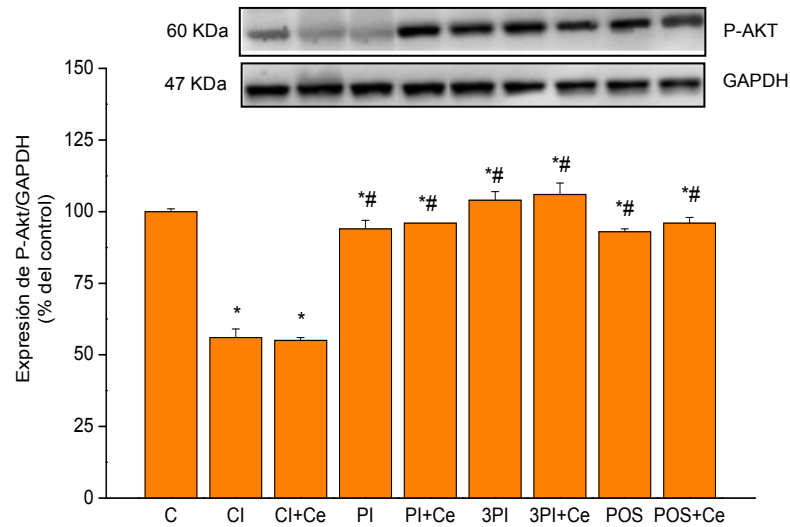
En la Figura 32 se muestran los valores observados en la expresión de la SODMn en los grupos tratados con celeritrina. La expresión de la enzima disminuyó en presencia de inhibición de PKC sólo en el grupo CI + Ce. Sin embargo, el tratamiento no modificó los valores observados en los corazones intervenidos no tratados. Los valores fueron: **89 ± 2**, **87 ± 2 %**, **88 ± 3 %** y **89 ± 3 %** en los **grupos CI + Ce, PI + Ce, 3PI + Ce y POS + Ce**, respectivamente.

*Contenido de GSK-3beta, Akt y PKCε fosforiladas en la fracción citosólica*

En la Figura 33 se muestra la expresión de P-GSK-3β en la fracción citosólica, normalizada con GAPDH, en presencia de celeritrina, el inhibidor de PKC. El tratamiento con celeritrina no modificó la expresión de P-GSK-3β observada en los distintos grupos experimentales. Los valores observados fueron **97 ± 2 %**, **108 ± 2 %** y **91 ± 2 %** para los **grupos PI, 3PI, POS y 95 ± 2 %**, **111 ± %** y **87 ± 2 %**, para los **grupos PI + Ce, 3PI + Ce y POS + Ce**, respectivamente. Efectos similares se observaron cuando se analizaron los valores de P-Akt (Figura 34). Así, la celeritrina no modificó la expresión de P-Akt en todos los grupos experimentales. Los valores fueron: **94 ± 3 %**, **104 ± 3 %** y **93 ± 1 %** para los grupos **PI, 3PI, POS y 96 ± 1%**, **106 ± 4%** y **96 ± 2 %** para los **grupos PI + Ce, 3PI + Ce y POS + Ce**, respectivamente.

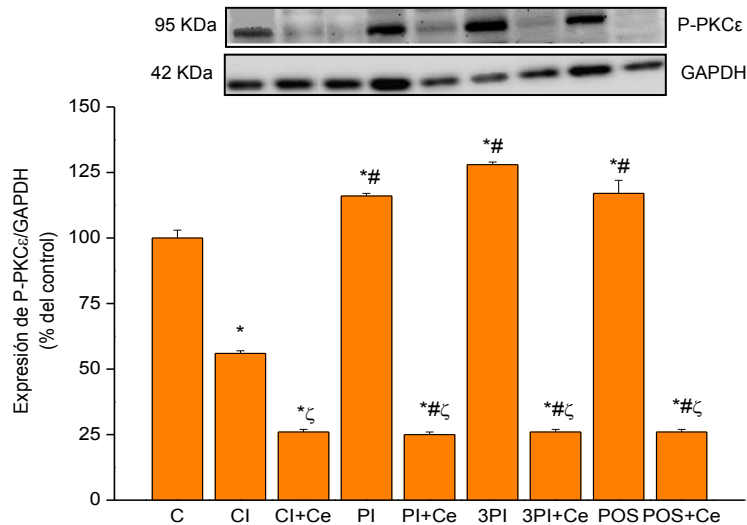


**Figura 33:** Expresión de P-GSK-3β/GAPDH en la fracción citosólica, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones CI (n =7), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 7 para cada grupo tratado con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.



**Figura 34:** Expresión de P-Akt/GAPDH en la fracción citosólica, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7) en corazones CI (n =7), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 7 para cada grupo tratado con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

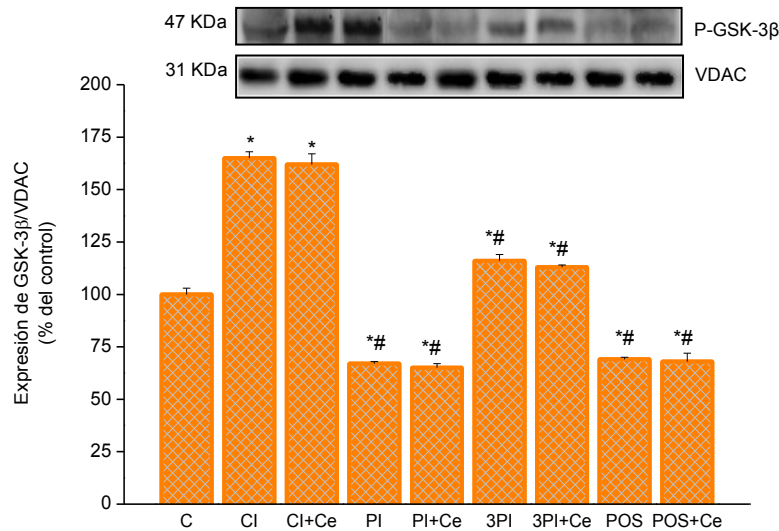
La expresión de P-PKC $\epsilon$  fue de  $116 \pm 1 \%$ ,  $128 \pm 1 \%$ ,  $117 \pm 5\%$  para los grupos **PI**, **3PI**, **POS**. Disminuyó significativamente con el tratamiento con celeritrina siendo los valores de  $26 \pm 1 \%$ ,  $25 \pm 1 \%$ ,  $26 \pm 1 \%$ ,  $26 \pm 5\%$  para los grupos **CI + Ce**, **PI + Ce**, **3PI + Ce** y **POS + Ce**, respectivamente (Figura 35).



**Figura 35:** Expresión de P-PKC $\epsilon$ /GAPDH en la fracción citosólica, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en CI (n =7), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. . n = 7 para cada grupo tratado con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI;  $\zeta$  p < 0.05 con respecto a las intervenciones sin Ce.

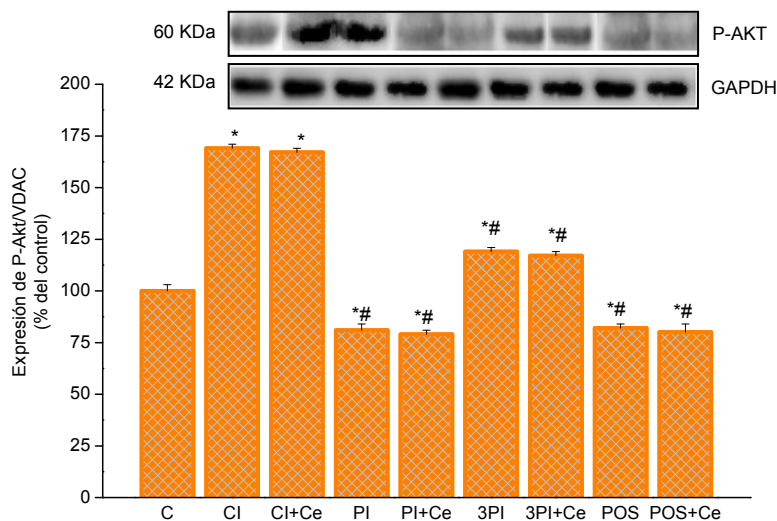
Contenido de P-GSK-3 $\beta$ , P-Akt y P-PKC $\epsilon$  en la fracción mitocondrial:

El aumento de P-GSK-3 $\beta$  (Figura 36) observado en el grupo CI y en el grupo 3PI, así como la disminución de la expresión de dicha enzima en los grupos PI y POS con respecto al grupo C, no fue modificado por el tratamiento con celeritrina. Los valores fueron:  $162 \pm 2 \%$ ,  $65 \pm 2 \%$ ,  $113 \pm 1 \%$  y  $68 \pm 4 \%$  en los grupos **CI + Ce**, **PI + Ce**, **3PI + Ce** y **POS + Ce**, respectivamente.



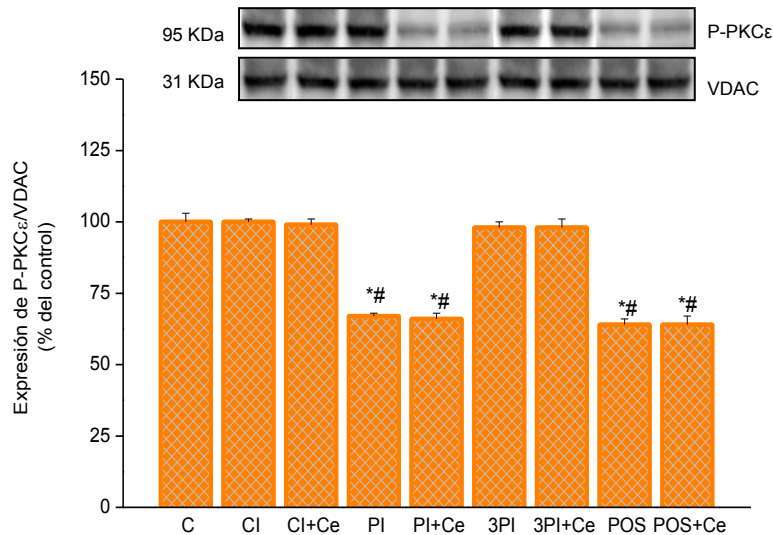
**Figura 36:** Expresión de P-GSK-3β/VDAC en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones CI (n =7), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 7 para cada grupo tratado con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

La expresión de P-Akt mostró cambios similares a los observados en P-GSK-3β. El tratamiento con celeritrina no modificó los valores observados en las distintas intervenciones. Los valores de P-Akt fueron: **167 ± 2 %**, **79 ± 1 %**, **117 ± 1 %** y **80 ± 1%**, respectivamente en los **grupos CI + Ce, PI + Ce, 3PI + Ce y POS + Ce** vs. los hallados en los corazones no tratados (**169 ± 1 %**, **81 ± 1 %**, **119 ± 1 %** y **82 ± 1 %** en los **grupos CI, PI, 3PI y POS**, respectivamente) (Figura 37).



**Figura 37:** Expresión de P-Akt/VDAC en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones CI (n =7), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 7 para cada grupo tratado con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

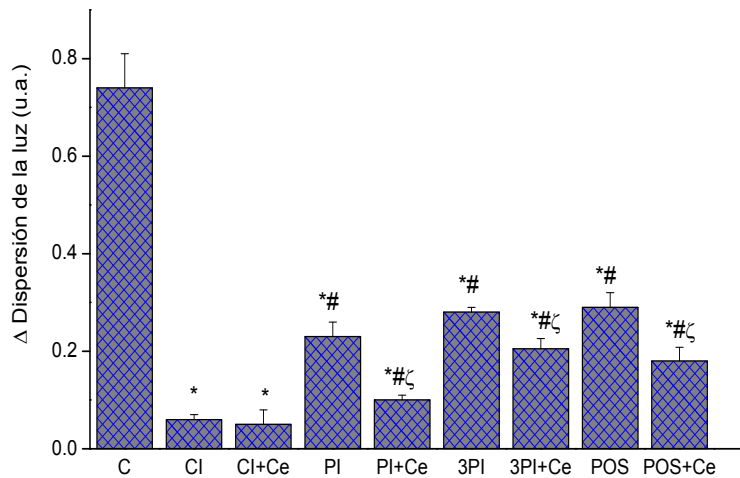
La expresión de P-PKC $\epsilon$  en la fracción mitocondrial de los corazones del grupo CI y CI + Ce fue similar a la obtenida en los corazones controles no-isquémicos (grupo C). Sólo en los grupos PI y POS el nivel de P-PKC $\epsilon$  disminuyó con respecto al control (**67  $\pm$  1% y 64  $\pm$  2 %**, respectivamente), pero los valores no se modificaron con el tratamiento con celeritrina. Estos valores fueron: **66  $\pm$  2 %** para el **grupo PI + Ce**, **98  $\pm$  3 %** para **3PI + Ce** y **64  $\pm$  3 %** para el **grupo POS + Ce**. (Figura 38)



**Figura 38:** Expresión de P-PKC $\epsilon$ /VDAC en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n =7), en corazones CI (n =7), CI + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 7 para cada grupo tratado con Ce \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

Medida de la sensibilidad del PPTM al calcio:

La Figura 39 muestra que la recuperación parcial de la sensibilidad del PPTM al calcio lograda por las intervenciones PI, 3PI y POS fue significativamente atenuada por la inhibición de PKC con celeritrina alcanzando los siguientes valores: 0,10  $\pm$  0,01, 0,20  $\pm$  0,02 y 0,18  $\pm$  0,02 para los grupos PI + Ce, 3PI + Ce y POS + Ce, respectivamente.



**Figura 39:** Cambios de la dispersión de la luz, medida en unidades arbitrarias (u.a.) ante el agregado de una dosis de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , en corazones de los grupos C (n = 5), Cl (n = 5), Cl + Ce PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 6 para cada grupo \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a Cl; ζ p < 0,05 con respecto a las intervenciones en ausencia de Ce.

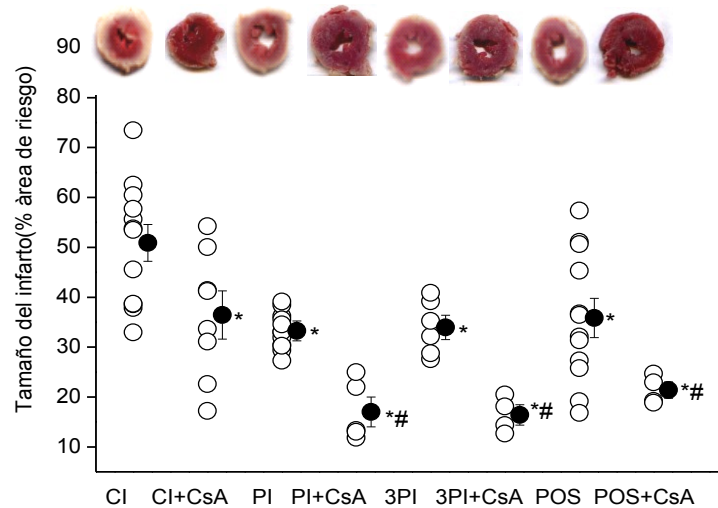
**De los resultados hasta aquí presentados podemos inferir que la inhibición de PKC con celeritina produce los siguientes efectos:**

- 1.- Aumento del tamaño del infarto**
- 2.- Aumento de la peroxidación lipídica y disminución del contenido de GSH**
- 3.- La expresión de SODMn en el citosol no se modifica**
- 4.- La expresión de P-GSK-3 $\beta$  y P-Akt en la fracción citosólica y en la mitocondrial no se modifica**
- 5.- Disminución de la expresión de P-PKC $\epsilon$  en la fracción citosólica**
- 7.- La expresión de P-PKC $\epsilon$  en la fracción mitocondrial no se modifica**
- 7.- Disminución de la sensibilidad del PPTM al calcio**

## 2.4. Tratamiento con ciclosporina A, inhibidor de la formación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)

### Tamaño del infarto:

En la Figura 40 se observan los tamaños de infarto para los grupos CI, PI, 3PI y POS, en presencia y ausencia de ciclosporina (CsA).



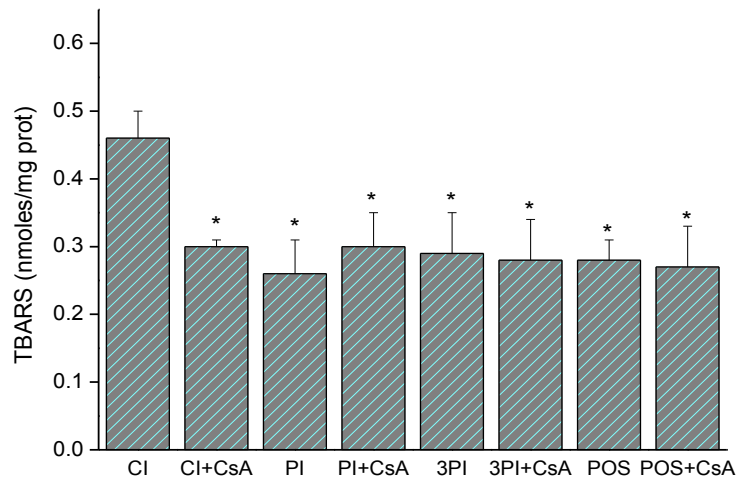
**Figura 40:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CI (n = 10), CI + CsA (n = 8), PI (n = 12), PI + CsA (n = 5), 3PI (n = 6), 3PI + CsA (n = 5), POS (n = 11), y POS + CsA (n = 5). \* p < 0,05 con respecto a CI; # p < 0,05 con respecto a las intervenciones no tratadas con CsA.

La CsA disminuyó el tamaño del infarto observado en el grupo CI a un valor similar al obtenido en los corazones intervenidos ( $36 \pm 5$  %). El tratamiento también disminuyó el tamaño del infarto obtenidos en los grupos PI, 3PI y POS. Los valores fueron:  $17 \pm 3$  %,  $16 \pm 2$  % y  $21 \pm 1$  % en los grupos PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA, respectivamente.

### Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

En la Figura 41 se observa que la concentración de TBARS obtenida por las intervenciones PI, 3PI y POS no fue modificada por el tratamiento con CsA. En estas condiciones los valores fueron:  $0,36 \pm 0,10$ ,  $0,32 \pm 0,12$  y  $0,30 \pm 0,10$  nmoles/mg prot para los grupos **PI + CsA**, **3PI + CsA** y **POS + CsA**, respectivamente.

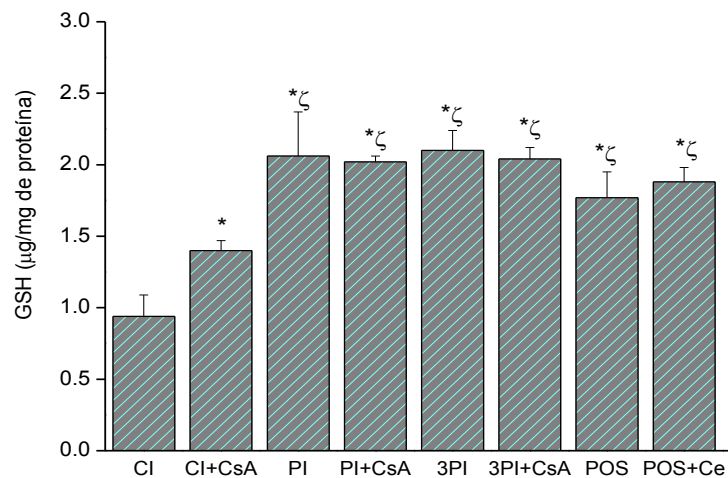




**Figura 41:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína, en los grupos CI (n = 5), CI (n = 5) CI + Ce, PI, PI + Ce, 3PI, 3PI + Ce, POS y POS + Ce. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a CI.

Glutación reducido (GSH):

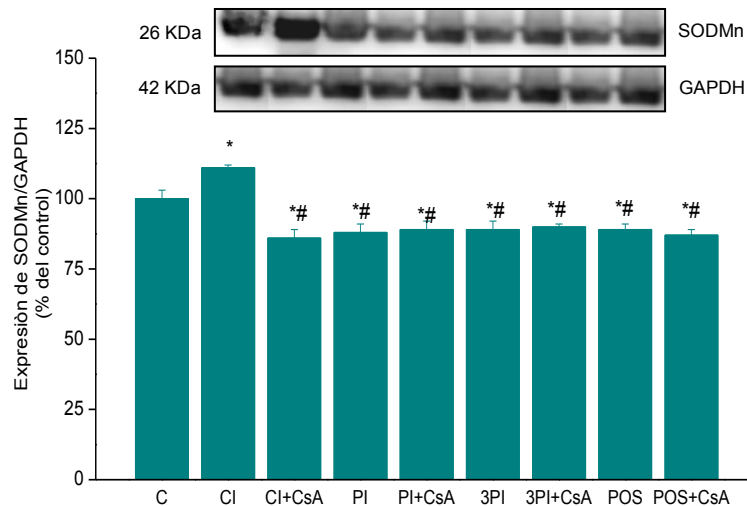
En la Figura 42 se muestra que el tratamiento con CsA no modifica los niveles de GSH producidos por las intervenciones PI, 3PI y POS. Los valores obtenidos fueron: **2,02 ± 0,04, 2,04 ± 0,08 y 1,88 ± 0,1 µg/mg prot**, para los grupos **PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA**, respectivamente.



**Figura 42:** Contenido de glutación reducido (GSH), expresado en µg por mg de proteína, en los grupos C (n = 7), CI (n = 7), CI + CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a CI; ζ p < 0,05 con respecto a CI + CsA.

Expresión de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD Mn) citosólica:

En la Figura 43 se muestran los valores observados en la expresión de SODMn en los grupos tratados con CsA. En el CI aumentó de la expresión de SODMn ( $111 \pm 1 \%$ ) y en todos los demás grupos disminuyó. Los valores fueron:  $89 \pm 3 \%$ ,  $90 \pm 1 \%$  y  $87 \pm 2 \%$  para los grupos **PI + CsA**, **3PI + CsA** y **POS + CsA**, respectivamente.

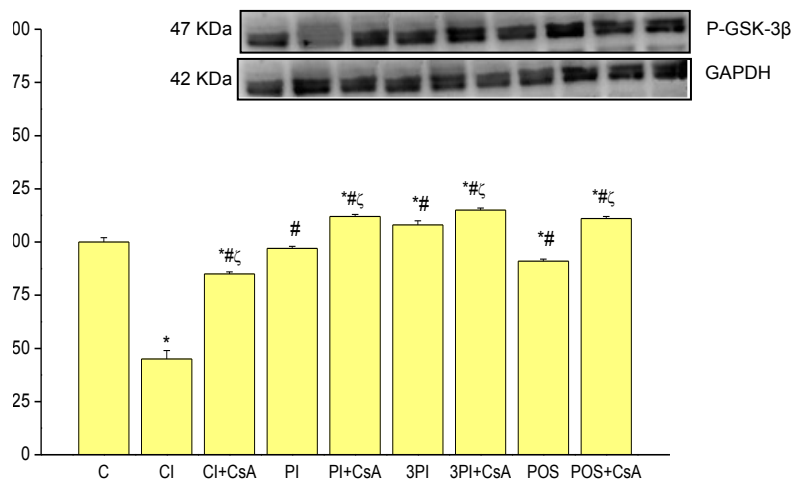


**Figura 43:** Expresión citosólica de (SODMn) en corazones de los grupos C (n = 7), CI (n = 7), CI + CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI+CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p< 0,05 con respecto a CI, # p< 0,05 con respecto a CI.

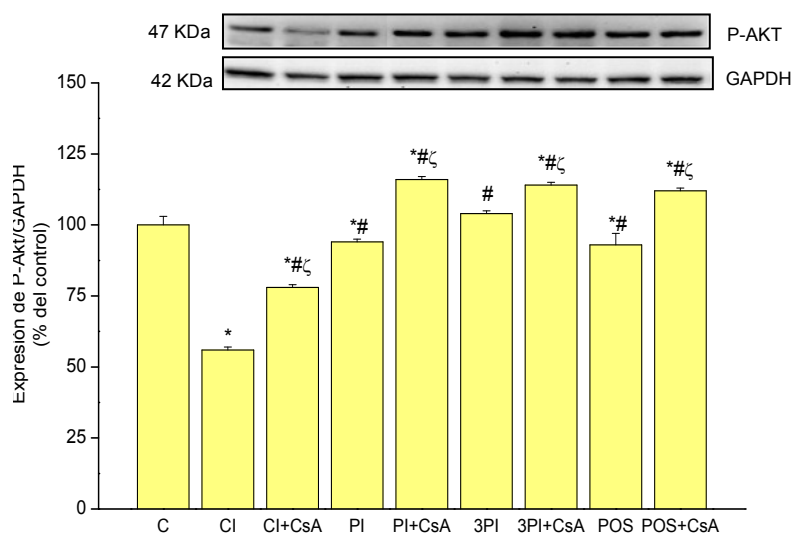
Contenido de GSK-3β, Akt y PKCε fosforiladas en la fracción citosólica:

En la Figura 44 se muestra la expresión de P-GSK-3β en la fracción citosólica, normalizada con GAPDH, en presencia de CsA. La CsA produjo un aumento de los niveles de P-GSK-3β en todos los grupos experimentales. En el grupo CI el valor fue de  $85 \pm 1 \%$  y en los grupos PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA los valores fueron de  $112 \pm 1 \%$ ,  $115 \pm 1 \%$  y  $111 \pm 1 \%$ , respectivamente.

Efectos similares se observaron cuando se analizaron los valores de P-Akt (Figura 45). Así, la CsA aumentó significativamente la expresión de P-Akt en los corazones **CI** ( $78 \pm 1\%$ ) y también en los grupos PI, 3PI y POS. Los valores fueron  $116 \pm 1 \%$ ,  $114 \pm 1 \%$  y  $112 \pm 1 \%$  para los grupos **PI + CsA**, **3PI + CsA** y **POS + CsA**, respectivamente.

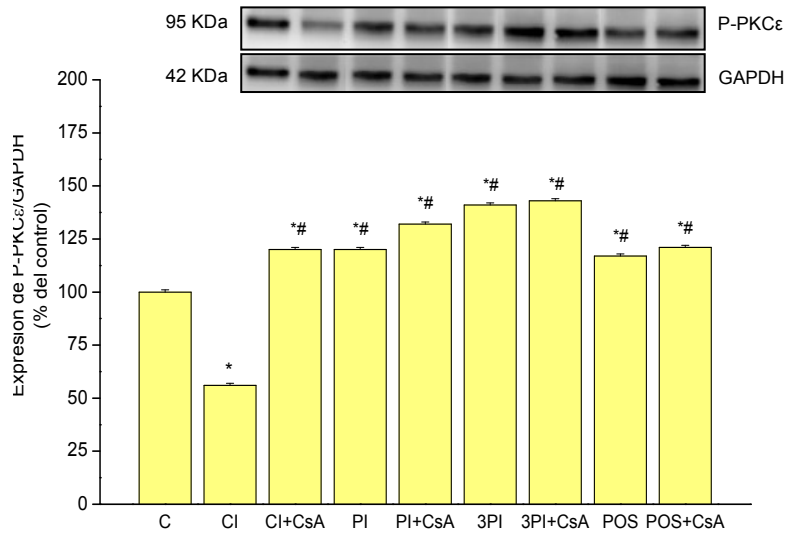


**Figura 44:** Expresión de la P-GSK-3β/GAPDH en la fracción citosólica, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo C, en corazones C (n = 7), CI (n = 7), CI + CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI; ζ p < 0,05 con respecto a los corazones intervenidos no tratados con CsA.



**Figura 45:** Expresión de P-Akt/GAPDH en la fracción citosólica, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n = 7), en corazones CI (n = 7), CI + CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI; ζ p < 0,05 con respecto a los corazones intervenidos no tratados con CsA.

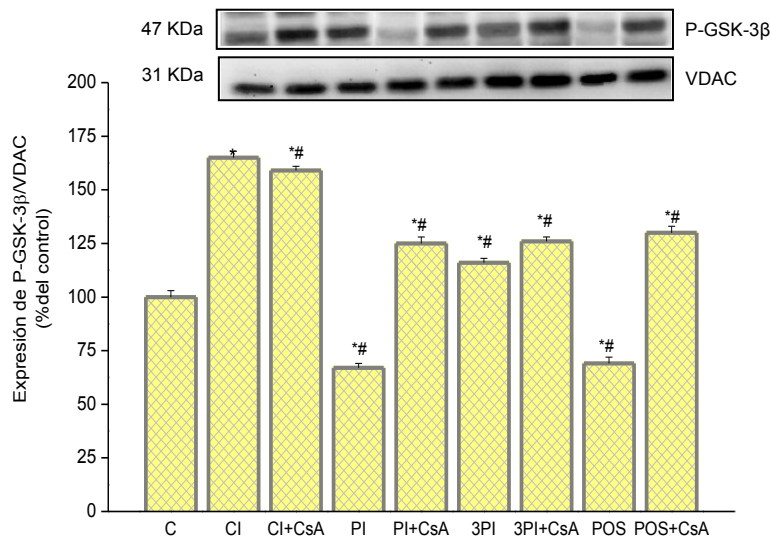
El tratamiento con CsA aumentó significativamente la expresión de P-PKCε en los corazones **CI (120 ± 1 %)**. Sin embargo, la CsA no modificó los niveles de P-PKCε detectados en los grupos PI, 3PI y POS. Los valores fueron: **132 ± 1%, 143 ± 1% y 121 ± 1%** para los **grupos PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA**, respectivamente (Figura 46).



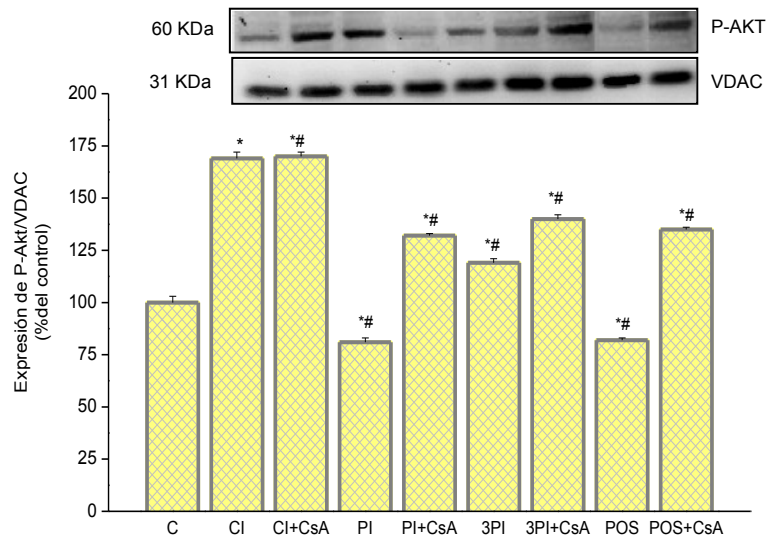
**Figura 46:** Expresión de P-PKCε en la fracción citosólica, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n = 7), en corazones CI (n = 7), CI + CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

Contenido de GSK-3β, Akt y PKCε fosforiladas en la fracción mitocondrial:

La Figura 46 muestra que el tratamiento con CsA no modificó la expresión de P-GSK-3β de los corazones del grupo **CI (159 ± 3%)**, pero aumentó significativamente en los demás grupos. Los valores fueron de **125 ± 2 %**, **126 ± 3 %** y **130 ± 2 %** en los **grupos PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA**, respectivamente.

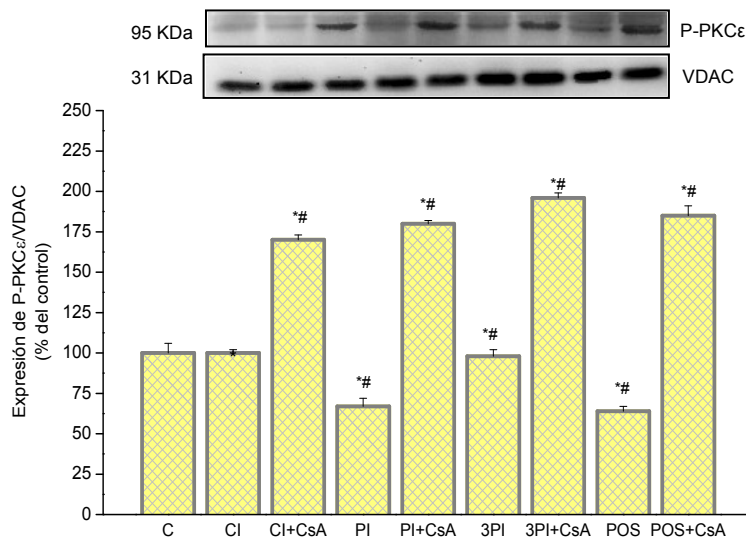


**Figura 46:** Expresión de la P-GSK-3β en la fracción mitocondrial, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n = 7), en corazones CI (n = 7), CI + CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.



**Figura 47:** Expresión de P-Akt en la fracción mitocondrial, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n = 7), en corazones CI (n = 7), CI+ CsA PI, PI + CsA, 3PI, 3PI+CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

La expresión de P-Akt mostró cambios similares a los observados en P-GSK-3 $\beta$ . La CsA aumentó la expresión de P-Akt obtenida en todos los grupos experimentales. Los valores de P-Akt en presencia de CsA fueron: **170  $\pm$  4 %**, **132  $\pm$  1 %**, **140  $\pm$  2 %** y **135  $\pm$  1%** para los **grupos CI + CsA, PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA**, respectivamente.

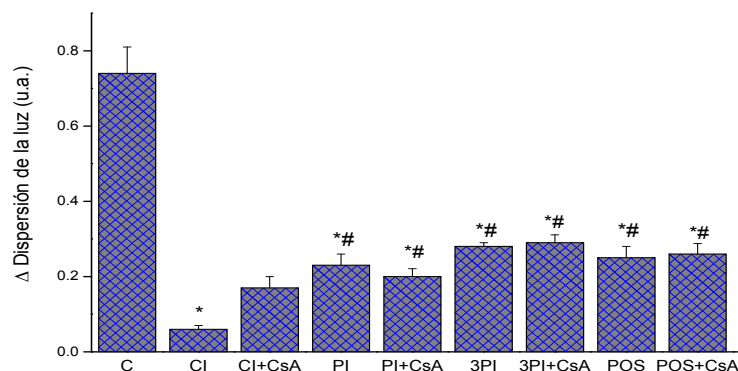


**Figura 48:** Expresión de P-PKC $\epsilon$ /VDAC en la fracción mitocondrial, como porcentaje de la obtenida en el grupo C (n = 7), en corazones CI (n = 7), CI + CsA, PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 6 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

La expresión de P-PKC $\epsilon$  aumentó significativamente en todos los grupos tratados con CsA. Los valores fueron: **170  $\pm$  3 %**, **180  $\pm$  2 %**, **196  $\pm$  3 %** y **185  $\pm$  6 %** para los **grupos CI + CsA, PI + CsA, 3PI + CsA y POS + CsA**, respectivamente (Figura 48)

Medida de la sensibilidad del PPTM al calcio:

La Figura 49 muestra que el tratamiento con CsA aumentó la sensibilidad al calcio de las mitocondrias aisladas de los corazones controles isquémicos, produciendo un cambio de la dispersión de la luz de **0,17  $\pm$  0,01 u.a.** Sin embargo, la CsA disminuyó la sensibilidad al calcio de mitocondrias aisladas de los grupos PI, 3PI y POS. Los cambios de la dispersión de la luz fueron: **0,12  $\pm$  0,02**, **0,17  $\pm$  0,02** y **0,2  $\pm$  0,02 u.a.** para los **grupos PI + CsA, 3PI + CsA, y POS + CsA**, respectivamente.



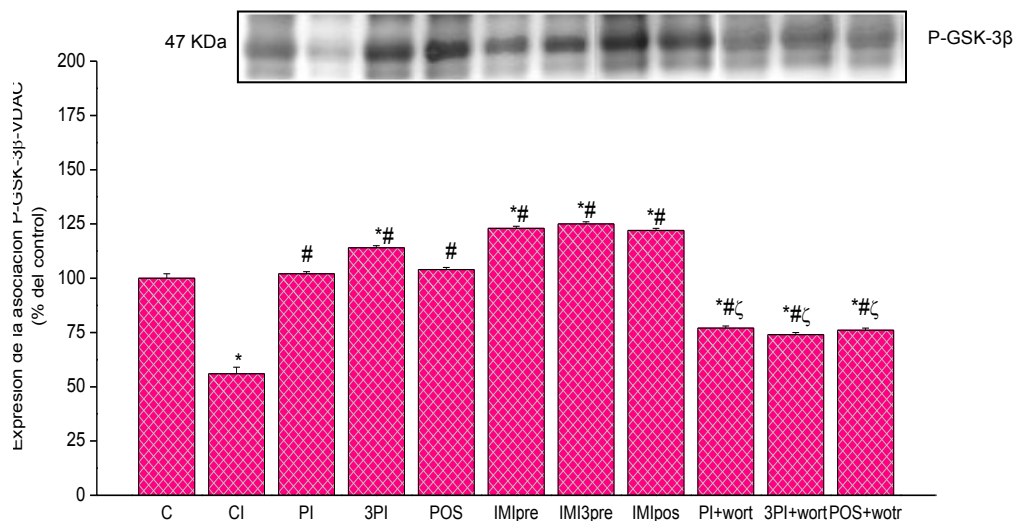
**Figura 49:** Cambios de la dispersión de la luz, expresado en unidades arbitrarias (u.a.) ante el agregado de una dosis de 200  $\mu$ M de  $Cl_2Ca$ , en corazones de los grupos C (n = 5) CI (n = 5) CI + CsA, PI, PI + CsA, 3PI, 3PI + CsA, POS y POS + CsA. n = 5 para cada uno de los grupos con CsA \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.

**De los resultados hasta aquí presentados podemos inferir que el tratamiento con ciclosporina produce:**

- 1.- Disminución del tamaño del infarto**
- 2.- La peroxidación lipídica y el contenido de GSH no se modificaron**
- 3.- La expresión de SODMn en el citosol no se modifica**
- 4.- Aumento de la expresión de P-GSK-3 $\beta$  y de P-Akt en ambas fracciones**
- 5.- Aumento de la expresión de P-PKC $\epsilon$  en ambas fracciones.**
- 7.- La sensibilidad del PPTM al calcio no se modifica**

### 3. Coinmunoprecipitación de P-GSK-3β y P-PKCε

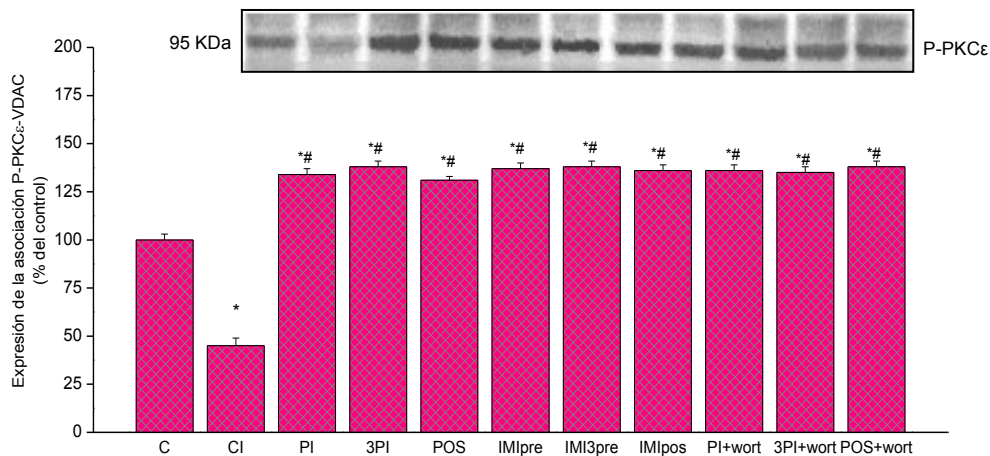
Para dar cumplimiento al último objetivo se evaluaron las interacciones físicas de P-GSK-3β-VDAC y P-PKCε-VDAC por coinmunoprecipitación. Las muestras fueron tratadas con el anticuerpo anti-VDAC y reveladas con los anticuerpos el P-GSK3β y P-PKCε. La asociación P-GSK-3β-VDAC disminuyó en los corazones controles isquémicos (**CI**), obteniendo un valor de **56 ± 3 %** y aumentó en los grupos **PI, 3PI, POS (102 ± 1 % para PI, 114 ± 1 % para 3PI, 104 ± 1 % para POS, 123 ± 1 % para IMIpre, 125 ± 1 % para IMI3pre y 122 ± 1 % para IMIpos**. Los aumentos de dicha interacción producidos en los corazones pre y postcondicionados fueron significativamente atenuados por el tratamiento con wortmanina indicando que Akt es necesaria para promoverla. Los valores observados fueron **77 ± 1 %, 74 ± 1 % y 76 ± 1 %** para los **grupos PI + wort, 3PI + wort y POS + wort**, respectivamente (Figura 50).



**Figura 49:** Expresión de P-GSK3β-VDAC, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo C, en corazones C, CI, PI, 3PI, POS, IMIpre, IMI3pre, IMIpos, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 4 para cada grupo. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI; ζ p < 0,05 con respecto a los corazones intervenidos no tratados con wortmanina.

De la misma forma en la asociación de P-PKCε-VDAC, también se observó la disminución en el **CI** a un valor de **45 ± 4 %** y un aumento en todos los corazones intervenidos. Los

valores de la asociación física P-PKCε-VDAC para los **grupos PI, 3PI y POS** fueron **134 ± 1 %**, **138 ± 1 %** y **131 ± 1 %**, respectivamente. En los **grupos IMIpre, IMI3pre e IMIpos** los valores fueron **137 ± 1 %**, **138 ± 1 %** y **136 ± 1 %** y para los **grupos PI + wort, 3PI + wort y POS + wort** fueron **136 ± 1 %**, **135 ± 1 %** y **138 ± 1 %**, respectivamente (Figura 51).



**Figura 50:** Expresión de P-PKCε-VDAC, expresada como porcentaje de la obtenida en el grupo en corazones C, CI, PI, 3PI, POS, IMIpre, IMI3pre, IMIpos, PI + wort, 3PI + wort y POS + wort. n = 4 para cada grupo. \* p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 con respecto a CI.





DISCUSIÓN



El presente estudio demuestra que los dos protocolos de preacondicionamiento isquémicos y el de postacondicionamiento isquémicos ejercen un efecto protector en los corazones hipertróficos de las ratas hipertensas espontáneas (SHR) sometidos a injuria por isquemia/reperfusión, observándose una disminución del tamaño del infarto, del estrés oxidativo y de la permeabilidad mitocondrial. También demostramos que en dichos efectos beneficiosos participan activamente las formas fosforiladas de GSK-3 $\beta$ , Akt y PKC mediante vías de señalización que culminan en la mitocondria y específicamente en el poro de permeabilidad transitoria de dicha organela (PPTM).

Sin embargo, estas intervenciones no modificaron la recuperación postisquémica de la contractilidad miocárdica. En el presente estudio, el POS, reduce el tamaño del infarto sin mostrar recuperación de la función ventricular (estado contráctil y rigidez del miocardio). La ausencia de la mejoría de la función ventricular en nuestro estudio, puede ser debida a la presencia de áreas con atontamiento miocárdico en la parte periférica de la zona infartada. En este sentido, ha sido bien demostrado, que la presencia de un cierto grado de disfunción postisquémica (miocardio atontado) se revierte aproximadamente después de 48/72 horas de reperfusión. Además el cambio en el tamaño del infarto en experimentos agudos, no influencia significativamente la función ventricular (Cohen y col, 1999)

De acuerdo con un trabajo previo (Leichtweis y Ji, 2001), la abrupta producción de ROS que ocurre durante los primeros minutos de la reperfusión se correlaciona directamente con la disminución del GSH intracelular (Slodzinski y col, 2008). El glutatión es un antioxidante de bajo peso molecular que juega un rol central en la defensa contra el daño oxidativo, reciclando los grupos tioles de las células de mamíferos. El aumento de la peroxidación lipídica obtenido en los corazones isquémicos fue acompañado por una disminución del contenido de GSH indicando la presencia de estrés oxidativo en SHR, ya reconocido por investigaciones previas (Fantinelli y col, 2012). Las intervenciones (PI, 3PI, POS) y el tratamiento con IMI, disminuyeron el contenido de TBARS en el tejido cardiaco y preservaron parcialmente el nivel de GSH, sugiriendo una menor producción de ROS ó un mejoramiento del principal sistema antioxidante en dichas condiciones. Teniendo en cuenta que las ROS pueden causar la apertura del PPTM (Halestrap, 2009), los datos

observados en este estudio en mitocondrias aisladas, en donde se produce una recuperación parcial de la integridad y de la respuesta al calcio en los corazones intervenidos sustentan la idea de que una menor producción y/o liberación de ROS podría estar ocurriendo en esas condiciones. Por otro lado, la inhibición de PI3K/Akt con wortmanina y la inhibición de PKC con celeritrina, revirtieron estos efectos beneficiosos observándose un aumento de la peroxidación lipídica y una disminución de GSH y de la respuesta del PPTM al calcio, en estos grupos experimentales. Sin embargo, el tratamiento con ciclosporina no modificó ninguna de los parámetros mencionados. Al no obtener una protección adicional, este resultado sugiere que el PI y el POS ejercen su efecto cardioprotector a través del mismo blanco que sería el PPTM. **Estudios previos realizados por Griffiths y Halestrap (1993) y por Argaud y col (2005) muestran que ambas intervenciones (PI y POS) producen efecto cardioprotector frente al daño miocárdico producido por isquemia/reperfusión mediante la disminución de la apertura del PPTM.** En un trabajo realizado recientemente en nuestro laboratorio demostramos que el PI protege a las SHR contra las alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión disminuyendo, a través del NO y de los canales de K dependientes de ATP de la mitocondria, la apertura del PPTM (Fantinelli y col., 2013).

De forma similar la CsA, un inhibidor del PPTM, preconditiona corazones aislados de rata (De Paulis y col., 2013).

Resultados previos obtenidos en animales normotensos muestran que la fosforilación del residuo serina 9 (Ser9) / inhibición de la GSK-3 $\beta$  juega un papel importante en diferentes intervenciones cardioprotectoras (Nishino y col, 2008; Miura y Miki, 2009). Esta importancia se atribuye al hecho de que la GSK-3 $\beta$  es un sustrato de múltiples proteínas quinasas de pro-supervivencia y que, por lo tanto, la fosforilación de GSK-3 $\beta$  es un punto de convergencia de distintas vías de señalización. La inhibición directa de la GSK-3 $\beta$  por el uso de inhibidores farmacológicos estructuralmente diferentes tales como SB-216763, LiCl e IMI limita el tamaño del infarto (Gross y col, 2004; Obame y col, 2008; Faghihi y col 2008). En nuestro modelo experimental, el tratamiento con IMI antes y después de la isquemia ejerce un efecto cardioprotector similar al obtenido con ambos protocolos de PI y POS, lo que sugiere que la disminución del infarto observada luego de dichas

intervenciones está vinculada en una relación causa-efecto a un mecanismo dependiente de GSK-3 $\beta$ .

Entre las quinasas capaces de fosforilar a la GSK-3 $\beta$  está la PI3K/Akt (Pap y Cooper, 1998), enzima cuya participación en la cardioprotección contra la injuria por reperfusión fue previamente demostrada (Zhu y col, 2006). El acoplamiento de Akt y GSK-3 $\beta$  conduce a cambios inversos en sus actividades. Por lo tanto, el aumento de la actividad de Akt produce la fosforilación/inhibición de GSK-3 $\beta$ , mientras que la disminución de la actividad de Akt conduce a la desfosforilación/activación de GSK-3 $\beta$ . Nuestros datos muestran que, en corazones isquémicos obtuvimos una disminución en la fracción citosólica de P-Akt y de P-GSK-3 $\beta$ , mientras que lo opuesto ocurrió en corazones preacondicionados, postacondicionados y tratados con IMI. Estos resultados ponen de manifiesto el importante papel de GSK-3 $\beta$  y Akt en isquemia- reperfusión en SHR, que además concuerda con trabajos previos realizados en conejos hipertensos (Barillas y col, 2007) y en SHR propensas a accidentes cerebrovasculares, SHR-SP (Chen y col, 2000).

Las intervenciones cardioprotectoras PI y POS producen la activación de cascadas a través de disparadores que se acumulan extracelularmente en respuesta al estímulo y que actúan sobre receptores de la superficie celular. Estas vías de señalización que ocurren en el citosol parecen modular la apertura del PPTM (Hausenloy y col, 2009). Estudios previos demostraron que la P-GSK-3 $\beta$  eleva el umbral de apertura de dicho poro (Juhaszova y col, 2009). Aunque se ha demostrado que el tiempo crítico de apertura del poro mitocondrial está dentro de los primeros minutos de la reperfusión, en nuestro preparado los niveles de P-GSK-3 $\beta$  citosólica al final de los 60 min de reperfusión fueron significativamente menores que los encontrados en corazones no-isquémicos. A este mismo tiempo, corazones preacondicionados, postacondicionados y tratados con IMI mostraron niveles elevados de P-GSK-3 $\beta$  citosólica. Cuando examinamos la fracción mitocondrial obtuvimos resultados opuestos. Es así como el nivel de P-GSK-3 $\beta$  aumentó en los corazones isquémicos y disminuyó en aquellos corazones intervenidos y/o tratados. Los datos obtenidos en mitocondrias aisladas muestran que la respuesta al calcio de una suspensión mitocondrial obtenida de corazones isquémicos está significativamente disminuida y que aquellas extraídas de corazones preacondicionados, postacondicionados ó tratados con IMI dicha respuesta se recuperó parcialmente. Es decir, que las intervenciones aplicadas y

el tratamiento con IMI atenúan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y tienen un elemento en común, que es la fosforilación de GSK-3 $\beta$  citosólica. Por lo tanto, estos datos sugieren que la GSK-3 $\beta$  citosólica y no la mitocondrial sería la verdaderamente responsable de la protección observada en los corazones isquémicos intervenidos.

Nuestros datos muestran que, en corazones isquémicos, se produce una disminución de P-GSK-3 $\beta$  en la fracción citosólica. En presencia de wortmanina, el tratamiento no modificó la expresión de dicha enzima en el grupo CI pero produjo una disminución de P-GSK-3 $\beta$  en los grupos Pre y postcondicionados. Estos datos corroboran que la proteína GSK-3 $\beta$ , es un blanco de Akt. La expresión de la P- Akt también en la fracción citosólica, disminuyó en el grupo CI y se observaron valores aún menores cuando los grupos fueron tratados con wortmanina. Esto fue atribuido en estudios anteriores a que la inhibición de Akt bloquea el efecto protector del PI (Wymann y col, 1996) y del POS (Hönisch y col, 2010). Al evaluar la fracción mitocondrial obtuvimos resultados opuestos, tanto en el nivel de P-GSK-3 $\beta$  como en los de P-Akt, donde se observó un aumento en los corazones isquémicos y de aquellos corazones intervenidos y/o tratados, menos en el 3PI con wortmanina. Estos datos sugieren que aunque se ha reportado la presencia de una Akt mitocondrial (Bijur y Jope, 2003) y (Stiles, 2009) en nuestros datos, la responsable de los efectos obtenidos, sería la que está presente en la fracción citosólica.

Por otro lado, la CsA produjo un aumento de los niveles de P-GSK-3 $\beta$ , P-Akt y P-PKC $\epsilon$  en la fracción citosólica, en todos los grupos experimentales. Esto puede ser debido a que la CsA también se une a la ciclofilina A, la cual inhibe la fosfatasa serina-treonina dependiente de calcio, calcineurina y por lo tanto la inhibición de las propiedades desfosforilativas de la calcineurina podría incrementar o mantener la fosforilación de estas proteínas (Liu y col, 1991).

Park y col, 2006, demostró usando tanto corazón aislado como cardiomiocitos aislados, que el POS se asocia también con un incremento de P-GSK-3 $\beta$ , P-Akt y la inhibición de la apertura del PPTM, por la disminución del potencial de membrana después de la carga de calcio (Gomez y col, 2008).

Existen algunos estudios que relacionan un aumento de la fosforilación de proteínas cardioprotectoras a la inhibición de calcineurina. Es así como en cardiomiocitos de ratas, la inhibición de calcineurina por CsA ó por el inhibidor selectivo de calcineurina FK506, aumenta la fosforilación de Akt (Ni, Wang, Cao y col, 2007). El tratamiento con CsA ó FK506 también aumenta la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en células de neuroblastoma humano (Kim y col 2009). En corazones de cobayo el tratamiento con CsA antes de la isquemia aumentó la fosforilación de Akt y GSK-3 $\beta$  (Onishi y col, 2012). Como se han encontrado niveles elevados de calcineurina en animales hipertensos (Zhang y col, 1999), esta vía inhibida por ciclosporina podría ser la responsable de los aumentos de expresión de P-GSK-3 $\beta$  y P-Akt observados en la fracción citosólica de corazones de SHR. Cuando examinamos los resultados de la fracción mitocondrial, también encontramos un aumento de la expresión de todas las proteínas evaluadas, P-GSK-3 $\beta$ , P-Akt y P-PKC $\epsilon$ . El mecanismo implicado en la inhibición del PPTM por GSK-3 $\beta$  durante la reperfusión, no está claro. Sin embargo, ha sido propuesto que GSK-3 $\beta$  puede estar localizada en la mitocondria asociada con ANT y con VDAC, 2 componentes importantes del complejo del PPTM (Juhaszova y col, 2004), (Nishihara y col, 2007) y (Terashima y col, 2010).

Teniendo en cuenta que la CsA, inhibe a la ciclofilina D y por lo tanto la posibilidad de que el calcio desencadene la formación del poro, la concentración de este ión en la matriz mitocondrial podría aumentar y de esta manera activar la fosforilación de quinasas presentes en este compartimento. Esta podría ser la explicación para el hallazgo de niveles muy aumentados de P-GSK-3 $\beta$ , P-Akt y P-PKC $\epsilon$  en la fracción mitocondrial de los grupos tratados con CsA

Por otro lado, diversas investigaciones muestran la participación de la proteína quinasa (PKC) en cascadas cardioprotectoras (Yoshida y col, 1997; Gray, Mochly-Rosen y col, 2004). Estudios realizados por Ytrehus y col 2003 en corazones aislados de conejos demostraron que el PI induce translocación de PKC desde el citosol a la membrana y que el efecto protector del PI puede ser mimetizado por la administración de fármacos activadores de PKC. Las isoformas de PKC que actúan en el PI varían según la especie estudiada. Es así que en el corazón de rata actúan PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  y PKC $\epsilon$  (Yoshida y col, 1997) y en el de conejo PKC $\epsilon$  y PKC $\eta$  (Ping, Cao y col, 1997; Mochly-Rosen y col,

2004). Un trabajo realizado por Inagaki y col, 2003 demuestra que no todas las isoformas de PKC cumplen el mismo rol en isquemia -reperusión. Dicho trabajo muestra que la activación de PKC $\delta$  es perjudicial mientras que la de PKC $\epsilon$  es beneficiosa. La activación de PKC participa activamente en los efectos protectores ejercidos por el pre y postcondicionamiento isquémicos Derek y col, 2007; Sadat, 2009). Ha sido demostrado que, específicamente la isoforma PKC $\epsilon$  juega un papel crítico en la cardioprotección (Armstrong, 2004), (Buday y col 2007) y (Baines y col 2002). Es bien conocido que cuando se activa la PKC se transloca a múltiples sitios subcelulares incluyendo a la mitocondria, núcleo y membrana plasmática (Buday y Mochly-Rosen. 2007; Uecker y col, 2003; Dorn y col, 1999). Existe amplia evidencia de que en la mitocondria hay sustratos para PKC (Baines y col, 2003; Ogbi y Johnson, 2006). Sin embargo, aunque algunos estudios muestran que PKC $\epsilon$  está presente constitutivamente en la mitocondria, otros sugieren que para que dicha quinasa ejerza efecto protector se debe translocar (Buday y Mochly-Rosen, 2007; Dorn y col, 1999). Dado que la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citosol y transportadas a la mitocondria a través de poros formados por translocasas de las membranas mitocondriales interna y externa (Lithgow, 2000; Kaldi, 1998), PKC $\epsilon$  puede ser translocada a la mitocondria vía importantes mecanismos para interactuar con sustratos dentro de dicha organela. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en SHR (Fantinelli y Mosca, 2007) se demostró que el aumento de la recuperación postisquémica de la contractilidad lograda por el PI y POS en dichos animales era anulado cuando PKC era inhibida. Estos datos nos permitieron concluir que la PKC desempeña un papel importante en la cardioprotección ejercida por ambas intervenciones en SHR. Encontramos resultados similares en este estudio en el cual la disminución del infarto observada en ambos protocolos de PI y en el POS fue significativamente atenuada por la inhibición de PKC con celeritrina. Nuestros datos de Western blot muestran que la expresión de P-PKC $\epsilon$  citosólica aumenta frente a las intervenciones y disminuye dramáticamente cuando PKC es bloqueada. Sin embargo, el contenido de P-PKC $\epsilon$  en la fracción mitocondrial disminuyó en el PI, 3PI y POS. Esto demuestra que la activación/fosforilación de PKC $\epsilon$  en el citosol parece ser suficiente para brindar protección a las SHR y sugieren que no sería imprescindible la translocación, por lo menos hacia la mitocondria para producir acciones beneficiosas.

Por otro lado, la PKC es capaz de fosforilar e inactivar a la GSK-3 $\beta$  (Inagaki et al, 2006; Ping, 2002). En nuestras condiciones experimentales, cuando PKC fue inhibida, el nivel de expresión de P-Akt y P-GSK-3 $\beta$  no se modificó, ó inclusive, en algunos grupos aumentó. Esto está indicando que la PKC está actuando en una cascada de protección paralela a la que participan las quinasas mencionadas más arriba.

¿Cuál es el mecanismo? Korge y col, 2002 muestran que la activación de PKC disminuye el grado de apertura del PPTM en mitocondrias cardíacas de conejo. En otro estudio Baines y col, 2003, sugieren que la PKC $\epsilon$  se puede asociar a componentes del poro y así producir la inhibición del mismo. Entre otros sustratos mitocondriales con los cuales la PKC puede interactuar se encuentran la aldehído deshidrogenasa 2, la citocromo C oxidasa subunidad IV y los canales de K dependientes de ATP (Buday y Mochly-Rosen, 2007).

El aumento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial conduce a la liberación de componentes de la matriz mitocondrial al citosol entre los que figura la enzima superóxido dismutasa-dependiente de Mn (SODMn). Siguiendo la sugerencia de un trabajo previo (Jin y col, 2005), el aumento de la expresión de la SODMn citosólica hallado en nuestro preparado isquémico estaría indicando un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Ambos protocolos de PI, el POS y tratamiento con IMI disminuyeron el contenido citosólico de SODMn. Sin embargo, el contenido de esta enzima aumentó cuando los corazones intervenidos fueron tratados con wortmanina. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en mitocondrias aisladas y estarían relacionados con la modulación ejercida por GSK-3 $\beta$  y Akt de la apertura del PPTM como un mecanismo implicado en la muerte celular. En presencia del bloqueo de PKC con celeritrina, aunque no se observaron cambios significativos en los niveles de SODMn, la sensibilidad del PPTM al calcio disminuyó. Es decir, que la PKC $\epsilon$  interacciona con el poro y modifica su probabilidad de apertura. Nuestros datos de co-inmunoprecipitación muestran que esta quinasa está asociada físicamente al VDAC y de esta manera, podría preservar la impermeabilidad mitocondrial. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Baines y col (2006) en mitocondrias cardíacas de ratón.

Uno de los elementos que constituye el PPTM es la ciclofilina D. Experimentos previos realizados en animales normotensos (Woodfield y col, 1998) y también en pacientes (Piot



y col, 2008) muestran que la inhibición de este componente mediante el uso de la CsA disminuye la formación y /o apertura del PPTM, acompañado de efectos beneficiosos. En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con CsA disminuyó el tamaño del infarto no sólo en corazones CI sino también en corazones pre y postcondicionados. Es decir, que las intervenciones reconocen mecanismos en paralelo que podrían tener un blanco en común como lo es el PPTM.

La pregunta ahora es: ¿Cuáles son los mecanismos que determinan una disminución ó retardo en la apertura del PPTM? Sabemos de lo realizado hasta aquí que P-Akt, P-PKC $\epsilon$  y P-GSK-3 $\beta$  están involucradas.

En tal sentido, algunos estudios mostraron que la P-GSK-3 $\beta$  interactúa con la ANT (Nishihara y col, 2007; Terashima y col, 2010), fosforila a VDAC (Pastorino y col, 2005; Das y col, 2008) y esto interrumpe la unión de la hexoquinasa II (Nishihara y col, 2007). También fue demostrado que Akt puede fosforilar directamente a la hexoquinasa II e inducir su unión a VDAC (Miyamoto y col, 2008) manteniendo, de esta manera, la integridad mitocondrial. A través de la prueba de co-inmunoprecipitación nosotros detectamos la asociación física P-GSK-3 $\beta$  citosólica/VDAC y PKC $\epsilon$  citosólica/VDAC. Estas asociaciones podrían explicar la modificación de la apertura del poro ejercida por ambas proteínas citosólicas. Datos obtenidos por Costa y Garlid (2008), en ratas Sprague-Dawley estarían de acuerdo con este mecanismo.

Penna y col, 2006, demostraron que la cascada de protección involucra además de la PKC a los canales mitocondriales de K dependientes de ATP y las ROS. Como en nuestro preparado el bloqueo de PKC con celeritrina exacerbó el daño oxidativo, mostrando una disminución de GSH y un aumento de las TBARS nosotros sugerimos que la activación de PKC está antes ó "upstream" que las ROS. Sin embargo, ambos, ROS y PKC parecen estar involucrados en la cardioprotección dada por PRE y POS a las SHR. En este trabajo y también en SHR, realizando una isquemia más prolongada que lleva a la muerte celular, demostramos que la inhibición de PKC con celeritrina abole la disminución de infarto producida por ambas intervenciones, poniendo de manifiesto la importante participación de la PKC en el PRE y POS. Es decir, que nuestros resultados están de acuerdo con investigaciones previas realizadas en animales normotensos y previamente mencionadas.

• • •

# CONCLUSIONES

• • •

En el presente estudio aportamos evidencias que sustentan potenciales mecanismos de protección asociados al pre y postcondicionamiento isquémicos en ratas hipertensas espontáneas (SHR). La aplicación de 1 ó 3 ciclos de isquemia-reperfusión previos a la isquemia prolongada, así como la aplicación de 3 ciclos breves de isquemia-reperfusión al comienzo de la perfusión ejerce un efecto cardioprotector contra la injuria por isquemia-reperfusión. Este efecto se traduce en una disminución del tamaño del infarto en los corazones pre y postcondicionados acompañados de una disminución del estrés oxidativo y una preservación parcial de la integridad mitocondrial. Nuestros resultados también demuestran que el efecto protector a nivel del tejido miocárdico está asociado a la activación/fosforilación de PKC $\epsilon$  y a la inhibición/fosforilación de GSK-3 $\beta$  teniendo ambas proteínas un blanco en común, como es el poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM).

Los efectos cardioprotectores observados fueron:

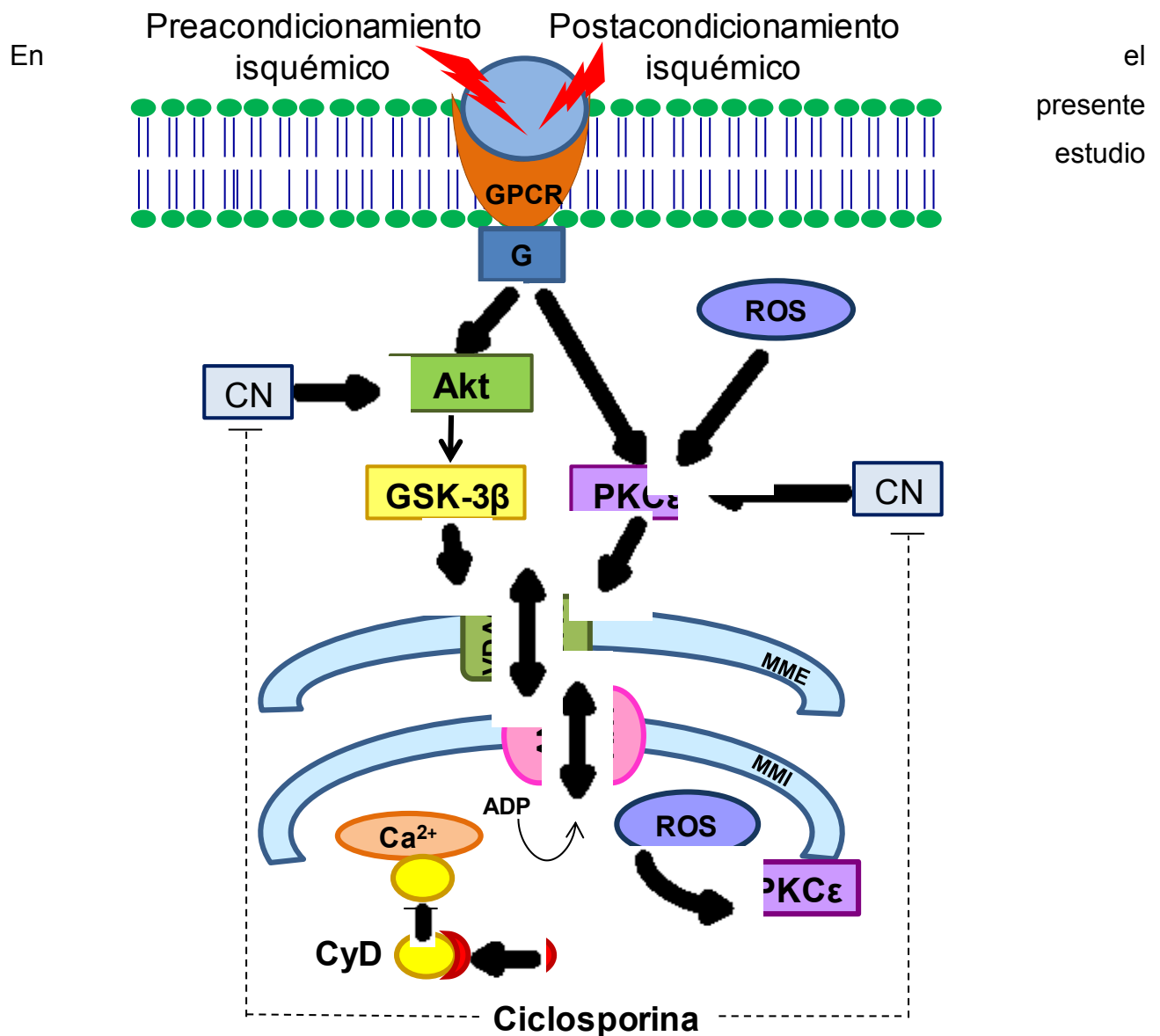
1. Disminución del tamaño del infarto.
2. Disminución de la peroxidación lipídica.
3. Preservación parcial del contenido de GSH.
4. Aumento de la expresión de las formas fosforiladas de Akt, GSK-3 $\beta$  y PKC $\epsilon$  en la fracción citosólica.
5. Disminución de la expresión de las formas fosforiladas de Akt y GSK-3 $\beta$  y PKC $\epsilon$  en la fracción mitocondrial.
6. Co-localización de P-GSK-3 $\beta$  y P-PKC $\epsilon$  con el canal aniónico dependiente de voltaje de la mitocondria (VDAC)
7. Recuperación parcial de la sensibilidad del PPTM al calcio.

Otro hallazgo importante de nuestro trabajo fue que la CsA mimetizó en corazones isquémicos la cardioprotección obtenida con el PI y POS y potenció la acción beneficiosa de estas intervenciones.

### **Conclusión final**

El presente estudio muestra que, en las SHR, los agonistas liberados por las isquemias breves del PI y POS en su interacción con receptores de membrana (GPCR) y el acople a proteínas G, desencadenan cascadas de señalización que involucran la activación de

PI3K/Akt- que lleva a la fosforilación/inactivación de GSK-3 $\beta$ - y fosforilación/activación de PKC $\epsilon$  en el citosol. Las asociaciones físicas de P-GSK-3 $\beta$ /VDAC y de P-PKC $\epsilon$ /VDAC estarían implicadas en la preservación de la impermeabilidad mitocondrial obtenida en las intervenciones aplicadas. La calcineurina (CN) participaría en el efecto protector adicional al PI y POS ejercido por la ciclosporina, posiblemente permitiendo un mayor grado de fosforilación de las quinasas involucradas.



aportamos evidencias que sustentan potenciales mecanismos de protección asociados al

• • •

# BIBLIOGRAFIA

## CITADA

• • •

- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D and Ovize M. (2005). Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition. *Circulation*. 18;111(2):194-197
- Armstrong SC. (2004). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardio Res* 61 427– 436
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V. (2004). In selfdefence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377: 347–355.
- Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R, Ping P. (2002). Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ. Res* 90: 390–397
- Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y Bolli R, Cardwell EM and Ping P. (2003). Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ. Res.* 92, 873–880
- Bangyan LS. (2009). PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 1276–1282
- Barillas R, Friehs I, Cao-Danh H, Martinez JF, Del Nido PJ. (2007). Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta improves tolerance to ischemia in hypertrophied hearts. *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 84, pp. 126-133.
- Bijur GN, Jope RS. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87:1427–35.

- Borgatti P, Martelli AM, et al. (2000). "Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors." *FEBS Lett* 477(1-2): 27-32.
- Brami-Cherrier K, Valjent E, et al. (2002). "Dopamine induces a PI3-kinase- independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation." *J Neurosci* 22(20): 8911-21.
- Braunwald, E. and Kloner RA (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66(6): 1146-9.
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna, R, Szabó I and Zoratti M. (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations *J. Biol. Chem.* 267, 2934–2939.
- Bolli R. (1990). Mechanism of myocardial stunning. *Circulation* 82(3): 723-738.
- 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(11):1897-1918.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Broekemeier, KM, Dempsey ME and Pfeiffer DR. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria *J. Biol. Chem.* 264, 7826–7830.
- Brooks G, Hearse DJ. (1996). Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: player or spectator? *Circ Res* 79:627– 630.

- Beuchamp C, Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44(1):276-287.
- Budas GR and Mochly-Rosen D. (2007). Mitochondrial protein kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. *Biochem Soc trans* 35(part 5):1052-1054.
- Buege JA y Aust SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol*, 52:302-309
- Byrom FB, Wilson C (1938). A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J Physiol* 93(3): 301-4.
- Cancherinia DV, Queliconia BB, Kowaltowski AJ. (2007). Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel activity in isolated heart mitochondria. *Cardiovasc Res.* 73(4):720-728
- Carafoli E, Stauffer T. (1994). The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol*, 25(3):312-324.
- Chen H, Azuma M, Maeda K, Kajimoto N, and Higashino H. (2000). "Impaired heart function and noradrenaline release after ischaemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats" *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 27, pp. 664-670.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, et al. (2008). Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294: C460-C466.



- Churchill EN, Szweda LI. (2005). Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys.* 439: 194-9.
- Costa AD, and Garlid KD. (2008). "Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC $\epsilon$ , ROS, and MPT" *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, vol. 295, pp. 874-882.
- Crompton M, Ellinger H. and Costi A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 255, 357–360.
- Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341: 233-249.
- Crow MT, Mani K, Nam YJ, et al. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* 95: 957-970.
- Das S, Wong R, Rajapakse N, Murphy E, and Steenbergen C. (2008). Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ Res* 103:983-991.
- Datta PK, Lianos EA (1999). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int* 55(5): 1734-1739.
- De Paulis D, Chiari P, Teixeira G, Couture-Lepetit E, Abrial M, Argaud L, Gharib A, Ovize M. (2013). Cyclosporine A at reperfusion fails to reduce infarct size in the in vivo rat heart. *Basic Res Cardiol* 108(5):379-384.
- Di Lisa F, Menabó R, Canton M, Barile M, Bernardi P. (2001). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a

causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* 26; 276(4):2571-2575.

Dorn II GW, Souroujon MT, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D. (1999). Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 pp. 12798–128034.

Downey J, Cohen M, Ytrehus K, Liu Y. (1994). Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: The role of adenosine and protein kinase C. In: *Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury.* *Ann NY Acad Sci.* 723: 82-98.

Downey JM, Cohen MV. (2006). Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis.* 48(5):363-371.

Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. (1993). On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 27(10):1790-1794.

Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, et al. (2001). Neutrophils are primary source of O<sub>2</sub> radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 280:H2649 – 57.

Duronio V, Scheid MP, Ettinger S. (1998). Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity, *Cellular Signalling* 10; 233-239.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP dependant protein kinase and phosphorylase kinase. *EurJ Biochem* 107:519-527.

Faghihi M, Mirershadi F, Dehpour AR, Bazargan M. (2008). Preconditioning with acute and chronic lithium administration reduces ischemia/reperfusion injury mediated by cyclooxygenase not nitric oxide synthase pathway in isolated rat heart. *Eur J Pharmacol* 597: 57-63.

Fantinelli JC, Mosca SM. (2007). Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Mol Cell Biochem* 296(1-2):45-51.

Fantinelli JC, Caldiz C, Álvarez MC, Garciarena CD, Chiappe de Cingolani GE and Mosca SM. (2012). Oxidative damage in cardiac tissue from normotensive and spontaneously hypertensive rats: Effect of ageing. *Oxidative stress and diseases*. Edited by Volodymyr Lushchak and Dmytro V. Gospodaryov. P. 141-156.

Fantinelli JC, Pérez Núñez IA, González Arbeláez LF, Schinella GR, Mosca SM. (2013). Participation of mitochondrial permeability transition pore in the effects of ischemic preconditioning in hypertrophied hearts: role of NO and mitoKATP. *Int J Cardiol* 166(1):173-180.

Forster K, Paul I, Solenkova N, Staudt A, Cohen MV, Downey JM, et al. (2006). NECA at reperfusion limits infarction and inhibits formation of the mitochondrial permeability transition pore by activating p70S6 kinase. *Basic Res Cardiol* 101:319- 326.

Fritz M and Rinaldi G (2007). Influence of nitric oxide-mediated vasodilation on the blood pressure measured with the tail-cuff method in the rat. *J Biomed Sci* 14(6): 757-765.

Gao WS, Atar D, Liu Y, Pérez NG, Murphy AM, Marban E.(1997). Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 80(3):393-399.

Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, et al. (1987). Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 61:757-760.

Gautam N, Bijur and Richard S. Jope. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation *J Neurochem* 87(6): 1427–1435.

González GF, Chung FA, Miranda S, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J, Boveris A. (2005). Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2568-H2573.

Grant R, Budas, Eric N. Churchill, Mochly-Rosen D. (2007). Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res* 55: 523-536.

Griffiths E, Halestrap A. (1993). Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 25, 1461-9.

Grimes CA, Jope RS. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Progr Neurobiol* 65:391-426.

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. (2004). Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 94:960–966.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2):79-94.

Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61(3):372-385.

Halestrap AP, (2009). "Mitochondria and reperfusion injury of the heart-a holey death but not beyond salvation" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 41, pp. 113-121.

Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007). Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics* 116 173–191.

Hausenloy DJ, Ong SB, and Yellon DM. (2009). The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning *Basic Research in Cardiology*, vol. 104, pp. 189-202.

Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. (2011). Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal*. 14: 893-907.

Hönisch A, Theuring N, Ebner B, Wagner C, Strasser RH, Weinbrenner C. (2010). Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition. *Basic Res Cardiol*.105(2):155-67.

Hoshi M, Takashima A, et al. (1996). "Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2719-23.

Hussain S, Slikker W Jr, Ali SF. (1995). "Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci*. 13(8):811-7.

Ikonomidis JS, Tumiati LC, Weisel RD, Mickle DA y Li RK. (1994). Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res.* 28(8):1285-1291.

Inagaki K., Hahn H.S., Dorn G.W., Mochly-Rosen D. (2003). Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* 108:869

Ingley E, Hemmings BA. (1994). Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction, *Journal of Cellular Biochemistry* 56; 436–443.

Jin ZQ, Zhou HZ, Cecchini G, Gray MO, and Karliner JS. (2005). MnSOD in mouse heart: acute responses to ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion injury”*American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, vol. 288, pp. 2986-2994.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 113:1535–1549

Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, and Sollott SJ. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection *Circulation Research*, vol. 104, pp.1240-1252.

Kaldi K, Neupert W. (1998). Protein translocation into mitochondria. *Biofactors*, 8 pp. 221–224

Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M y Utsumi K. (2004). Oxidative stress underlies the mechanism for Ca(2+)-induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic Res.* 38(1):27-35.

- Kevin LG, Camara AKS, Riess ML, et al. (2003). Ischemic preconditioning alters real-time measure of O<sub>2</sub> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 284: H566 – 74.
- Kim JS, Ohshima S, Pediaditais P, Lemasters J. (2004). Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition - and pH dependent cell death alter reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 37(12):1943-1950.
- Kim Y, Lee YI, Seo M, et al. (2009). Calcineurin dephosphorylates glycogen synthase kinase-3 beta at serine-9 in neuroblast-derived cells. *J Neurochem*; 111: 344-54.
- Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2004). Postconditioning attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion, *Cardiovascular Research* 62; 74– 85
- Kinnula VL, Crapo JD. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*. 15;36(6):718-744.
- Korge P, Honda HM, Weiss JN. (2002). Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3312–3317.
- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circ*. 97(18):1848-1867.
- Lawlor MA and Alessi DR. (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2903-10.
- Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, et al. (1991). Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J*. 5:2029 – 34.

- Leichtweis S, and Ji LL. (2001). "Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress" *Acta Physiologica Scandinava*, vol. 172, pp. 1-10.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. (1997). The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 174(1-2):159-165.
- Leon J, Hae W. Lim, S Haq TF and Molkentin JD. (2000). Calcineurin Promotes Protein Kinase C and c-Jun NH 2terminal Kinase Activation in the Heart: cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *Biol. Chem.* 275:13571-13579
- Li X, Bijur GN, Jope RA. (2002). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , mood stabilizer, and neuroprotection. *Bipolar Disord.* 4:137– 44.
- Lithgow T. (2000). Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.*, 476 pp. 22–26.
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-15.
- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in the rabbit heart. *Circulation.* 84:350-6.
- Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. (1994). Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 26:661-668.



- Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy, *Biochimica et Biophysica acta* 1784 159–185.
- Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. (1995). Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res.* 76: 73-81.
- Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM. (2000). The p38 MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Basic Res Cardiol.* 95(6):472-478.
- Murphy E y Cross H, Steenbergen C. (1999). Sodium regulation during ischemia versus reperfusion an its role in injury. *Circ Res.* 84: 1469-1470.
- Miura T and Miki T. (2009). "GSK-3beta, a therapeutic target for cardiomyocyte protection" *Circulation Journal*, vol. 73, pp. 1184-1192.
- Miura T, Tanno M. (2011). The mPTP and its regulatory proteins: Final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovasc Res.* 88: 7 – 15.
- Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II, *Cell Death and Differentiation.* 15; 521–529.
- Murry C, Jennings R, Reimer K. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124-36.
- Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. (1991). Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischaemic preconditioning. *Am J Physiol* ;260:H796-804.

- Nadruz WJr, Lagosta VJ, Moreno HJr, Coelho OR, Franchini KG. (2004). Simvastatin prevents load-induced protein tyrosine nitration in overloaded hearts. *Hypertension* 43: 1060-1066.
- Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL. (1986). Hexokinase receptor complex in hepatomamitochondria: evidence fromN,N'-dicyclohexy lcarbodiimide labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC, *Biochemistry* 25;1015–1021
- Nao BS, McClanahan TB, Groh MA, Schott RJ, Gallagher KP. (1990). The time limit of effective preconditioning in dogs (abstract). *Circulation*. 82(suppl 111):111-27 I .
- Ni YG, Wang N, Cao DJ, et al. (2007). FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104: 20517-22.
- Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, and Shimamoto K. (2007). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection" *Journal Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 43, pp. 564-570.
- Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M, and Marber MS. (2008). "Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse" *Circulation Research*, vol. 103, pp. 307-314.
- Obame FM, Plin-Mercier C, Assaly R, Zini R, Dubois-Randé JL, Berdeaux A, and Morin D. (2008). Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 326, pp. 252-258.

- Ogbi M, Johnson JA. (2006). Protein kinase Cepsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning. *Biochem J.* 393 pp. 191–199.
- Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. (1986). Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle *versus* sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 92: 613-20).
- Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. (2012). Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: comparison with cyclosporine A. *Eur J Pharmacol;* 675: 40-6.
- Pap M and Cooper GM. (1998). "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol-3- kinase/Akt cell survival pathway". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, pp. 19929-19932.
- Park S-S, Zhao H, Mueller RA, Xu Z. (2006). Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3[beta]. *J Mol Cell Cardiol.*;40:708 –716
- Pastorino JG, Hoek JB, and Shulga N. (2005). "Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity" *Cancer Research*, vol. 65, pp. 10545-10554.
- Peart JN, Headrick JP.(2009). Clinical cardioprotection and the value of conditioning responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296: H1705 – H1720

- Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W, Huang P. (2006). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism, *Journal of Cell Biology* 175 913–923.
- Philipp S, Yang X-M, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. (2006). Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res.* 70: 308-14.
- Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang X.L, Manchikalapudi S., Cao X., et al. (1997). Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 81:404–414.
- Piot C, Criosille P, Staat P, et al. (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*;359:473–81.
- Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. (1999). Nitric oxide, nitrates and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 43:621-627.
- Ross SE, Erickson RL, Hemati N, MacDougald OA. (1999). Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol.* 19:8433– 41.
- Ryves WJ, and Harwood AJ. (2001). "Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 280, pp. 720-725.
- Sadat U. (2009). Signaling pathways of cardioprotective ischemic preconditioning. *International Journal of Surgery* 7 490–498

- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. (1990). Ischaemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *CircRes*. 66:1133-42.
- Sedlak J, Lindsay R (1958)..Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's Reagent. *Analytical biochemistry*. 25; 192-205.
- Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, et al. (2005). Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion. *FASEB J*. 19: 354-61.
- Slodzinski MK, Aon MA, and O'Rourke B. (2008). Glutathione oxidation as a trigger of mitochondrial depolarization and oscillation in intact hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 45, pp. 650-660.
- Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P. (2004). Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin A prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 279:36803– 8.
- Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation*. 112:2143–8.
- Sun H-Y, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, et al. (2005). Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Am J Physiol*. 288: H1900-1908.
- Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E, Nakaya H. (2002). Role of sarcolemmal KATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*. 109:509-516

- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. (1993). Inactivation of glycogen synthase 3-beta by phosphorylation: new kinase connection in insulin and growth-factor signaling. *Biochem J.* 296:15–9.
- Terashima Y, Sato T, Yano T, Maas O, Itoh T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Shimamoto K, and Miura T. (2010). "Roles of phospho-GSK-3beta in myocardial protection afforded by activation of the mitochondrial K ATP channel" *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 49, pp. 762-770.
- Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res.* (4):377-379.
- Tsao PS, Lefer AM. (1990). Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol.* 259:H1660 – 6.
- Towbin H, Staehelin T, et al. (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." *Biotechnology* 24: 145-9.
- Uecker R, Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. (2003). Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*, 99 pp. 138–147.
- Vanhaesebroeck, B and Alessi DR. (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* 346 Pt 3: 561-76.
- van Deel ED, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD, Bache RJ, Duncker DJ, Chen Y. (2008). Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free Radic. Biol. Med.* 44(7):1305-1313.

Van Emous JG, Schreur JH, Ruigrok TJ, Van Echteld CJ (1998). Both Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 30(2):337-348.

Vinten-Johansen J, Granfeldt A, Mykytenko J, Undyala VV, Dong Y, Przyklenk K. (2011). The multidimensional physiological responses to postconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 14: 791-810

Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. (1985). Triphenyltetrazolium staining of irreversible injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol.* 121:522-530.

Vogt AM, Htun P, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. (1996). Intramyocardial infusion of tool drugs for the study of molecular mechanisms in ischemic preconditioning. *Basic Res Cardio.* 91:389– 400.

Woodfield K, Rück A, Brdiczka D, Halestrap AP. (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 336:287–90.

Wymann MP, bulgarelli-leva G, marketa j. zvelebil LP, vanhaesebroeck B, Waterfield MD, and panayotou G. (1996). wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *molecular and cellular biology*, 1722–1733

Wymann MP, Marone R. (2005). Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding, *Current Opinion in Cell Biology.* 17; 141–149

Yang X, Cohen MV, Downey JM. (2010). Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther.* 24: 225 – 234.

- Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. (1994). Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol.* 267(6 Pt 2):2383-2390.
- Ytrehus K., Liu Y., Downey J.M. (1994). Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 266:H1145–H1152.
- Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. (2004). Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol.* 266(3 pt 2):H1145-H1152.
- Yellon DM, Baxter GF. (2000). Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart.* 83(4):381-387.
- Yellon DM, Downey JM. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 83(4):1113–51.
- Yoshida K, Kawamura S, Mizukami Y, Kitakaze M. (1997). Implication of protein kinase C- $\alpha$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$  isoforms in ischemic preconditioning in perfused rat hearts. *J Biochem (Tokyo)* 122:506–511.
- Zatta AJ, Kin H, Lee G, et al. (2006). Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signaling. *Cardiovasc. Res.* 70(2):315-324.
- Zhai P, Sciarretta S, Galeotti J, Volpe M, and Sadoshima J. (2011). "Differential Roles of GSK-3 $\beta$  during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion" *Circulation*, vol. 109, pp. 502-511.
- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, and Klein PS. (2003). "Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, pp. 33067-33077.



Zhao ZQ, Corvera JS, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2002). Reduction in infarct size and preservation of endothelial function by ischemic postconditioning: comparison with ischemic preconditioning. *Circulation*. 106:II314

[Zhao ZQ](#), [Corvera JS](#), [Halkos ME](#), [Kerendi F](#), [Wang NP](#), [Guyton RA](#), [Vinten-Johansen J](#). (2003). injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 285:579 – 88.

Zhi-Qing Zhao, Joel S. Corvera, Michael E. Halkos, Faraz Kerendi, Ning-Ping Wang, Robert A. Guyton and Jakob Vinten-Johansen. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H579-H588.

Zhou MO, Schafhalter-Zoppoth HZ, Zhu P, Messing R.O. (2004). Preservation of base-line hemodynamic function and loss of inducible cardioprotection in adult mice lacking protein kinase C epsilon. *J Biol Chem* 279:3596–3604.

Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, Schaub MC, and Zaugg M. (2006). "Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway" *Cardiovascular Research*, vol. 72, pp. 152-162.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. (1987). Direct measurement of free radicals generated following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci*. 84:1404 – 7.

