



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Efectos de la genisteína en varios modelos de
isquemia-reperfusión cardíaca mediante estudio
mecánico-energético”**

Tesista: Farm. Germán Andrés Colareda
Directora: Prof. Dra. Alicia E. Consolini

2016

En memoria a

Carlos R. Colareda, mi padre.

Agradecimientos:

A la Dra. Alicia Consolini, por la enseñanza brindada a lo largo de todos estos años, por su dedicación y por sobre todas las cosas por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de esta tesis.

Al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme realizar esta tesis en la Cátedra de Farmacología, Grupo de Farmacología Experimental y Energética Cardíaca (GFEYEC).

A la Universidad Nacional de La Plata por subsidiar este trabajo.

A mis padres, porque gracias a su sacrificio logré llegar hasta esta instancia. A mi madre por su amor incondicional, la distancia que nos ha separado todos estos años no ha sido inconveniente para sentir su ánimo, apoyo y cariño que me han permitido seguir adelante para cumplir mis sueños. A mi padre que ya no está, pero que me acompañó y ayudó hasta el último día de su vida y le estaré eternamente agradecido.

A Eugenia, con quien comparto la vida y mi profesión, por haberme alentado a realizar la carrera de doctorado y por acompañarme incondicionalmente a lo largo de todos estos años.

A mis hermanos, tíos, sobrinos y a toda mi familia por su apoyo y cariño, especialmente a mi hermano Juan Carlos, por ayudarme a realizar la carrera de Farmacia, por sus consejos y por estar siempre.

A Nolberto, por su ayuda en la reparación de los equipos electrónicos y por sobre todas las cosas por sus consejos y por su compañía, su partida dejó un gran vacío en mi corazón.

A mis amigos, por preguntar e interesarse en los avances de la tesis y por entender mi ausencia en momentos en los que tanto a ellos como a mí nos hubiera gustado estar juntos.

A mis compañeros de la Cátedra de Farmacología y de laboratorio, por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento. Especialmente a Inés, por su asesoramiento y por su buena predisposición a la discusión.

A la gente de mi querido Fortín Olavarría, que siempre me reciben con los brazos abiertos, por motivarme a finalizar esta tesis.

INDICE:

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
<i>1. Acoplamiento excito-contráctil en el corazón normal y diferencias de especie</i>	8
1.a Dinámica general del ciclo contráctil miocárdico	8
1.b Influjos de Ca^{2+} y regulaciones	10
1.c Receptores de Rianodina (RyR)	13
1.d Remoción del Ca^{2+} citosólico y modulaciones.	15
1.e Transporte de Ca^{2+} mitocondrial	20
1.f Transporte de K^{+} mitocondrial	32
1.g Diferencias de género en los mecanismos de acoplamiento excito-contráctil	37
1.h Efectos de las hormonas sexuales sobre la contractilidad cardíaca	39
<i>2. Isquemia y reperfusión cardíaca</i>	44
2. a. Alteraciones en la homeostasis de calcio	46
2.b Hipótesis de los radicales libres (ROS)	52
<i>3. Energética cardíaca y su aplicación al estudio de la isquemia y reperfusión</i>	55
3.a. Calorimetría y metodologías miotérmicas	56
3.a.1 Método de las termopilas	57
3.a.2 Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos	58
3.a.3 Otros estudios miotérmicos	59
3.b. Metabolismo Basal	61
3.c. Metabolismo activo	62
3.d Consideraciones bioenergéticas del ciclo de Ca^{2+} mitocondrial	66
3.e Aplicación de la calorimetría al estudio de la isquemia/reperfusión y al rol mitocondrial en corazones de rata y cobayo	66
<i>4. Efectos de la genisteína</i>	70
4.a. Efectos mediados por la vía de las Tirosinas Kinasas	70
4.b Efectos en la corriente de Ca^{2+}	70
4.c Efectos sobre el contenido de calcio sarcoplásmico	73
4.d Efectos sobre el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal	74
4.e Efectos sobre los miofilamentos	74
4.f Efectos de genisteína sobre los receptores estrogénicos	75
4.g Efectos en otras vías asociadas a tirosina-kinasas	76

4.h Efectos de genisteína en modelos in vivo	76
4.i Efectos de genisteína en modelos que mimetizan patologías cardíacas	77
PROBLEMA DE ESTUDIO	79
HIPOTESIS	79
OBJETIVOS	80
1. Objetivo general	81
2. Objetivos específicos	81
MATERIALES Y MÉTODOS	82
1. <i>Preparaciones biológicas</i>	83
1.a. Animales de experimentación empleados	83
1.b. Corazones aislados de rata	83
1.c Corazones aislados de cobayo	84
1.d Aislamiento de cardiomiocitos de rata	85
2. <i>Mediciones mecánico-calorimétricas en corazones enteros perfundidos.</i>	86
3. <i>Calibración y estabilización del calorímetro</i>	89
4. Microscopía confocal de Ca^{2+}	91
5. <i>Medición del grado de infarto</i>	92
6. <i>Soluciones y drogas empleadas</i>	94
7. <i>Protocolos mecánico energéticos</i>	96
7.a Modelo de atontamiento por isquemia de no flujo-reperfusión	96
7.a.1 Corazones de rata	96
7.a.1.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 30°C	96
7.a.1.2 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 37°C	99
7.a.1.3 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento severo	101
7.a.2 Corazones de cobayo	102
7.a.2.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 30°C	102
7.a.2.2 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión con pre condicionamiento isquémico	103
7.b Modelo de atontamiento por hipoperfusión y perfusión en corazones de rata	104
7.b.1 Caracterización de la participación de transportadores mitocondriales	105
7.b.2 Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión y perfusión	106

8. <i>Análisis estadísticos</i>	107
RESULTADOS	108
1. Modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión	109
1.a Corazones de rata	109
1.a.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 30°C	109
1.a.1.1 Efectos de la perfusión de genisteína 20µM previo a la I/R	109
1.a.1.2 Participación de las tirosina-kinasas en los efectos de genisteína en CRH	114
1.a.1.3 Participación de las tirosina-kinasas en los efectos de genisteína en CRM	117
1.a.1.4 Participación del óxido nítrico (NO) en los efectos de genisteína en CRH	120
1.a.1.5 Efectos de genisteína y de ortovanadato sobre el contenido de Ca ²⁺ sarcoreticular	122
1.a.2 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 37°C	128
1.a.2.1 Efectos de genisteína 20 µM durante todo el período I/R en CRH	128
1.a.2.2 Efectos de genisteína 2 µM durante todo el período I/R	131
1.a.2.3 Efectos de genisteína 20 µM perfundida previo a la isquemia	134
1.a.2.4 Influencia de la estimulación adrenérgica sobre los efectos de genisteína en corazones de rata hembra	137
1.a.2.5 Influencia de la estimulación adrenérgica sobre los efectos de genisteína en corazones de rata macho	139
1.a.3 Efectos de genisteína in vivo en un modelo de atontamiento severo por I/R a 37°C	143
1.a.3.1 Efectos de la administración intraperitoneal de genisteína 24 hs. antes de la I/R.	143
1.a.3.2 Efectos de la administración in vivo de genisteína sobre el contenido de Ca ²⁺ sarcoreticular	147
1.b Corazones de cobayo	149
1.b.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo-reperfusión a 30°C.	149
1.b.2 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento con pre condicionamiento isquémico	151
2. Modelo de atontamiento por hipoperfusión –reperfusión	157
2.a Participación de transportadores mitocondriales en un modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión en corazones aislados de rata	157

2.a.1 Rol del intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial, NXCm	157
2.a.2 Rol del canal mKATP	160
2.a.3 Rol del uniporter de Ca ²⁺ mitocondrial (UCam)	162
2.b Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión	164
2.b.1 Efectos de genisteína 20µM	164
2.b.2 Efectos de genisteína 20 µM en corazones tratados con clonazepam 10 µM	166
2.b.3 Efectos de la administración in vivo de genisteína 5 mg/Kg en HIP/R	170
3. Cambios en la [Ca ²⁺] citosólica y mitocondrial en cardiomiocitos aislados de rata expuestos a genisteína 20 µM	173
4. Medición del grado de infarto	175
DISCUSIÓN	176
1 Modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y perfusión	177
1.a Efectos de genisteína en corazones de rata	177
1.a.1 Efectos y mecanismos de genisteína en los modelos de atontamiento a 30°C	178
1.a.2 Efectos y mecanismo de genisteína en los modelos de atontamiento a 37°C	183
1.a.3 Efectos de genisteína y adrenalina en el tono diastólico durante la I/R	186
1.a.4 Cambios en la economía muscular	188
1.b Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento de corazones de cobayo	189
2 Modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión en corazones aislados de rata.	192
2.a Participación de transportadores mitocondriales	192
2.b Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión y perfusión	196
3. Efectos de genisteína in vivo 24 hs. antes de la I/R o la HIP/R	197
CONCLUSIONES	202
BIBLIOGRAFIA	204

RESUMEN

Esta tesis estudió los efectos directos del fitoestrógeno genisteína en varios modelos de isquemia-reperfusión: de no-flujo/reperfusión (I/R) en corazones enteros de rata y cobayo, y de hipoperfusión/reperfusión (HIP/R) en corazones enteros de rata. En estos modelos se generó una recuperación contráctil parcial durante la reperfusión, sin infarto, denominado “corazón atontado”. La disfunción contráctil en estos modelos está acompañada por una elevada liberación de calor que conduce a la disminución de la economía muscular total. Los cambios energéticos reflejan alteraciones en la contractilidad, en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$, en los mecanismos activos de remoción y liberación de Ca^{2+} al citosol, y en la actividad metabólica mitocondrial.

Aunque el fitoestrógeno genisteína es considerado protector cardiovascular, sus efectos directos en el miocardio atontado no estaban establecidos. Conocerlos es de importancia para evaluar una posible acción preventiva de este fitofármaco que se emplea en estados post-menopáusicos y como componente dietético principalmente aportado en la soja.

La tesis estudió los efectos de perfundir 2 y 20 μM de genisteína previo a la I/R en corazones de rata o cobayo, puesto que ambos difieren en el grado de participación de mecanismos sarcoreticulares y sarcolemales. Además, puesto que la genisteína es considerado un fitoestrógeno, se evaluaron las diferencias de respuesta entre los dos sexos, tanto en I/R como en HIP/R. Se estudiaron los efectos desarrollados por la perfusión de genisteína directamente en los corazones aislados y contenidos en el interior de un calorímetro de flujo. En otras series experimentales, se estudiaron los efectos producidos después de la administración *in vivo* de 5 mg/Kg vía intraperitoneal un día antes del experimento de I/R en el corazón aislado.

Experimentalmente, se midieron simultáneamente la presión intraventricular izquierda (LVP en mmHg) y el flujo de calor total (Ht en mW/g tejido) de corazones enteros de rata y cobayo introducidos en la cámara interna de un calorímetro de flujo, en forma continua tanto durante la perfusión control (6 ml/min) como en isquemia de no-flujo (por corte global de la perfusión) o en hipoperfusión (por reducir el flujo a 1,2 ml/min). En los modelos de “atontamiento”, los períodos de

I/R o de HIP/R se eligieron para lograr una recuperación de alrededor del 50% de la contractilidad inicial en condición control. En corazones de rata se estudió también un modelo de “atontamiento severo” en el que el control recuperó alrededor del 15% de la contractilidad inicial. Los corazones estabilizados dentro del calorímetro se expusieron a diversos protocolos de pretratamiento con genisteína (GST) y/o ciertos inhibidores selectivos de transportadores para evaluar su rol en el efecto. Se hallaron los siguientes resultados principales en los diferentes modelos:

a) En el modelo de atontamiento por I/R: en corazones aislados de rata expuestos a 20 min I/45 min R a 37 °C, GST 20 μM no cambió la recuperación contráctil post-isquémica (RCPI), pero aumentó la velocidad de relajación relativa ($-\text{dP}/\text{dt}/\text{P}$) de las contracciones en R. Además, mejoró la economía muscular total (P/Ht) sólo cuando estuvo presente desde antes de la I al final de la R. La perfusión de menor concentración de GST 2 μM a 37°C (descrita en plasma de pacientes que consumen fitoestrógenos en la dieta) tampoco modificó la RCPI ni la economía, observando similar efecto que a 20 μM aún en la relajación. Sin embargo, a 30 °C, en los corazones expuestos a 45 min I/45 min R, GST 20 μM redujo la RCPI tanto en corazones de ratas como de cobayos macho (M), sin modificar la RCPI de las hembras (H), con similares comportamientos de la economía. La inhibición de tirosina fosfatasas con orto-vanadato (OVN) durante la perfusión con 20 μM GST previno la disminución de la RCPI en corazones de rata M, sugiriendo que el efecto inotrópico negativo de GST es debido a la inhibición de tirosina-quinasa (TK). Reperfundiendo los corazones isquémicos con Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+ se indujo una contractura dependiente del contenido de Ca^{2+} sarcoreticular, y una liberación de calor que representa el ciclaje de Ca^{2+} a través de los varios transportadores involucrados. La relajación de la contractura depende principalmente de la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} en estas condiciones, y GST redujo esa velocidad de relajación a 30°C. En corazones de cobayo, GST 20 μM mantuvo la protección del preconditionamiento (PC) isquémico previo a los 30 min I/45 min R, pero ambos efectos fueron reducidos (cayó la RCPI) por el

bloqueante selectivo de los canales de K^+ mitocondriales (KATPm) 5-hidroxidecanoato, sugiriendo la participación de los KATPm en el efecto de GST y del PC.

b) En cardiomiocitos aislados de rata y perfundidos en medio aeróbico, GST 20 μ M previno el aumento en la fluorescencia de Rhod-2 ($[Ca^{2+}]_m$ libre) y demoró la caída de la señal fluorescente de Fluo-4 ($[Ca^{2+}]_i$ libre citosólico) ambos provocados por la perfusión de un Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+ .

c) Efectos de GST en el modelo de atontamiento con estimulación simpática: se encontró que 20 μ M GST redujo la disfunción provocada por adrenalina en el modelo de atontamiento por I/R, mejorando la RCPI y la economía (P/Ht). Esta interacción sugirió que GST redujo la sobrecarga de Ca^{2+} inducida por adrenalina.

d) En el modelo de atontamiento severo por I/R: en corazones aislados de rata a 37 °C, GST 5 mg/Kg administrada vía intraperitoneal 24 horas antes del experimento mejoró la RCPI de corazones expuestos a 30 min I seguido de 45 min R, especialmente en corazones de rata macho. Este efecto no estuvo asociado a la inhibición de las tirosina-kinasas (no se modificaron por tratamiento previo con OVN), ni a cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS (no alteró la contractura provocada por Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+).

e) En el modelo de hipoperfusión/reperfusión (HIP/R): inicialmente se caracterizó el rol de los transportadores de Ca^{2+} mitocondriales en este modelo. Se logró mejorar la RCPI y la economía durante la hipoperfusión cuando se pretrataron con clonazepam 10 μ M, el cual inhibe al NXCm, sugiriendo el rol cardioprotector de conservar más Ca^{2+} en las mitocondrias durante la hipoperfusión. Otros transportadores mitocondriales (UCam y KATPm) no ejercieron un rol cardioprotector en la HIP/R. Luego, 20 μ M GST generó el mismo patrón de comportamiento que en el atontamiento por I/R a 37°C, es decir que M y H no alteraron la RCPI ni la economía. Pero al combinar la perfusión de GST luego y en simultáneo con la de clonazepam se observó una disfunción muy acentuada: reducción de RCPI y economía, y gran contractura. Esta disfunción fue atenuada por

la simultánea perfusión de ciclosporina A, lo cual sugiere que hay una gran alteración en la homeostasis de Ca^{2+} con apertura del mPTP al interferirse los transportadores mitocondriales UCam y NXCm. Por otro lado, cuando el modelo de HIP/R se realizó 24 horas después de la administración IP de 5 mg/Kg de GST en corazones de rata macho, se obtuvo cardioprotección con aumentos de la RCPI y la economía (P/Ht).

Estos resultados sugieren que GST actúa en varios mecanismos que regulan la homeostasis de calcio miocárdica y la energética durante la I/R, los cuales difieren con la temperatura y el género. Entre ellos, hemos caracterizado a los siguientes:

a) Una inhibición del influjo de Ca^{2+} por canales L, más notoria en machos que en hembras y a baja temperatura (30 °C), que es dependiente de la inhibición de TK.

b) un aumento de la velocidad de relajación de las contracciones, posiblemente por aumentar la captación sarcoplásmica de Ca^{2+} , el cual fue evidente tanto a 30°C como a 37°C pero fue enmascarado por la acción lusitrópica propia de la adrenalina.

d) un aumento del *leak* de Ca^{2+} del RS dependiente de la temperatura, ya que fue evidenciado por el aumento de la LVEDP durante la R en los corazones tratados con GST a 37 °C, aun en las condiciones de cardioprotección.

e) una disminución de la captación de Ca^{2+} mitocondrial, evidenciado en cardiomiocitos aislados y en corazones en I/R a 30 °C, cuando se perfundieron con Krebs-10 mM caféina-36 mM Na^+ .

e) una acción cardioprotectora cuando se administró *in vivo*, que podría estar asociada a la interacción agonista competitiva con el estradiol endógeno a nivel de los receptores estrogénicos, puesto que la RCPI y la economía mejoraron mucho mas en el tratamiento *in vivo* de rata macho que en el de rata hembra. La dosis de 5 mg/Kg evaluada en esta tesis es comparable a la administrada en humanos terapéuticamente (70 mg/día de isoflavonas de soja).

En conclusión, esta tesis valida el efecto benéfico de la administración *in vivo* de GST en un individuo, especialmente si tiene reducido nivel estrogénico, como preventivo del atontamiento miocárdico disparado por la reducción del flujo coronario. Además, establece algunos de los mecanismos determinantes de tal protección a nivel de la homeostasis de Ca^{2+} y la energética miocárdica.

INTRODUCCIÓN

1. ACOPLAMIENTO ÉXCITO-CONTRACTIL EN EL CORAZÓN NORMAL Y DIFERENCIAS DE ESPECIE:

1.a Dinámica general del ciclo contráctil miocárdico:

La contracción de cada célula del músculo cardíaco (cardiomiocito) es consecuencia de un conjunto de fenómenos, que comienzan en la membrana celular o sarcolema, con la despolarización de la misma (potencial de acción), y culminan en el interior de la célula, con la contracción a nivel de los miofilamentos. Este proceso, que tiene como nexos y principales protagonistas al ion Ca^{2+} , se denomina acoplamiento éxcito-contráctil. La contracción del músculo cardíaco se inicia con la unión de Ca^{2+} a troponina C, como en el músculo esquelético (Leavis y Kraft, 1978; Zot y Potter, 1990). Sin embargo, a diferencia de éste, el cardíaco es absolutamente dependiente de la presencia extracelular de Ca^{2+} para efectuar la contracción. La membrana celular se debe despolarizar inicialmente por el influjo de Na^+ a través de los canales rápidos de Na^+ . Una vez alcanzado el umbral cercano a -40mV se activan los canales de Ca^{2+} de tipo L (LCC) originando la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}), predominante en la fase 2 o meseta del potencial de acción. A pesar del elevado gradiente electroquímico para el ingreso de Ca^{2+} al citosol, la baja permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} en condiciones de reposo mecánico es en parte responsable del mantenimiento de la baja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Coraboeuf, 1978). Pero ésta es principalmente mantenida por los sistemas de remoción activa de Ca^{2+} que utilizan energía química directa o indirectamente (ver Fig. 1). Los sistemas de remoción citosólica de Ca^{2+} están ubicados tanto en la membrana celular o sarcolema (SL) (Ca^{2+} -ATPasa-SL e intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o NXC-SL) como en el retículo sarcoplásmico (RS) (Ca^{2+} -ATPasa denominada SERCA2a) y en las mitocondrias (uniporter de Ca^{2+} o UCam e intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial o NXCm) (Reuter y Seitz, 1968; Caroni y Carafoli, 1980; Tada e Inui, 1983; Gunter y col. 1994; Bers, 2001). Sin embargo, no todos tienen el mismo grado de participación en el ciclo contráctil. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está en el orden de micromolar (entre $0.1 \mu\text{M}$ en la diástole y $1-10 \mu\text{M}$ en la sístole) (Sheu y col., 1984). El influjo de

Ca^{2+} por LCC es amplificado por una liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) (Fabiato, 1983). Hay una relación de acoplamiento entre cada canal L y cierto número de receptores de rianodina (RyR) del RS agrupados en forma de *clusters*, la cual varía con la especie (Bers, 2001).

La misma proporción de Ca^{2+} liberado del RS es recapturado por el mismo a través de la Ca^{2+} ATPasa del RS (SERCA). La SERCA2a es la mayor responsable del descenso del Ca^{2+} citosólico y, por lo tanto, de la relajación miocárdica, pudiendo llevar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles diastólicos. La calceuestrina, como amortiguador del Ca^{2+} libre intraluminal, también favorece la relajación (MacLennan y col., 2002). El otro sistema responsable de la relajación es el NCX, que es un transportador electrogénico sarcolemal (Miura y Kimura, 1989). El NCX es conducido por el gradiente electroquímico de Na^+ y Ca^{2+} , de modo que predomina el modo de eflujo de Ca^{2+} (“forward”) durante el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, iniciando así la remoción para la relajación. Durante el evento contráctil, el músculo cardíaco está sometido a cambios rápidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cual oscila entre el nivel basal correspondiente al estado de reposo mecánico ($< 0.1 \mu\text{M}$) y un máximo de aproximadamente 25-50 μM durante la contracción (Fabiato, 1981). En general se atribuye al NCX-SL una gran capacidad de eflujo (V_{max} de 27 $\text{nmol Ca}^{2+} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$) y relativamente baja afinidad (1 a 4 μM), mientras la SERCA2a posee una alta afinidad (0.1 a 0.5 μM) y buena capacidad (V_{max} de hasta 85 $\text{nmol Ca}^{2+} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$) (Bassani y col. 1994). En base a estos datos se deduce que hay una remoción inicial por el NCX-SL durante el pico del transitorio de Ca^{2+} , y una regulación continua de la concentración de Ca^{2+} intracelular durante todo el ciclo por la SERCA2a (Noma y col., 1992). Si bien hay cierta competencia entre los dos transportadores para remover el Ca^{2+} citosólico (Bers y Bridge, 1989), otro factor que influye en la participación relativa de cada transportador es la ubicación celular.

Así, el NCX-SL regula el eflujo principalmente durante el inicio de la relajación, cuando se alcanzan altas concentraciones locales de Ca^{2+} en la díada donde están mayormente ubicados, que es en la cercanía de los receptores de rianodina (RyR) del RS. Así el NCX-SL extrude alrededor de un 20% del Ca^{2+} liberado del RS en cada latido (Matsuiko y col., 1991). Estudios en cardiomiocitos

aislados mostraron que la actividad del NXC-SL es dependiente de la especie, dadas las diferencias en la $[Na^+]_i$. Así, la velocidad de remoción de Ca^{2+} en presencia de 10 mM cafeína (droga que estimula la liberación del RS y el ciclaje de Ca^{2+} sin remoción efectiva) refleja primariamente la actividad de extrusión de Ca^{2+} por el NXC-SL. Ésa velocidad de eflujo citosólico de Ca^{2+} resultó con el siguiente orden de especies: hamster >cobayos \geq humanos \geq ratas (Sham y col., 1995). El corazón de la rata tiene una mayor $[Na^+]_i$ (12 a 15 mM) que el de conejo (9-10 mM) y el de cobayo (7 a 10 mM) (Shattock y Bers, 1989). En la rata la SERCA2a contribuye en aproximadamente el 90 % a la caída del Ca^{2+} citosólico que lleva a la relajación, y el NXC-SL contribuye en el 9 %. El pequeño porcentaje restante es removido por la Ca^{2+} ATPasa-SL y por las mitocondrias, siendo considerados ambos sistemas lentos. En el hombre la extrusión de Ca^{2+} para la relajación es conducida en aproximadamente el 70 % por SERCA2a, 28 % por NXC-SL, y 1-2 % por los sistemas lentos (Bers y col., 1996). Si la actividad de la SERCA2a aumenta, la velocidad de secuestro de Ca^{2+} será mayor y el Ca^{2+} secuestrado por el RS aumentará en relación al que se extruye fuera de la célula. Esto provoca no solo un aumento de la velocidad de relajación, sino también de la carga del RS y por lo tanto del Ca^{2+} liberado para la próxima contracción (Frank y Kranias, 2000).

1.b Influjo de Ca^{2+} y regulaciones:

El influjo de Ca^{2+} a través del sarcolema se efectúa por canales de Ca^{2+} , cuya conductancia es afectada por fosforilación de sus proteínas constituyentes (Tsien y Zucker, 1986), por la naturaleza de los fosfolípidos y carbohidratos que lo rodean (glicocálix) y por el pH extracelular (Sperelakis y Schneider, 1976). Si bien hay tres tipos de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, en células ventriculares adultas como las de conejo se encuentra presente solo la isoforma Cav1.2 (Jaleel y col., 2008) concentrada en los túbulos T (fig. 1) (Kawai y col., 1999; Takagishi y col., 2000). A esta isoforma se la denomina comúnmente canal de tipo L (LCC, L-type calcium channel) o receptor de dihidropiridinas (DHPR, dihydropyridine receptor) dada su sensibilidad característica a este grupo de

compuestos, que pueden actuar como bloqueantes (nifedipina, amlodipina, nisoldipina y otros derivados). A pesar de que existe otro tipo de canales de Ca^{2+} en el músculo cardíaco, los T (o transitorios de rápida inactivación), éstos están presentes predominantemente en el sistema de conducción, y no participan significativamente en la contracción miocárdica. Ambos se activan por despolarización de la membrana y se inactivan de modo tiempo y voltaje-dependiente. La diferencia es que los canales T se activan al potencial umbral de -60 mV y tienen una amplitud de pico de hasta -30 mV, mientras los L se activan a -40 mV y su pico ocurre a $+5$ mV (Shuba y Mc Donald, 1995). La corriente T se inactiva más rápidamente que la L, y completamente a potenciales más positivos que -30 mV o a potenciales mantenidos estables de -50 mV, mientras la L permanece activa (Shuba y Mc Donald, 1995). Esto genera la consecuencia de que el influjo de Ca^{2+} durante la contracción sea debido más probablemente a los canales L, y una mínima fracción se asocie a los T, aunque se citan algunas diferencias de especies en los voltajes de activación e inactivación (Bers, 2001).

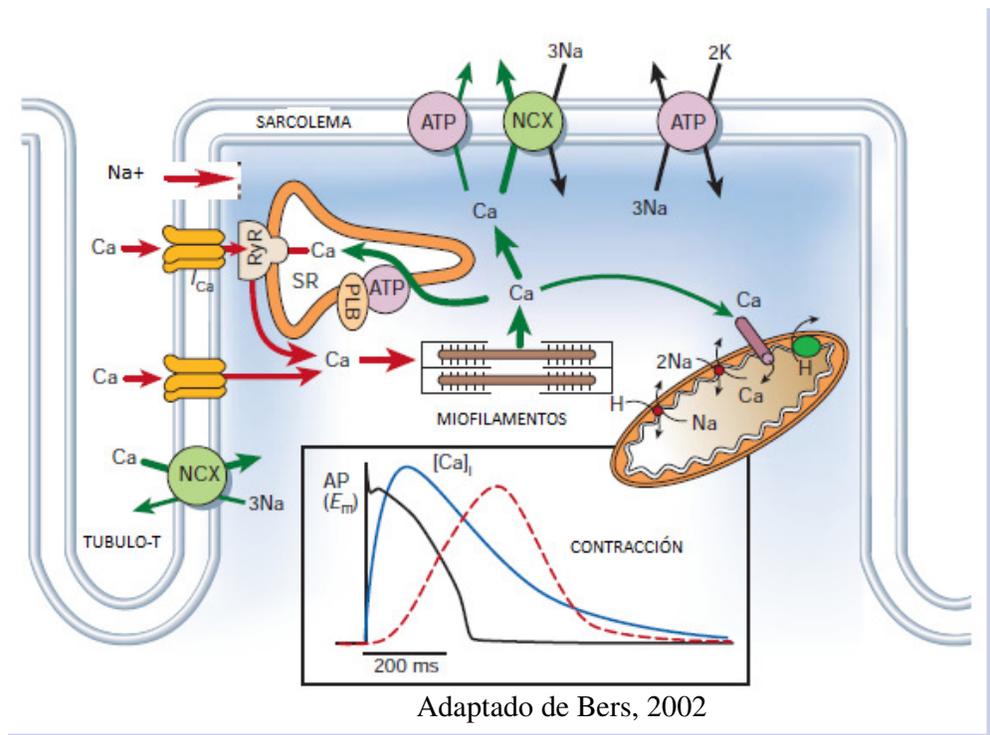


Fig. 1: Esquema de los transportadores que regulan la homeostasis de Ca^{2+} durante el ciclo cardíaco

La activación de los LCC durante el potencial de acción cardíaco estimula la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico al citosol (Fabiato, 1983; Bers, 2001). La corriente de Ca^{2+} L (I_{Ca}) generada por estos canales posee dos componentes. A uno se lo denomina rápido ya que ocurre en los primeros milisegundos luego de la activación del canal y corresponde al pico de la corriente. A este componente se lo considera responsable de la inducción de la liberación de Ca^{2+} por los RyR. El segundo es un componente lento que causa acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma. La inactivación de este canal es tiempo, Ca^{2+} y voltaje dependiente (Altamirano y Bers, 2007). De estos tres mecanismos, la inactivación por Ca^{2+} es la principal y se cree que responde a un efecto local del Ca^{2+} que ingresa por el canal, ya que esta inactivación se encuentra presente aún en condiciones donde la contracción (dada por el Ca^{2+} global) ha cesado. La inactivación por concentración intracelular de Ca^{2+} se produce por unión de este ión a calmodulina. Esta proteína se encontraría unida al canal de tipo L en reposo, actuando como un sensor de Ca^{2+} . Una vez que el Ca^{2+} se une a la calmodulina ésta sufre un cambio conformacional que a su vez modifica la porción del canal que se cree es responsable de la oclusión del poro (Kim y col., 2004). Si bien un factor determinante de esta inactivación por Ca^{2+} en los corazones de rata es la liberación de Ca^{2+} desde el RS (Sun y col., 1997), algunos autores han mostrado que las mitocondrias contribuyen a la acumulación de Ca^{2+} local citosólica cercana a los canales de Ca^{2+} tipo L (Isenberg y col., 1993; Sánchez y col., 2001). Esta regulación mitocondrial podría estar alterada en situaciones patológicas donde el corazón late a altas frecuencias tales como la taquicardia supraventricular, contribuyendo a la disfunción contráctil (Sánchez y col., 2001).

Los LCC están concentrados en su mayor parte en los túbulos T sarcolemales. Estos canales son complejos proteicos multiméricos formados por 5 unidades (α_1 , α_2 , β , γ y δ), que son codificadas por genes separados. La subunidad α_1 contiene el poro por el que entra el calcio y los sitios de unión para los agonistas y antagonistas cálcicos, y contendría además los sitios de fosforilación de la proteína Kinasa A (PKA), de la proteína Kinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) y de la proteína

Kinasa C (PKC), que regulan la actividad del canal (Hosey y col., 1986; Sharp y col., 1987; O'Callan y col., 1988).

Si bien los LCC representan la vía más importante de influjo de Ca^{2+} extracelular durante el potencial de acción, en ciertas condiciones se han descrito otras vías. Una de ellas es el NXC-SL, en modo reversa, cuya participación parece importante en condición de sobrecarga de Na^+ intracelular (Bers, 1987).

1.c Receptores de Rianodina (RyR):

En células ventriculares cardíacas existe un canal de Ca^{2+} ligando-dependiente que posee extrema importancia: los receptores de rianodina (RyR). Este canal se encuentra embebido en la membrana de las cisternas del RS, formando agrupaciones o *clusters* en directa oposición a la membrana de los túbulos T que contienen los LCC (Fig. 1).

En mamíferos existen tres isoformas de esta proteína RyR1, RyR2 y RyR3. La isoforma RyR2 es la más abundante en el músculo cardíaco (Fill y Copello, 2002; Zalk y col., 2007). Estos canales presentan una pobre selectividad para Ca^{2+} pero una alta conductancia (Fill y Copello, 2002). En células ventriculares los RyR son activados por el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ cerca de la boca del canal, en el lado citoplasmático. La probabilidad de apertura del RyR muestra una relación exponencial con la concentración del Ca^{2+} que actúa como activador (Fig. 1) (Copello y col., 1997).

La relación de concentraciones entre el Ca^{2+} en el citoplasma y el Ca^{2+} libre en el RS hace que ante la apertura del RyR el Ca^{2+} fluya desde el lumen del RS hacia el citoplasma. Este Ca^{2+} liberado a su vez actúa como una señal de retroalimentación positiva para el mismo canal, para otros receptores adyacentes dentro del *cluster*, o inclusive para otro agrupamiento de receptores.

Existen otros mecanismos de regulación del canal RyR, siendo su fosforilación (Wehrens y col., 2006) y el contenido luminal de Ca^{2+} (Shannon y col., 2000) los más importantes.

Si bien hay un gran número de fármacos y toxinas que actúan sobre el receptor de rianodina (Sutko y col., 1997) y pueden ser usados como herramientas de estudio del receptor, ninguno

presenta una especificidad por RyR2. Dos de estos compuestos revisten gran importancia: rianodina y cafeína. La molécula de RyR presenta dos sitios de unión irreversible al alcaloide rianodina, uno de alta afinidad (K_d 1-10 nM) y uno de baja afinidad (K_d 1-10 μ M) (Sutko y col., 1997). Mientras la unión de la droga al sitio de alta afinidad abre el canal en un estado de sub-conducción, la unión al sitio de baja afinidad lo bloquea completamente. Por otra parte, cafeína aplicada en una concentración del orden de micromolar aumenta la sensibilidad del RyR por Ca^{2+} , en tanto que en una concentración de 5-20 mM causa la apertura inmediata del receptor, con la consecuente pérdida de Ca^{2+} proporcional al contenido del RS (Bers, 2001).

La participación relativa de diferentes fuentes de Ca^{2+} , extracelular y sarcorreticular, varía con las especies. La liberación de Ca^{2+} del RS predomina en el ventrículo de rata, el influjo de Ca^{2+} extracelular es preponderante en el ventrículo de batracio y participan variables proporciones de ambas fuentes en los corazones de conejo y cobayo (Fabiato y Fabiato, 1978; Rich y col., 1988; Wang y col., 1993, Bers, 2001). El ventrículo humano sería más parecido al de conejo y cobayo que al de la rata respecto al origen del Ca^{2+} utilizado (Fabiato y Fabiato, 1978; Guo y col. 2011). Además, el contenido de Ca^{2+} del RS es mayor en el corazón de rata que en el de cobayo (Terracciano y col. 1997) y por lo tanto contribuye más al transitorio de Ca^{2+} citosólico (Bers, 2001).

Como consecuencia de los procesos de influjo de Ca^{2+} y liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} se eleva la $[Ca^{2+}]_i$ libre. Se ha denominado “transitorio de Ca^{2+} ” al pico de $[Ca^{2+}]_i$ siguiente a un potencial de acción miocárdico. Durante este transitorio, la $[Ca^{2+}]_i$ alcanza niveles cercanos a la constante de afinidad de varias proteínas celulares o sitios de unión (estimada por la inversa de la $K_{0.5}$ que es la $[Ca^{2+}]_i$ que ocupa el 50% de los sitios específicos de unión). Entre ellos, ocurre la unión de Ca^{2+} a troponina C ($K_{0.5}$ 5 nM a 0.5 μ M, Potter y Gergely, 1975), lo cual dispara la interacción actomiosínica. El grado de unión de Ca^{2+} a troponina C (Tn-C) es el que determina el grado de interacción actomiosínica y, por lo tanto, la magnitud de la fuerza desarrollada (Kerrick y col., 1980).

Pero también se activan diversos transportadores, con afinidades comparables, que actúan en la remoción de Ca^{2+} citosólico, como la SERCA ($K_{0.5}$ de 0.1 a 0.5 μM , Carafoli, 1985), la Ca-ATPasa-SL ($K_{0.5}$ 0.3 a 0.5 μM , Carafoli, 1985) y el NXC-SL ($K_{0.5}$ de 2 a 40 μM , Carafoli, 1985; Philipson, 1985). Además, el Ca^{2+} se une a sitios específicos en proteínas citosólicas como la calmodulina (Klee y Vanaman, 1982), el ATP y la fosfocreatina (PCr) y a otros sitios fijos intracelulares (Bers y Langer, 1979). Debido a la proximidad en las afinidades, no tarda en establecerse una competencia cercana al equilibrio entre los sistemas reversibles de unión de Ca^{2+} . Son las Ca-ATPasas y el NXC-SL los mecanismos que pueden desviar ese equilibrio removiendo el Ca^{2+} libre citosólico y el Ca^{2+} unido a Tn-C, con lo cual se provoca la relajación. La Fig. 1 muestra que el transitorio de Ca^{2+} alcanza su máximo al tiempo aproximado en que el músculo alcanza su máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil (Allen y Blinks, 1978; Wier, 1980; Allen y Kurihara, 1983). Esto indica la temprana desaparición del Ca^{2+} libre citosólico inicialmente por la unión a los sitios enlazantes y luego por la remoción activa.

1.d Remoción del Ca^{2+} citosólico y modulaciones:

Debido a sus altas afinidades, las Ca^{2+} -ATPasas de RS y SL actuarían continuamente en la remoción del Ca^{2+} citosólico. Ambas Ca^{2+} -ATPasas servirían para reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al bajo nivel de la diástole debido a sus bajos $K_{0.5}$ (Carafoli, 1985). Como se explicó antes, el NXC-SL, con menor afinidad y mayor capacidad que las Ca^{2+} -ATPasas, actuaría fundamentalmente durante el inicio de la relajación. Sin embargo, se ha encontrado que mantiene el eflujo a 100 nM de Ca^{2+} en el reposo, contribuyendo a regular el contenido del RS en algunas especies con “leak” (pérdida del RS al extracelular) y potenciación post-reposo como el conejo (Carafoli, 1985; Sutko y col., 1986; Bers, 2001). Clásicamente se ha afirmado que las mitocondrias no tendrían una participación importante en la regulación latido a latido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones fisiológicas normales, aunque sería un sitio de almacenaje en condiciones de sobrecarga de Ca^{2+} (Crompton, 1990). Sin embargo, recientemente

se ha descrito que las mitocondrias son capaces de acumular Ca^{2+} durante la estimulación (Wolska y Lewartovski, 1991), y de dar picos latido a latido (Leisey y col., 1993), que pueden preceder al transitorio citosólico (Maack y col., 2006) y son más o menos visibles dependiendo de la especie en estudio (Griffiths, 1999b; O'Rourke y Blatter, 2009).

Ca-ATPasas:

La SERCA es la principal proteína presente en la membrana del RS. De las tres isoformas descritas sólo SERCA2a ha sido detectada en el músculo cardíaco (Sperelakis, 2001). Esta proteína se encuentra localizada en la membrana del RS, tanto en la cisterna terminal como en los túbulos longitudinales. Esta ATPasa transporta dos iones de Ca^{2+} al lumen del RS por cada molécula de ATP hidrolizada (cambio entálpico de -40 kJ/mol de Ca^{2+}). La actividad de la SERCA es regulada por la proteína reguladora fosfolamban, que es un inhibidor endógeno que se encuentra inserto en la membrana del RS (Tada y col., 1983). El Ca^{2+} , Mg^{2+} , pH y ATP también regulan a la SERCA. Existen varios moduladores y un limitado grupo de agentes que son potentes inhibidores de la SERCA. Dentro de los inhibidores, la tapsigargina es el que presenta la máxima selectividad y afinidad, siendo esta última característica la que le da carácter irreversible a su inhibición (Thastrup y col., 1990; Sagara e Inesi, 1991; Davidson y Varhol, 1995).

La fosfolamban (PLN) se fosforila in vivo por la PKA, en su residuo serina 16 (Ser¹⁶) y por la Ca-MKII en el residuo treonina 17 (Thr¹⁷) (Mundiña-Weilenmann y col., 1996). La fosforilación libera la inhibición que ejerce la PLN desfosforilada sobre la SERCA2a, aumentando la afinidad de esta bomba por el Ca^{2+} y, como consecuencia, la recaptura de Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del RS acelerando la relajación miocárdica. Como consecuencia, la contractilidad resultará aumentada y acortada. El rol funcional de la PLN fue dilucidado a través del uso de animales transgénicos y modelos de ratones con ablación génica. El gen murino de la PLN fue eliminado por recombinación homóloga de células embrionarias madres o pluripotenciales (stem cells),

generándose ratones deficientes en PLN (PLNKO), que no se diferencian a nivel morfológico e histológico de los ratones silvestres controles (wild type, WT) (Luo y col., 1994). Estudios bioquímicos comprobaron que la afinidad de la SERCA2a por el Ca^{2+} estaba significativamente aumentada en los corazones PLNKO comparados con los WT. Estos hechos son compatibles con los descritos previamente en membranas ex vivo, acerca de la modulación funcional de la SERCA2a ejercida por la PLN. La ablación de la PLN se asoció con un significativo aumento de la contractilidad y la relajación, no sólo a nivel celular sino también a nivel del órgano y del animal intacto (Luo y col., 1994). Por otro lado, en animales con sobreexpresión de PLN, se observó una disminución en la afinidad de la SERCA2a por el Ca^{2+} y propiedades contráctiles opuestas a las de los PLNKO. Comparados con los controles WT, los miocitos de estos animales presentaban una menor contractilidad y una menor amplitud y velocidad de caída del transitorio de Ca^{2+} (Kadambi y col., 1996).

Los resultados obtenidos a través de la aplicación de la ingeniería genética revelaron no sólo el papel de la PLN en la regulación de la actividad de la SERCA2a, sino además la importancia de la relación estequiométrica entre PLN y SERCA2a, en la determinación de la contractilidad y la relajación miocárdicas. Esta relación puede estar alterada en distintas patologías y ser responsable de ciertas alteraciones de la contractilidad y relajación. Por otra parte, es de importancia la regulación de la interacción PLN/SERCA2a, y el hecho de que la fosforilación de la PLN se hace fundamentalmente a través del sistema β -adrenérgico que aumenta la velocidad de relajación y la contractilidad miocárdicas (Frank y Kranias, 2000). Los receptores adrenérgicos más importantes para el miocardio son el β_1 y β_2 , siendo el β_1 , 75-80 % del total (Ahlquist, 1948). En particular los receptores β inician una cascada de señales que comienza con la fijación del agonista al receptor, lo que provoca un cambio conformacional que activa a la proteína G estimuladora (Gs) a la que se acopla el receptor. La activación de la proteína Gs provoca la disociación de 2 subunidades, la subunidad fijadora de GTP (Gas), que estimula la enzima adenilatociclasa (AC) y el heterodímero

Gβγ, que también está involucrado en señales intracelulares (Dohlman y col, 1991). En el miocito cardíaco la estimulación de la AC causa la producción de AMP cíclico (AMPC) y la subsecuente activación de la PKA. A su vez PKA fosforila a nivel del RS a la PLN y el RyR2a, y además actúa en el sarcolema y las miofibrillas. La fosforilación de la PLN es el principal mecanismo fisiológico regulador de la retoma de Ca²⁺ por el RS, y es el principal mecanismo de los efectos lusitrópico positivo (acelerador de la relajación) e inotrópico positivo de los agonistas β adrenérgicos (McIvor y col., 1988; Mundiña-Weilenmann y col., 1996; Li y col., 2000; Said y col., 2002). La estimulación β adrenérgica fosforila a los canales de Ca²⁺ tipo L y el sitio Ser¹⁶ de PLN, produciendo el aumento del Ca²⁺ intracelular. El Ca²⁺ intracelular aumentado se une a la calmodulina y activa a la CAMKII, lo que determina la fosforilación del sitio Thr¹⁷ de PLN. Todas estas regulaciones contribuyen al efecto inotrópico y lusitrópico positivo de las catecolaminas.

A nivel sarcolemal existe otra Ca-ATPasa (conocida como PMCA) para la extrusión de Ca²⁺ del interior celular. A diferencia del NXC-SL esta bomba es un transportador activo primario que utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para remover Ca²⁺, con alta afinidad pero baja capacidad, contra su gradiente electroquímico. Su estequiometría es de 1 Ca²⁺, por ATP, por lo que disipa -80 kJ/mol de Ca²⁺ removido del citosol. En su estado de reposo la bomba se encuentra auto-inhibida, una vez que la concentración de Ca²⁺ se eleva, este ión se une a la proteína calmodulina, y el complejo interactúa con PMCA activando a la bomba (Strehler y col., 2007). No han sido descriptos inhibidores específicos, si bien ciertos análogos de fluoresceína pueden inhibirla potentemente (Gatto y Milanick, 1993). Su baja velocidad de transporte hace que en la mayoría de las especies esta bomba no contribuya substancialmente a la remoción de Ca²⁺ durante la relajación miocárdica. Esto llevó a la postulación de roles fisiológicos alternativos para la presencia de esta proteína en

células cardíacas: modulación del crecimiento celular (Bers, 2001) y apoptosis (Henaff y col., 2002).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal:

El NXC-SL es un transportador activo secundario que utiliza la energía almacenada en el gradiente de Na^+ generado por la Na^+,K^+ -ATPasa para intercambiar tres Na^+ por un Ca^{2+} . Al estar acoplado al gradiente de la bomba de Na^+ su estequiometría es de 1 Ca^{2+} por ATP y disipa -80 kJ/mol de Ca^{2+} . Está presente en la mayoría de las células, y existen tres isoformas descritas en mamíferos (NCX1, NCX2 y NCX3). Si bien su importancia funcional varía en cada tipo celular sus propiedades son muy similares (Sperelakis, 2001). El intercambiador que se expresa en células cardíacas (NCX1) tiene alta capacidad (flujo máximo), por lo que aún con una baja afinidad es aceptado como el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} de la célula. Ha sido demostrado que el intercambiador remueve la misma cantidad de Ca^{2+} que ingresó a la célula por los canales de Ca^{2+} (Bridge y col., 1981).

Dos formas de regulación iónica han sido descritas hasta el momento: inactivación en modo directo por altas concentraciones de Na^+ intracelular (Collins y col., 1992; Hilgemann y Collins, 1992; Hilgemann y col., 1992a; Hilgemann y col., 1992b; Matsuoka y Hilgemann, 1992) y activación en ambos modos por concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} citoplasmático. El intercambiador es también regulado por otros mecanismos, siendo los principales la estimulación β adrenérgica, los niveles de ATP, y el pH. (Sperelakis, 2001).

Lo activan los fosfolípidos ácidos y lo inhiben los catiónicos (Philipson, 1984) mientras el bajo pH lo inhibe. Si bien no está bien establecido el rol en condiciones patológicas, la caída del pH durante la isquemia cardíaca reducirían en funcionamiento del NXC-SL, contribuyendo a la sobrecarga de Ca^{2+} de la isquemia/reperfusión (Bers, 2001). Aunque podría ser fosforilado por la PKC, esto no altera significativamente su función. Si bien puede ser inhibido por varias drogas

(clorpromazina, tetracaína, verapamilo, bepridilo) y cationes ($\text{La}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} = \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$), ninguna de ellos es selectivo (Bers, 2001), Entre las drogas los mas afines son KB-R7943 cuya K_i es de $0.3 \mu\text{M}$ para modo *outward* y $17 \mu\text{M}$ para modo *inward*, y diclorobenzamilo (K_i 4-17 μM) (Bers, 2001).

1.e Transporte de Ca^{2+} mitocondrial:

Es sabido que las mitocondrias se encargan de proveer energía al miocardio mediante la síntesis de adenosina trifosfato (ATP). Aunque durante mucho tiempo se consideró a las mitocondrias incapaces de participar en la movilización de Ca^{2+} durante la contracción por tener transportadores de muy baja afinidad con $K_{0.5}$ de 15-30 mM (Crompton, 1990; Bassani y col., 1994), actualmente se discute si los flujos de Ca^{2+} mitocondriales son cuantitativamente importantes en el acoplamiento excito-contráctil.

La $[\text{Ca}^{2+}]_m$ es importante en la regulación del metabolismo mitocondrial, varios autores han demostrado que sus pequeños cambios colaboran en la regulación de la producción de energía mitocondrial (Bers, 2001; O'Rourke y Blatter, 2009). Se conoce desde hace tiempo la regulación dependiente de Ca^{2+} de algunas de las enzimas claves en el ciclo de los ácido tricarbóxicos (Linn y col., 1969a; Linn y col., 1969b). Se ha demostrado que la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa sobre el α -cetoglutarato aumenta en presencia de Ca^{2+} sin cambios en V_{max} (Rutter y Denton, 1988). El Ca^{2+} puede incrementar indirectamente la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa hasta 100 veces interactuando con ATP, ADP, NADH y Pi (Lawlis y Roche, 1981). También el Ca^{2+} puede aumentar la afinidad de la isocitrato deshidrogenasa por el isocitrato (Denton y col., 1978).

Adicionalmente se ha observado sensibilidad al Ca^{2+} en otras enzimas y transportadores no relacionados con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Por ejemplo son sensibles a la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ la fosfatasa (enzima que cataliza la conversión de una molécula de pirofosfato a 2 iones fosfato), y la

NO sintasa (cataliza la producción de NO a partir de L-arginina) (Ghafourifar y Richter, 1997; Davidson y Halestrap, 1989). Mientras que la activación dependiente de $[Ca^{2+}]_m$ de la fosfopiruvato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa ha sido establecida desde hace varios años, investigaciones más recientes han revelado sensibilidad a la $[Ca^{2+}]_m$ de las proteínas y complejos asociados a la cadena de transporte de electrones. El flujo de electrones a través de ubiquinona y el complejo III es sensible a la $[Ca^{2+}]_m$ (Murphy y col., 1990). En un trabajo aún más reciente Glancy y col. (2013) demostraron sensibilidad a la $[Ca^{2+}]_m$ en las 3 bombas de H^+ de la cadena de transporte electrónico. También se ha sugerido que la $[Ca^{2+}]_m$ es un potente regulador de la F1F0ATP-sintasa (complejo IV) (Harris y Das, 1991).

Con diversas metodologías y herramientas, se ha demostrado en cardiomiocitos y en mitocondrias aisladas que se producen oscilaciones del Ca^{2+} mitocondrial que acompañan con menor amplitud a los transitorios citosólicos (Miyata y col., 1991; Griffiths y col., 1997; Maack y col. 2006). Esto sugiere que las mitocondrias participan activamente en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} en el ciclo fisiológico, y que se pueden desencadenar alteraciones de estos mecanismos de homeostasis en los procesos patológicos especialmente de deficiencia de oxígeno (Griffiths, 2009). Diversos transportadores mitocondriales son los encargados de la transmisión de los cambios de Ca^{2+} citosólicos hacia la mitocondria (Gunter y col., 1994; Sadek y col., 2003). Las $[Ca^{2+}]_m$ son controladas por mecanismos de captación de Ca^{2+} de baja afinidad y mecanismos que lo extruyen, con el costo de un ciclo fútil de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial (Gunter y col, 1994; Sadek y col., 2003; Murgia y col., 2009). Por otra parte, se ha discutido bastante acerca de la cinética de captación de Ca^{2+} mitocondrial, que está muy influenciada por la metodología utilizada, y de su rol en el metabolismo energético del miocardio (O'Rourke y Blatter, 2009). En esta función están involucrados diversos mecanismos mitocondriales que regulan la $[Ca^{2+}]_m$ y su liberación al citosol (Bernardi, 1999). La principal vía para el transporte de Ca^{2+} mitocondrial en el corazón está formada por el uniporter de Ca^{2+} (UCam) para el influjo y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial (NXCam)

para el eflujo, aunque existen otros transportadores con menor participación. Los transportadores de Ca^{2+} mitocondriales son descritos a continuación y los principales se muestran esquemáticamente en la Fig. 2.

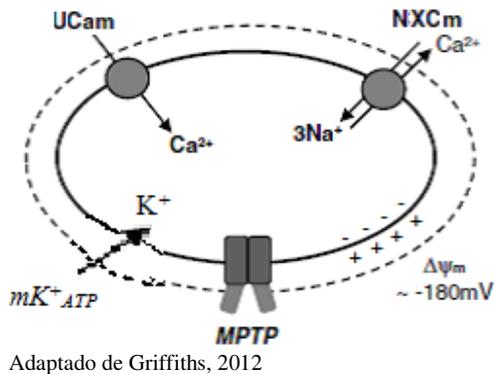


Fig. 2: Esquema de los principales mecanismos reguladores de la homeostasis de Ca^{2+} . (UCam: uniporter de Ca^{2+} mitocondrial; NXCam: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial; mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; mK^+_{ATP} : canal de K^+ mitocondrial dependiente de ATP).

Uniporter de Ca (UCam):

En las células excitables la vía principal de entrada de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial es el UCam. Este es un canal iónico que posee alta selectividad y baja afinidad ($K_{0.5} = 15\text{-}30 \mu\text{M}$) pero alta capacidad para transportar Ca^{2+} , el cual muestra una cinética de segundo orden con dos sitios de unión: uno de activación y un sitio de transporte (Gunter y col., 2000). En una suspensión de mitocondrias aisladas reportaron una $K_{0.5}$ de $10\text{-}20 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} para el UCam (Griffiths, 2009; O'Rourke y Blatter, 2009). Esta afinidad indica que las mitocondrias pueden captar Ca^{2+} a semimáxima velocidad en el pico del transitorio de Ca^{2+} .

Los gradientes de protones y eléctrico (fuerza protón-motriz, $\Delta\Psi_m$) son creados por el transporte de protones a través de la membrana mediante los complejos I, III y IV. Estos complejos son parte de la cadena de transporte de electrones que consume energía metabólica (y oxígeno) para mantener una diferencia de potencial ($\Delta\Psi_m = -180 \text{ mV}$) que es necesaria para la síntesis de ATP por la F1,F0-ATP-sintasa (complejo V). Esta actividad metabólica implica reacciones exotérmicas, tal

que existe una relación entre el consumo de oxígeno y el equivalente calórico, de 477 kJ/mol de oxígeno (Curtin y Woledge, 1978). Adicionalmente, este potencial de membrana negativo crea un gradiente eléctrico que permite la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través del UCam. El ingreso de Ca^{2+} disipa el $\Delta\Psi_m$ y por lo tanto se incrementa el consumo de oxígeno para mantener el gradiente.

Las mitocondrias localizadas próximas a los canales de liberación de calcio del RS (RyR) están expuestas a concentraciones mucho mayores de Ca^{2+} que las mitocondrias localizadas en otros lugares del citosol (Rizzuto y col., 1992; Rutter y Rizzuto, 2000). En estas regiones se han estimado altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico, de 20 a 50 μM (Pacher y col., 2000; Sharma y col., 2000). Estos datos desestiman el problema de la baja afinidad del UCam por el Ca^{2+} encontrado en mitocondrias aisladas, y refuerzan el concepto de que las mitocondrias responden a cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica.

El UCam tiene como función secuestrar Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior mitocondrial utilizando el gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) sin estar acompañado por otro ión y sin la necesidad de hidrólisis de ATP (Gunter y col., 2000; Graier y col., 2007). La velocidad máxima de transporte del UCam es de 10 nmol Ca^{2+} mg^{-1} de proteína mitocondrial s^{-1} . Esta velocidad de captación puede fluctuar dependiendo de las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y $[\text{Mg}^{2+}]_i$ (Carafoli, 1985; Crompton, 1990). Muestra un valor umbral cercano a cero a concentraciones de Ca^{2+} extramitocondrial menor a 200 o 300 nM, nivel que es 2 a 3 veces más alto que el promedio del Ca^{2+} citosólico en reposo (Crompton, 1999; Gunter y col., 2000; Graier y col., 2007). Esto sugiere que el UCam no captaría durante el reposo. Sin embargo, según algunos autores, durante el ciclo cardíaco debe haber microentornos de Ca^{2+} alto en la cercanía mitocondrial regulando la captación, especialmente dados por la colocalización con el RS (O'Rourke y Blatter, 2009). Según otros, el UCam solo secuestra Ca^{2+} cuando el Ca^{2+} citosólico aumenta mucho, tal como ocurre en situaciones patológicas, en las que el rol del uniporter podría ser acumular Ca^{2+} en el interior mitocondrial, el cual induciría la apertura del mPTP y la apoptosis celular (Gunter y col., 2000).

La probabilidad de apertura del UCam es regulada por diversas proteínas entre las que se encuentran MICU1 (Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1), MICU2 (Mitochondrial Ca²⁺ uptake 2), MCUR1 (Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Regulator 1), SLC25A23, y EMRE (Essential MCU Regulator) (ver fig. 3) (Perocchi y col., 2010; Mallilankaraman y col., 2012; Csordás y col., 2013; Hoffman y col., 2013; Plovanich y col., 2013; Sancak y col., 2013; Foskett y Madesh, 2014; Hoffman y col., 2014; Kamer y col., 2014; Kovács-Bogdán y col., 2014; Logan y col., 2014; Patron y col., 2014).

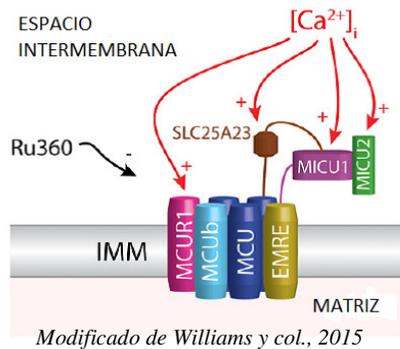


Fig. 3: Esquema que muestra 4 componentes transmembrana mitocondrial que regulan el UCam, y los reguladores presentes en el espacio intermembrana. MICU1 (Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1), MICU2 (Mitochondrial Ca²⁺ uptake 2), MCUR1 (Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Regulator 1), SLC25A23, y EMRE (Essential MCU Regulator).

El MICU1 limita la entrada de Ca²⁺ cuando se encuentra en sus niveles basales pero activa la captación mitocondrial de Ca²⁺ cuando la [Ca²⁺]_i es elevada, mientras que MICU2 parece actuar predominantemente como un inhibidor del UCam (Williams y col., 2015).

El uniporter es activado a bajas [Ca²⁺]_i por concentraciones fisiológicas de poliaminas, es modulado por nucleótidos de adenina e inhibido completamente por el catión hexavalente rojo de rutenio (RR) y más selectivamente por su derivado complejo de amina dinuclear con puente de oxígeno (Ru-360) (Gunter y col., 2000; Griffiths, 2009). El Ru-360 permea lentamente al interior de la célula e inhibe específicamente la captación de Ca²⁺ mitocondrial en cardiomiocitos y en corazones aislados con Ki de 0.9 μM (García Rivas y col., 2006). Además se ha demostrado que mejora la recuperación contráctil de corazones reperfundidos de rata después de un período de isquemia, lo cual fue relacionado con una brusca disminución en la [Ca²⁺]_m y con la parcial inhibición del UCam (García Rivas y col., 2005). Este efecto protector del Ru-360 frente a la injuria por reperfusión exhibió un mecanismo dosis-dependiente. A concentración de 250 nM de Ru-360 promovió la

máxima recuperación mecánica de los corazones isquémicos, efecto que se mantuvo hasta 1 μM . En cambio, a concentraciones mayores de 1 μM la recuperación decreció drásticamente, efecto que fue adjudicado posiblemente a alteraciones en la actividad contráctil (García Rivas y col., 2005). Los autores demostraron que en un modelo de ratas in vivo Ru-360 disminuyó la incidencia de arritmias, mantuvo la integridad mitocondrial y atenuó la disfunción hemodinámica producida por reperfusión (García Rivas y col., 2006).

Modo rápido de captación de Ca^{2+} mitocondrial (Ram):

La captación de Ca^{2+} mitocondrial también puede producirse por vías alternativas con propiedades diferentes al UCam. El Ram o “rapide uptake mode” es una de ellas (Graier y col., 2007). Por esta vía se transfiere Ca^{2+} hacia el interior mitocondrial durante pulsos fugaces (Bers, 2001). Este transporte conduce con alta velocidad al comienzo del pulso de Ca^{2+} y con baja velocidad cuando el Ca^{2+} disminuye (Murgia y col., 2009). La velocidad de captación mitocondrial de Ca^{2+} por el Ram es 100 veces superior a la del uniporter (Gunter y col., 2000; Graier y col., 2007). El Ram es menos sensible al bloqueo por RR que el UCam (Gunter y col., 2004; Murgia y col., 2009).

El funcionamiento del Ram se interrumpe cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ previa al pulso excede los 150-160 nM. Esto sugiere que la captación de Ca^{2+} por el modo rápido es inhibida por la unión de Ca^{2+} a sitios de unión externos con alta afinidad en ese rango (Gunter y col., 2004). Esto nos lleva a pensar que el Ram tendría una función más importante en el reposo diastólico, mientras el UCam participaría más durante los pulsos de liberación y transitorios de Ca^{2+} o en situaciones de alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como la reperfusión.

Receptores de rianodina mitocondriales (mRyR):

Los receptores de rianodina mitocondriales (mRyR) se localizan en la membrana interna y contribuyen a la captación de Ca^{2+} desde el citosol a la mitocondria con alta afinidad ($K_m = 1 \mu\text{M}$)

(Beutner y col., 2001; Graier y col., 2007). El mRyR en mitocondrias cardíacas exhibe propiedades bioquímicas, farmacológicas y funcionales similares a los receptores de RyR en el RS del músculo esquelético (Beutner y col., 2005).

Farmacológicamente, el mRyR ha sido caracterizado como RyR tipo 1 (Beutner y col., 2001). El mRyR constituye un mecanismo de transporte mitocondrial que tiene la capacidad de secuestrar Ca^{2+} disparado por las oscilaciones de las $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólicas durante el latido del corazón (Beutner y col., 2005). Este influjo de Ca^{2+} vía el mRyR1, tiene como consecuencia la activación de las enzimas del ciclo de Krebs y por ende incrementa la generación de ATP al estimular la fosforilación oxidativa (Beutner y col., 2005). El Mg^{2+} inhibe el mRyR bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, en presencia de ATP u otro nucleótido de adenina la permeabilidad del Ca^{2+} a través del mRyR está incrementada aún en presencia de concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} . Esto es explicado por la formación de un complejo entre el Mg^{2+} y ATP en el espacio intermembranoso de forma tal que el secuestro del Mg^{2+} previene la inhibición completa del mRyR (Beutner y col., 2005).

En conclusión, el mRyR funcionaría como un traductor de señales de Ca^{2+} citoplasmáticas en la mitocondria para regular la generación de energía por parte de esta organela (Beutner y col., 2005).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NXCm):

El NXCm es el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} de la matriz mitocondrial en células excitables como las del corazón. La función principal del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NXCm) es mantener los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ bajos por extrusión de 1 Ca^{2+} desde el interior mitocondrial en intercambio con 3 iones Na^+ , según la estequiometría más aceptada, lo cual lo convierte en electrogénico. Como el UCam, este intercambiador se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial (Crompton, 1990; Cox y Matlib, 1993a; Gunter y col., 1994).

La cinética del NXCm en mitocondrias cardíacas ha sido descrita como de primer orden para el Ca^{2+} y de segundo o tercer orden para el Na^+ . El $K_{0.5}$ para el Ca^{2+} intramitocondrial es aproximadamente de 8-10 nmoles/mg de proteína y para el Na^+ externo de aproximadamente 9-10 mM (Gunter y col, 2000). Esto sugiere que está funcionando cerca de un 50% de su V_{max} en la célula especialmente en el corazón de rata, ya que la $[\text{Na}^+]_i$ es cercana al $K_{0.5}$.

Según la estequiometría de 3 Na^+ : Ca^{2+} el NXCm transporta una carga positiva en exceso al interior de la matriz mitocondrial, por lo que la relativa despolarización que disipa el $\Delta\Psi_m$ debe ser compensada por mayor actividad de la cadena respiratoria (Gunter y Gunter, 2001; Saris y Carafoli, 2005; Murgia y col., 2009). Por lo tanto, tanto el movimiento de Ca^{2+} de captación (UCam) como el de extrusión mitocondrial (NXCm) consumen energía metabólica y consecuentemente liberan calor.

Bajo condiciones fisiológicas, la misma cantidad de Ca^{2+} que entra a la mitocondria durante cada transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debe ser removido por el NXCm. Por lo tanto cualquier perturbación en la $[\text{Na}^+]_i$ va a influir en la actividad del NXCm y por lo tanto en el flujo de Ca^{2+} . De esta forma si aumenta $[\text{Na}^+]_i$ va a aumentar la actividad de NXCm y disminuirá la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (Maak y col., 2006; Liu y O'Rourke., 2008). El Na^+ que entra a la matriz mitocondrial a través del NCXm es removido luego hacia el citosol por el intercambiador Na^+/H^+ (Mitchell y Moyle., 1967; Krulwich T., 1983).

Existen muchas sustancias inhibitoras del NXCm incluyendo trifluorperazina, diltiazem, verapamil, clonazepam, la benzotiazepina CGP37157, amilorida y sus derivados, pero muchos de ellos no son selectivos (Gunter y col., 2000). Las ventajas son para el bloqueo del NXCm por benzodiazepinas como clonazepam o benzotiazepinas como CGP-37157 porque no afectan la captación de Ca^{2+} mitocondrial por el UCam, el NXC-SL, ni el funcionamiento de la SERCA (Cox y col., 1993). El diltiazem, clonazepam y CGP-37157 se utilizaron como inhibidores efectivos del NXCm en mitocondrias aisladas con valores de IC_{50} de 8, 7 y 0.4 μM respectivamente (Matlib y col., 1985; Cox y Matlib, 1993b; Griffiths, 2009). En células cardíacas intactas, el diltiazem inhibe

los canales de Ca^{2+} tipo L (LCC), mientras que el clonazepam o el CGP37157 no lo hacen, mostrando así selectividad por el NXCm (Matlib y col., 1985; Matlib y col., 1993; Griffiths, 2009). El clonazepam inhibió la actividad del NXCm aumentando entonces la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, estimuló la actividad de las dehidrogenasas sensibles al calcio, e incrementó la síntesis de ATP y NADH por estimulación del ciclo de Krebs (Cox y Matlib, 1993b). Además, no mostró efecto sobre la contracción celular o los transitorios de Ca^{2+} citosólicos aún a concentraciones mayores de $100 \mu\text{M}$ (Griffiths, 2009). Por otro lado, el clonazepam previno la sobrecarga de Ca^{2+} medida en cardiomiocitos de rata sometidos a períodos de hipoxia – reoxigenación. Dado que la inhibición del UCam (y de la SERCA) por rojo de rutenio (RR) no evitó esta sobrecarga y que esta vía de influjo fue Na^+ -dependiente, los autores sugirieron que el influjo de Ca^{2+} mitocondrial durante estas condiciones ocurriría vía el NXCm en modo reverso, provocada por los cambios iónicos y eléctricos del período de hipoxia-reoxigenación (Griffiths y col, 1998; Griffiths, 1999a).

Poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP):

Otra de las vías de eflujo de Ca^{2+} de la mitocondria cardíaca es el poro de transición de permeabilidad (mPTP). Altos niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ pueden causar *swelling* o hinchazón mitocondrial que llevaría a la disfunción cardíaca. Este proceso fue atribuido a una permeabilidad transitoria mitocondrial y se conoce como un proceso común que contribuye o conduce a la muerte celular (Lemaster y col., 1998). Esto es causado por un poro que atraviesa ambas membranas mitocondriales llamado “poro de transición de permeabilidad mitocondrial” (mPTP). Durante varios años se creyó que el mPTP consiste de un canal aniónico voltaje-dependiente sobre la membrana mitocondrial externa y una ATP/ADP translocasa sobre la membrana mitocondrial interna (Baines, 2009). Sin embargo, Kokoszka y col. (2004) demostraron que en mitocondrias de ratón carentes de ATP/ADP translocasa también se genera apertura del mPTP. Más recientemente Alavian y col. (2014) evidenciaron que el mPTP está formado por una F_1F_0 ATP-sintasa, más específicamente la

subunidad C. Estos autores demostraron que esta unidad tiene la capacidad de formar poros luego de ser purificada y reconstituida en una bicapa lipídica. El mPTP es conocido por mediar cambios letales en la permeabilidad de las membranas mitocondriales conduciendo a la mitocondria a la muerte en situaciones patológicas tales como las que ocurren durante la I/R (Halestrap y col., 2002).

El mPTP es un canal de alta conductancia que permite el pasaje de cualquier molécula de peso molecular menor a 1500 KDa bajo determinadas condiciones celulares (Bernardi, 1999, Halestrap y col., 2002; Halestrap y Brenner, 2003). La ciclofilina D es un regulador que sensibiliza el poro para generar su apertura a ciertas $[Ca^{2+}]_m$ y también es el sitio con el que interactúa la ciclosporina A (Elrod y Molkenin, 2013). La proteína quinasa C (PKC) también podría jugar un rol importante en la formación estructural del poro dado que fosforila los canales iónicos dependientes de voltaje en el complejo del poro previo a su apertura (Baines y col., 2003).

Debido a que el mPTP permite el pasaje rápido de protones, su apertura se acompaña de despolarización mitocondrial, lo cual trae como consecuencia el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Halestrap y col, 2002), con el consiguiente aumento en el consumo de oxígeno y una alta liberación de calor. Además, el equilibrio de los pequeños solutos a través de la membrana interna mitocondrial concentra las proteínas en la matriz ejerciendo una presión coloidal osmótica responsable del hinchamiento mitocondrial (Di Lisa y Bernardi, 2009). En respuesta a estos cambios puede ocurrir la ruptura de la membrana externa mitocondrial causando la pérdida del citocromo c y de otras proteínas que estimulan la apoptosis celular. Por lo cual, una apertura prolongada del mPTP parece ser incompatible con la supervivencia celular (Halestrap y col, 2002; Halestrap y Brenner, 2003; Di Lisa y Bernardi, 2009).

La transición apertura-cierre del poro es altamente regulada por múltiples factores (Bernardi, 1999). La apertura del mPTP sólo ocurre bajo ciertas condiciones patológicas, como por ejemplo aquellas a las que se somete al corazón durante la reperfusión pos-isquémica. Entre estas condiciones se encuentran el aumento de $[Ca^{2+}]_m$, el stress oxidativo, la depleción de nucleótidos

de adenina, el aumento de las concentraciones de fosfatos y la caída del $\Delta\Psi_m$ (Bernardi, 1999; Crompton, 1999; Di Lisa y Bernardi, 2009). Muchos autores demostraron que el mPTP permanece extensamente cerrado durante la isquemia pero que se abre durante la reperfusión, período en el cual ocurre mayormente la muerte celular (Halestrap y col., 1998; Crompton, 1999).

El primer disparador de la apertura del mPTP es la $[Ca^{2+}]_m$ en la matriz (Halestrap y col., 2002). En estudios *ex vivo* se ha mostrado que el poro se abre cuando se adiciona Ca^{2+} y se cierra rápidamente cuando se quela este catión. De todos modos, la $[Ca^{2+}]_m$ necesaria para lograr la apertura del poro depende de las condiciones prevalentes (ADP; pH, stress oxidativo, entre otras). Por otro lado, la apertura del mPTP *in vivo* durante la I/R sería mediada más por el stress oxidativo que por un incremento en la $[Ca^{2+}]_m$ (Di Lisa y col., 2007).

A partir del estudio funcional del poro se encontró la existencia de sitios adicionales de unión a cationes divalentes sobre la superficie externa de la membrana interna mitocondrial que inhiben la apertura del mPTP. De esta forma la apertura del poro puede ser inhibida por cationes bivalentes como Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} y Mg^{2+} (Halestrap y col., 2002). El Mg^{2+} inhibe la apertura del mPTP con una K_i de aproximadamente 0.3 mM, que es menor a la $[Mg^{2+}]$ citosólico (de 1 a 4 mM). Por otra parte, durante la apertura del mPTP y su consecuente despolarización podría incrementarse la concentración libre de Mg^{2+} . Dado que el ATP se une más firmemente al Mg^{2+} que el ADP, este aumento de la $[Mg^{2+}]$ favorecería la hidrólisis de ATP oponiéndose a los efectos estimulantes debidos a la despolarización (Halestrap, 2009). Además, los fosfatos inorgánicos son un poderoso inductor del mPTP cuyo efecto puede ser sólo parcialmente explicado por actuar como buffer de la matriz. Por otro lado, análogos de ubiquinonas pueden actuar ya sea como activadores o inhibidores del poro (Crompton, 1999; Halestrap y col., 2002).

El mPTP puede inhibirse por la caída del pH de la matriz a valores menores de 7 debido a que los H^+ compiten con el Ca^{2+} por su unión al sitio disparador de la apertura (Di Lisa y col., 2007). Un ejemplo de esto es la inhibición de la apertura del mPTP durante la isquemia global (Griffiths y

Halestrap, 1995). Durante el cese de perfusión hacia el tejido cardíaco ocurre una caída del pH intracelular (por ejemplo, desde 7,1 a 6,5 en 20 minutos de isquemia en corazones de rata, según Murphy y col. (1991) como consecuencia de la alta producción de ácido láctico. Esta disminución en el pH inhibe la apertura del mPTP. En cambio, cuando se reperfunde el tejido cardíaco, la mitocondria restaura su metabolismo aeróbico generando el $\Delta\Psi_m$ necesario para la síntesis de ATP, y luego de unos minutos de reperfusión restaura el pH. Simultáneamente ocurre una sobrecarga de Ca^{2+} y un rápido aumento de ROS (Silverman y Stem, 1994; Halestrap y col., 2004). Estas condiciones en su conjunto crean un ambiente propicio para la apertura del mPTP en la reperfusión (Halestrap y col., 2004).

El antipsicótico trifluorperazina también actúa como inhibidor del mPTP, ya que cambia la sensibilidad del poro al voltaje y por lo tanto es efectivo solo bajo condiciones de mitocondrias energizadas. Este agente probablemente actúe por inhibir el flujo de electrones hacia el complejo I de la cadena respiratoria y también por inhibir tanto la adenina-nucleótido translocasa (ANT) como el transportador de fosfato mitocondrial (PiC), ambos involucrados en la formación del mPTP (Halestrap, 2009)

El más destacado y potente inhibidor de la apertura del mPTP es ciclosporina A (Cys-A). Esta droga es ampliamente utilizada en farmacología por sus propiedades inmunosupresoras disparadas por su unión a calcineurina en los linfocitos T. La interacción de esta sustancia con el mPTP se describe mejor como una desensibilización en lugar de una inhibición. Este concepto también es válido para los otros “inhibidores” tales como salgifehrin A y NIM811 (Di Lisa y col., 2007). El efecto resulta selectivo a la concentración de 0.2 μM de Cys-A (Griffiths y Halestrap, 1993). Sin embargo, en el rango de 1-10 μM la Cys-A tiene un efecto adicional sobre la homeostasis del Ca^{2+} en la mitocondria que no puede ser atribuido a la inhibición del mPTP. La Cys-A con una IC_{50} alrededor de 1 μM inhibe la entrada de Ca^{2+} mediante el uniporter de Ca^{2+} mitocondrial (UCam) por un mecanismo independiente de la inhibición del mPTP o de la unión a calcineurina. Este efecto

puede contribuir a reducir la despolarización y la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria y entonces cooperaría con la inhibición directa del mPTP para prevenir la apoptosis celular (Montero y col., 2004).

Estudios *in vivo* y *ex vivo* han mostrado que la inhibición farmacológica directa de la apertura del mPTP con Cys-A disminuye la pérdida de miocitos y previene la disfunción contráctil que ocurre tanto durante la I/R como en otras patologías cardíacas (Di Lisa y col., 2007; Baines, 2009). Al respecto, muchos autores nombran al mPTP como un blanco crucial para la cardioprotección especialmente frente a isquemias prolongadas (Di Lisa y Bernardi, 2009).

Estos antecedentes sugieren que el mPTP funcionaría en corazones normales como una válvula liberadora de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ que limita la acumulación de Ca^{2+} excesiva en la matriz mitocondrial.

1.f Transporte de K^+ mitocondrial:

Al igual que ocurre con el Ca^{2+} existen vías de ingreso y salida de K^+ a la mitocondria. La eyección de protones mediada por la cadena transportadora de electrones genera un potencial en la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) que oficia de fuerza impulsora para el influjo de K^+ tanto por difusión (leak) como por canales de K^+ . Esta entrada de K^+ va acompañada de agua. El exceso de K^+ es eyectado fuera de la matriz mitocondrial por medio del antiporter K^+/H^+ (Garlid y Paucek, 2003). De esta manera se genera un ciclo mitocondrial del K^+ que consiste en vías de influjo y eflujo para el K^+ , H^+ y otros aniones (Garlid y Paucek, 2003). Este ciclo tiene por objetivos: regular el volumen de la matriz mitocondrial para prevenir el excesivo hinchamiento o la excesiva contracción de la misma y regular la producción de ROS (Garlid y Paucek, 2003).

Costa y col. (2006) han descripto que en las mitocondrias respirando tanto *in vivo* como *ex vivo*, el ciclo del K^+ está constituido por dos vías de influjo de K^+ a la matriz: una de difusión (o “leak”) de influjo electroforético de K^+ (impulsado por el eflujo electrogénico de H^+ de la cadena de transporte electrónico), y otra de influjo de K^+ a través de los canales de K^+ dependientes de ATP

(mKATP). Ambos influjos están balanceados por el eflujo de K^+ vía el antiporter K^+/H^+ . Dado que el movimiento de H^+ está casi equilibrado por el transportador de fosfato, no hay neto cambio del pH ni movimiento neto de fosfato en el estado estacionario del ciclo de K^+ . El aumento del influjo de K^+ a las mitocondrias por apertura del mKATP o por el tratamiento con el ionóforo de K^+ valinomicina resulta en un desbalance entre el influjo y el eflujo de K^+ , con el resultado de una reducción de la captación de H^+ por el antiporter. Esto provoca un incremento del pH de la matriz, con la consecuente captación neta de ácido fosfórico. Esta captación neta de sales conduce osmóticamente al hinchamiento de la matriz (“swelling”). La alcalinización de la matriz incrementa la actividad del antiporter K^+/H^+ , ya que éste tiene una inhibición alostérica por H^+ , hasta que se alcanza un nuevo estado estacionario (Costa y col., 2006).

Se han caracterizado farmacológicamente y funcionalmente 3 clases de canales de K^+ mitocondriales los cuales son similares a algunos de los canales de K^+ de la membrana plasmática. El canal de K^+ regulado por ATP (mK_{ATP}), el canal de K^+ activado por Ca^{2+} (mBKCa) y el canal de K^+ voltaje dependiente (mK_V). Tanto el mK_{ATP}, como el mBKCa están involucrados en la regulación del potencial de membrana mitocondrial, la producción de ROS, la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y la fosforilación oxidativa (Graier y col., 2007).

En particular, la apertura de los canales mK_{ATP} ha sido asociada con la disminución del tamaño del infarto y el mejoramiento de la recuperación contráctil post-isquémica, además de estar implicados en el proceso de preconditionamiento cardíaco (Grover y col., 1997).

A continuación se describen los diferentes canales de K^+ mitocondriales

Canal de K^+ mitocondrial dependiente de ATP (mKATP):

Los mK_{ATP} son canales que permiten la entrada de K^+ , y en presencia de Mg^{2+} son bloqueados tanto por ATP como por ADP, pero no por GDP. (Liu y col., 1998; Misra y col., 2009). Estos canales tienen baja capacidad y una composición diferente de los KATP sarcolemales (Misra y col.,

2009). En ausencia de ATP ocurre la apertura de los mK_{ATP} y con esto se incrementa la conductancia del K^+ . De ese modo frente a una reducción energética celular se mantiene el volumen de la matriz mitocondrial, el volumen del espacio intermembranoso y disminuye la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial al ATP y al ADP (Paucek y col., 1992; Costa y col., 2006).

Estos canales son activados por diazóxido, cromokalin y pinacidil por lo cual se los conoce como “abridores de los canales mK_{ATP} “. El diazóxido en particular es 2000 veces más potente para activar el canal mitocondrial que el sarcolemal en miocitos cardíacos (Liu y col., 1998; Garlid, 2000).

Los canales K_{ATP} son bloqueados por sustancias como la glibenclamida o el 5-hidroxicanoato (5-HD), siendo sólo el 5-HD selectivo por el mK_{ATP} (Garlid y col., 1997; Murata y col., 2001). Además, fisiológicamente los mK_{ATP} pueden ser inhibidos por ésteres de Acil CoA de cadena larga, y no son inhibidos por tetraetilamonio (TEA) que bloquea a otros canales de K^+ (Paucek y col., 1992; Liu y col., 1998; Hanley y Daut, 2005).

El diazóxido (agonista del mK_{ATP}) se comportó como protector del daño observado en el corazón por modelos de I/R (Iwai y col., 2000; Carreira y col., 2005). Esta protección fue revertida en todos los casos por glibenclamida y por 5-HD. Dado que tanto el diazóxido como el 5-HD son selectivos por los mK_{ATP} el efecto cardioprotector fue adjudicado a la apertura de estos canales. (Liu y col., 1998; Bernardi, 1999). Además de sus efectos sobre el mK_{ATP} , tanto el diazóxido como el 5-HD tienen efectos sobre el metabolismo mitocondrial (Hanley y col., 2002; Hanley y Daut, 2005). Mientras que el diazóxido inhibe la cadena transportadora de electrones por inhibir a la succinato deshidrogenasa; el 5-HD actúa de sustrato para la acil-CoA-sintetasa produciendo de esta manera 5-HD-CoA (Hanley y col., 2002). El 5-HD-CoA formado puede servir como sustrato para la Acil-CoA deshidrogenasa o posiblemente inhibir esta enzima interfiriendo así en la β -oxidación (Hanley y col., 2002; Hanley y col., 2003).

La apertura o el cierre de los canales mK_{ATP} causan importantes cambios en el volumen de la matriz mitocondrial, de forma secundaria a la entrada obligada de agua que acompaña el flujo neto de K^+ y aniones (Kowaltowski y col., 2001). En mitocondrias aisladas de rata cargadas con un indicador fluorescente de K^+ en la matriz Costa y col (2006) mostraron que el influjo de K^+ fue aumentado por diazóxido e inhibido por ATP y 5-HD, además de que tanto diazóxido como valinomicina (ionóforo de K^+ desacoplante) causaron alcalinización de la matriz e hinchamiento o “swelling”. El hecho de que el mK_{ATP} regula el volumen mitocondrial bajo condiciones fisiológicas sugiere que este podría tener una función importante en la I/R (Liu y col., 2010). Durante la isquemia, la matriz se contrae debido a la reducción de su $\Delta\Psi_m$, lo cual causa recíproca expansión del espacio intermembrana, y resulta en aumentada permeabilidad de la membrana externa al ADP y ATP, y promueve la rápida hidrólisis del ATP celular en la mitocondria (Dos Santos y col., 2002). Esta separación de ATP y ADP aumenta la hidrólisis localizada del ATP dentro de la mitocondria, reduciendo el $\Delta\Psi_m$, y esta despolarización reduce la captación de Ca^{2+} y previene la sobrecarga (Liu y col., 1998; Korge y col., 2002).

La apertura del mK_{ATP} aumenta la conductancia al K^+ para mantener el volumen de la matriz y del espacio intermembranoso. Ha producido una gran reducción en la hidrólisis del ATP durante la isquemia simulada, preservando el ATP para la reperfusión (Dos Santos y col., 2002). Varios autores concuerdan en que la apertura de los canales mK_{ATP} previno la hidrólisis del ATP por la F_0F_1 ATP-sintasa mitocondrial (Costa y col., 2006; Liu y col., 2010) y la excesiva carga de Ca^{2+} de la mitocondria por disminuir el $\Delta\Psi_m$, lo cual reduce la fuerza impulsora para el influjo de Ca^{2+} a través del UCam (Ishida y col., 2001; Murata y col., 2001; Carreira y col., 2005). Este mecanismo sería uno de los responsables de la protección miocárdica ejercida por los abridores de los canales mK_{ATP} frente a la injuria por reperfusión (Ishida y col., 2001; Murata y col., 2001; Carreira y col., 2005).

Además hay una clara diferencia entre el mK_{ATP} y el mPTP sobre la regulación de la $[Ca^{2+}]$ mitocondrial. Mientras el mK_{ATP} modula la acumulación de Ca^{+2} en la matriz mitocondrial durante la isquemia, el mPTP contribuye a alterar la homeostasis de Ca^{2+} durante la reperfusión (Holmuhamedov y col., 1999).

Los efectos de los abridores del mK_{ATP} sobre la función mitocondrial dependen del estado energético de la mitocondria. Bajo condiciones energéticas más fisiológicas, los abridores de estos canales como el diazóxido y pinacidil atenúan la respiración mitocondrial, efectos independientes de la apertura del canal mK_{ATP} . En sentido contrario, bajo condiciones energéticamente menos fisiológicas, ambos abridores aceleran la respiración mitocondrial lo cual parecería ser mediado por la apertura del mK_{ATP} (Riess y col, 2008).

Por otra parte, la apertura de los mK_{ATP} induce un moderado incremento en la producción de ROS mitocondrial en cardiomiocitos (Garlid, 2000), y en corazones perfundidos (Forbes y col., 2001). El mecanismo está mediado por la alcalinización de la matriz (Andrukiv y col., 2006). Esto es importante si se considera que se ha demostrado que una producción moderada de ROS actúa como segundo mensajero en la cardioprotección y en el preconditionamiento (Das y col., 1999). Hay muchas evidencias de que los canales K_{ATP} participan en la protección impuesta por el preconditionamiento cardíaco. Esta protección ha sido adjudicada a la activación de los mK_{ATP} dado que fue abolida por la adición de glibenclamida y 5-HD (Zhu y col., 2003). Sanada y colaboradores demostraron que tanto los K_{ATP} mitocondriales como los sarcolemales están implicados en la disminución del tamaño del infarto en diversos modelos de preconditionamiento de corazones caninos “in vivo”; sin embargo, cada uno de estos canales ejercería su rol protector de forma independiente (Sanada y col., 2001).

Canal de K^+ mitocondrial dependiente de Ca^{2+} ($mBKCa$):

El canal mBK_{Ca} fue originalmente descrito usando la técnica de patch-clamp en células del glioma humano. Más tarde canales similares fueron observados en mitocondrias de músculo cardíaco, esquelético y cerebrales (Szewczyk y col., 2006; Szewczyk y col., 2010). Si bien los componentes moleculares de este canal aún no han sido identificados en su totalidad, se sabe que está localizado en la membrana mitocondrial interna y que a diferencia de los K_{ATP} , estos canales no son funcionalmente expresados en el sarcolema. Los mBK_{Ca} son estimulados por Ca^{+2} y por benzoimidazolones (como el NS1619, y otros) a concentraciones micromolares y son bloqueados por caribdotoxina (Szewczyk y col., 2010). Estudios en cardiomiocitos de cobayo demostraron que los mBK_{Ca} están implicados en la protección frente a la injuria por I/R, y que si bien el efecto citoprotector es similar al indicado para los mK_{ATP} , actúan en forma independiente de ellos (Sato y col., 2005).

Kicinska y Szewczyk (2004) mostraron que la apertura del mBK_{Ca} por NS1619 produjo una disminución del $\Delta\Psi_m$ con la consecuente disminución en la sobrecarga de Ca^{2+} y la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos autores sugieren que el mecanismo antes mencionado sería el responsable de la protección ejercida por los abridores de dichos canales (Kicinska y Szewczyk, 2004). Recientes estudios han mostrado que los efectos cardioprotectores del estradiol incluyen la activación de los canales mBK_{Ca} en mitocondrias cardíacas sometidas a un modelo de I/R simuladas (Ohya y col., 2005).

1.g Diferencias de género en los mecanismos de acoplamiento excito-contráctil:

Diversos estudios en modelos animales han aportado evidencias de que existen diferencias en los mecanismos excito-contráctiles entre machos (M) y hembras (H). En cardiomiocitos aislados de rata, el acortamiento fraccional fue significativamente menor en H que en M (Farrell y col., 2010).

Además, Rosenkranz y col. (1994) encontraron que en cardiomiocitos de ratas H los niveles de ARNm correspondientes a α y β miosina de cadena pesada y de actina sarcomérica eran más elevados que en M, así como también la actividad ATPasa en las miofibrillas a las mismas concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Schwartz y col., 2004). Estos antecedentes sugieren que la maquinaria contráctil en corazones de ratas H es más sensible al Ca^{2+} y respondería a más bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular que en corazones de rata M.

Además, estudios realizados en cardiomiocitos de rata han determinado que la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} es menor en H que en M (Leblanc y col., 1998; Curl y col., 2001; Wasserstrom y col., 2008; Farrell y col., 2010). También los niveles de Ca^{2+} diastólicos son más bajos en cardiomiocitos de rata H (Farrell y col., 2010; Howlett, 2010). Farrell y col. (2010) midieron en forma simultánea la densidad de corriente de Ca^{2+} y los transitorios de Ca^{2+} y encontraron que en H se libera una menor cantidad de Ca^{2+} desde el RS en respuesta al influjo de Ca^{2+} extracelular. Por otra parte, se describió que los cardiomiocitos de rata H tienen una menor velocidad de caída de los transitorios de Ca^{2+} (Leblanc y col., 1998; Curl y col., 2001; Wasserstrom y col., 2008), lo cual sugiere una menor recaptación de Ca^{2+} hacia el RS. Sin embargo, no se han encontrado diferencias de género en la expresión de la proteína SERCA2a o en los niveles de ARNm en estudios realizados en cardiomiocitos de rata (Chen y col., 2003; Chu y col., 2005; Tappia y col., 2007). Tampoco hay diferencias de género en los niveles de la proteína fosfolamban (PLN, regulador intrínseco de la SERCA2a) (Chen y col., 2003; Chu y col., 2005; Tappia y col., 2007). Por lo tanto las diferencias de género en la velocidad de caída de los transitorios de Ca^{2+} no se deben a diferencias en la expresión de la SERCA2a ni en la PLN. Sin embargo, no hay estudios que evalúen si existen diferencias de género en los niveles de fosforilación de estas proteínas, las cuales podrían explicar la diferente velocidad de caída de los transitorios de Ca^{2+} .

Complementariamente, Mason y Macleod (2009) evaluaron si existen diferencias de género en el contenido de Ca^{2+} del RS de cardiomiocitos de cobayo, generando la descarga de Ca^{2+} desde esta

organela mediante el agregado de 10 mM de cafeína. Estos autores encontraron que las H liberan mayor cantidad de Ca^{2+} desde el RS y tienen un mayor contenido en esa organela. Además, en H se ha encontrado una mayor expresión del receptor de RyR2 y aumento en los niveles de su ARNm (Chu y col., 2005; Yaras y col., 2007). Por lo tanto, el RS no es el responsable de la reducción del transitorio de Ca^{2+} en corazones de hembras.

Si bien en muchos trabajos se ha evaluado si existen diferencias de género en la densidad de corrientes de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados, no se han encontrado diferencias significativas en ninguna de las especies estudiadas (ratas, cobayos, ratones) (Leblanc y col., 1998; Grandy y Howlett, 2006; Brouillette y col., 2007; Yaras y col., 2007; Farrell y col., 2010; Howlett, 2010). Sin embargo, en H se ha encontrado mayor cantidad de la proteína Cav1.2 (una subunidad del canal de Ca^{2+} tipo L, LCC) (Chu y Col., 2005; Sims y col., 2008). Sumado a esto, Vizgirda y col. (2002) encontraron un aumento en la densidad de receptores de dihidropiridina (canales de Ca^{2+} de tipo L) en los ventrículos de ratas H. Pero si las H tienen más subunidades Cav1.2 de canal, la similitud en las densidades de la corriente de Ca^{2+} entre M y H sugiere que habría diferencias de género en la actividad individual de los canales LCC.

También varios autores han evaluado si existen diferencias de género en la cantidad y/o actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal (NXC-SL). En cardiomiocitos de conejo Chen y col. (2011) encontraron una mayor extrusión de calcio por el NXC-SL en H. Además, la expresión de la proteína NCX1 (la isoforma más abundante a nivel cardíaco) es mayor en H (Chen y col., 2011). Estos resultados sugieren que tanto la expresión como la actividad del NXC-SL son mayores en H que en M, lo cual podría contribuir a la reducción de los transitorios de Ca^{2+} observada en H en comparación con los M.

1.h Efectos de las hormonas sexuales sobre la contractilidad cardíaca:

Stice y col. (2011), demostraron que tanto el receptor estrogénico α (RE α) como el receptor estrogénico β (RE β) están presentes en corazones de ratas adultas ovariectomizadas y ancianas, con y sin reemplazo estrogénico. Además, demostraron en estudios realizados mediante la técnica de Western blot que no hay diferencias en la cantidad de receptores estrógenicos α y β presentes entre estos 4 grupos. Además existe un receptor estrogénico acoplado a proteína G (GPER) (Deschamps y Murphy, 2009). También en el miocardio está presente el receptor androgénico (RA) (McGill y col., 1980). El RE α , el RE β y el RA están localizados tanto en el citosol como en el núcleo (McGill y col., 1980). Además el RE α está localizado en el sarcolema, particularmente en los túbulos T (Bell y col., 2013). No sólo la expresión del subtipo de receptores estrogénicos y androgénicos es similar en cardiomiocitos de M y H sino que también tienen la misma localización (Lizotte y col., 2009), aunque esto puede depender de los esteroides sexuales circulantes (Krieg y col., 1978; Grohé y col., 1997; Lizotte y col., 2009).

La unión de los esteroides sexuales a sus respectivos receptores produce efectos a largo plazo mediante cambios en la expresión genética (McGill y col., 1980) y efectos a corto plazo no genómicos. El 17- β estradiol (E₂) regula la expresión de la proteína HSP72 tanto en cardiomiocitos de rata H como en M (Knowlton y Sun, 2001; Voss y col., 2003; Hamilton y col., 2004). En cardiomiocitos de rata E₂ a dosis terapéuticas aumentó la expresión de HSP72 mediante la activación secuencial de los factores de transcripción NF κ B y HSF-1 (Hamilton y col., 2004). Hasta hace 16 años atrás todos los efectos mediados por los estrógenos se atribuían a la unión a sus receptores nucleares, alterando la transcripción génica (Mendelsohn y Karas, 1999). Sin embargo, los receptores estrogénicos también están asociados con la membrana plasmática, y estos receptores (especialmente el RE α) se acoplan a la activación de la vía del PI3K (Simoncini y col., 2000).

Nuedling y col. (2001) demostraron que el RE β es responsable del aumento en los niveles de NO sintasa endotelial (eNOS) en los cardiomiocitos. Además, los estrógenos a través de sus acciones a corto plazo pueden llevar a activación de la vía PI3K y a la fosforilación y activación de la eNOS. Es

decir que los estrógenos pueden generar tanto un aumento en los niveles de la eNOS como en su actividad.

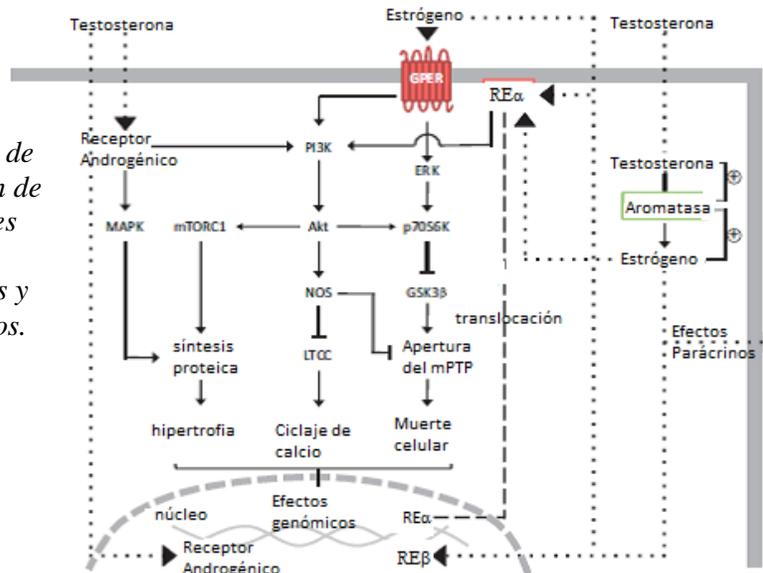
Además, la unión de los estrógenos al receptor acoplado a proteína G llamado GPR30 o GPER activa la vía del PI3K (Filardo y Thomas, 2005; Revankar y col., 2005). Los efectos a corto plazo involucran la vía PI3K/Akt, y la activación de la NO sintasa y la PKG. Hay evidencias de que estas vías están implicadas en la cardioprotección generada por la administración aguda de E₂ en situación de isquemia y reperfusión (Node y col., 1997; Deschamps y col., 2010). Por lo tanto, los estrógenos pueden generar cardioprotección, por modificar la expresión génica o por su acción a corto plazo de activación de la vía del PI3K.

Cross y col. (1998) demostraron que en corazones de ratón perfundidos a través de las arterias coronarias, 20 minutos de isquemia de no flujo genera un daño similar a M y H. Sin embargo, en modelos de corazones de ratón modificados genéticamente sin expresión de PLN o con sobreexpresión del NXC-SL la isquemia de no-flujo generó menor daño en H que en M (Cross y col., 1998; Cross y col., 2003). Esto sugiere un grado diferencial de función del RS y el NXC-SL según el sexo, siendo más importante la remoción de Ca²⁺ por el NXC-SL en H que en M. Coincidentemente, Lagranha y col. (2010) encontraron que los corazones de H expuestos a 30 minutos de isquemia global tienen un tamaño de infarto significativamente menor que los de M, pero eso fue atribuido a una menor producción mitocondrial de ROS. Esto sugiere que la cardioprotección en H es significativamente mayor que en M con isquemias más prolongadas, pudiendo participar tanto una reducción del rol del RS respecto del NXC-SL como una actividad mitocondrial diferente. En este sentido, en los corazones de ratas H se encontró menor captación de Ca²⁺ hacia las mitocondrias que los de M (Arieli y col., 2004), lo cual podría ser responsable de la menor producción intramitocondrial de ROS que lleva a cardioprotección.

Poco se conoce acerca de las acciones del receptor androgénico (RA) y sus intermediarios en el miocardio, pero hay evidencias de que están involucradas múltiples vías de señalización, entre ellas,

las MAPKs (p38-MAPK; ERK1/2) y PI3K/Akt (Meldrum y col., 2005; Wang y col., 2005; Crisostomo y col., 2006; Altamirano y col., 2009; Huang y col., 2010). La testosterona ha dado resultados dispares en cuanto a si es cardioprotectora en corazones aislados. Entre los mecanismos cardioprotectores se citan el aumento de expresión de la proteína HSP70, y la activación de los mKATP (Bell y col. 2013). En la fig. 4 se esquematizan las vías de señalización desencadenadas luego de la interacción de los esteroides sexuales con sus respectivos receptores presentes en el miocardio:

Fig. 4: Vías de señalización de los diferentes receptores estrogénicos y androgénicos.



Adaptado de Bell y col., 2013.

Mediante sus efectos sobre los diversos receptores los esteroides sexuales tienen influencias importantes en el acoplamiento eléctrico-contráctil. Inicialmente sus efectos se han deducido en modelos de animales en los que se provocó la deficiencia. Particularmente los estrógenos reducen la contractilidad miocárdica (Raddino y col., 1986) porque actúan:

- sobre los miofilamentos: reducen la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos, considerando que ratas ovariectomizadas mostraron aumentada sensibilidad al Ca^{2+} , la cual se revirtió en presencia de E_2 (Wattanapernpool, 1998; Wattanapernpool y col., 2000).

b) sobre el transitorio de Ca^{2+} : en ratas ovariectomizadas se perdió la diferencia en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} que estaba disminuida en cardiomiocitos de ratas H respecto de los M (Curl y col. 2001), pero la administración de E_2 nuevamente los redujo (Curl y col., 2003). Como se discutió anteriormente, el mecanismo podría relacionarse a la reducción del influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} L (Grohé y col., 1997; Meyer y col., 1998), o a la reducción de la liberación de Ca^{2+} desde el RS, como fue descrita por Farrell y col. (2010) en cardiomiocitos de rata H. En concordancia, en cardiomiocitos de rata ovariectomizadas aumentó la liberación de Ca^{2+} del RS (Kravtsov y col., 2007). Además, a la reducción del transitorio de Ca^{2+} podría contribuir una elevación de la remoción sarcolemal de Ca^{2+} por el estrógeno y en este sentido fue encontrado que la actividad del NXC-SL es menor en corazones de ratón sometidos a ovariectomía que en H jóvenes, y es mayor en machos castrados (Sebag y col., 2011).

En cuanto a los efectos de testosterona en cardiomiocitos, no hay muchos trabajos que los evalúen. En parte, los efectos serían opuestos a los del estrógeno, ya que la castración redujo el acortamiento (Golden y col., 2003), y la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} (Curl y col., 2009) en cardiomiocitos de rata M, efectos que fueron revertidos por testosterona. La administración crónica de testosterona aumentó la expresión de canales de calcio de tipo L (Michels y col., 2007; Gassanov y col., 2009) y la densidad de la corriente L (Gassanov y col., 2009). Los cardiomiocitos de M tienen una mayor velocidad de caída de los transitorios de Ca^{2+} que los de H (Curl y col., 2001). Si bien no se encontraron diferencias de género en la expresión de las Ca-ATPasas o fosfolamban, se ha sugerido que testosterona podría modular la expresión del NXC-SL (Golden y col., 2002; Tsang y col., 2009). Este último mecanismo podría contribuir a las mencionadas diferencias en la velocidad de caída de los transitorios de Ca^{2+} entre M, H y H ovariectomizadas.

2. ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CARDIACA

La isquemia cardíaca es la falta, o bien la disminución, del flujo sanguíneo coronario que produce un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno por el corazón. Este desequilibrio compromete además la entrega de nutrientes a las células y la remoción de sus desechos metabólicos, cuya acumulación resulta potencialmente tóxica.

El proceso de isquemia-reperfusión cardíaca es subyacente a la enfermedad de angor o angina de pecho, que constituye la principal causa de muerte en las sociedades industrializadas. Esta falla cardíaca es consecuencia de un gran número de riesgos etiológicos que coexisten con otros estados de desorden tales como hipertrofia cardíaca, hiperlipidemias y arterosclerosis, diabetes y resistencia a la insulina, entre otros (Ferdinandy y col., 2007).

Durante muchos años se pensó que la isquemia producía un daño irreversible en los miocitos. Sin embargo, este concepto cambió con el descubrimiento de que la reperfusión temprana puede llevar a una recuperación contráctil en el territorio isquémico (Maroko y col., 1971; Ginks y col., 1972; Maroko y col., 1972; Theroux y col., 1976; Matsuzaki y col., 1983). Es decir que las consecuencias son un daño más o menos severo al miocardio, que es reversible o irreversible, dependiendo de la duración de la isquemia. Se reconocen dos principales consecuencias del proceso de isquemia/reperfusión (I/R): el atontamiento (*stunning*) y el infarto. El atontamiento fue definido como una función miocárdica deprimida siguiente a un evento isquémico (Kloner y Jennings, 2001) relativamente corto, y persiste después de la reperfusión a pesar de la ausencia de daño irreversible y de la restauración del flujo coronario normal o casi normal (Bolli y Marbán, 1999). Esta disfunción no es usualmente un problema grave en la clínica médica debido a que desaparece espontáneamente después de una oclusión coronaria y responde positivamente al uso de agentes inotrópicos. Sólo compromete la vida del paciente cuando se ve afectado una gran porción del

miocardio (Piper y col., 1998). Por el contrario, el infarto miocárdico (IM) implica la pérdida irreversible de la función contráctil por apoptosis o muerte celular.

El principal problema que enfrenta el miocardio expuesto a isquemia es energético, ya que se reduce su metabolismo aeróbico y la síntesis de compuestos fosfato de alta energía (ATP y PCr) esenciales para los transportes activos iónicos y el acoplamiento actomiosínico (Di Lisa y col., 2007; Halestrap y col., 2007). El primer efecto de la insuficiente oxigenación (en este caso por isquemia) es la inhibición de la cadena respiratoria lo cual impacta sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial y por ende en la conservación de la energía (Di Lisa y col., 2007; Baines, 2009).

El corazón puede tolerar pequeños períodos de isquemia, pero si la isquemia persiste el miocardio desarrolla un severo déficit de ATP que resulta en una injuria irreversible. Por lo tanto, la reperfusión es un requisito para que la célula sobreviva (Halestrap y col., 2004; Ferdinandy y col., 2007). Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado que, paradójicamente, ocurre una nueva lesión durante los primeros minutos de la reperfusión, por lo cual es considerada "un arma de doble filo".

Las consecuencias del proceso de I/R cardíaca dependen de la drasticidad del período isquémico, es decir del período transcurrido en ausencia (isquemia) o reducción (hipoperfusión) del flujo de perfusión coronaria. La tolerancia cardíaca a la isquemia depende de los mecanismos que le permiten preservar las reservas energéticas, como el cambio hacia el metabolismo anaeróbico, el contenido de enzimas eliminadoras de ROS, el aumento en la captación de glucosa, la utilización de ácidos grasos como sustrato energético y la disminución de la contractilidad. Si la isquemia persiste y ocurre un déficit importante de ATP se produce un daño irreversible.

A pesar de que se han utilizado diferentes modelos experimentales y especies animales para estudiar la patogénesis del miocardio atontado ésta aún no está del todo establecida. Sin embargo, los resultados experimentales dan fuerza a dos hipótesis como las más concluyentes. Una está basada en la sobrecarga de calcio durante la fase temprana de la reperfusión (Heyndrickx y col.,

1975; Braunwald y Kloner, 1982; Kusuoka y col., 1987; Marban, 1991). La otra hipótesis (de los radicales libres derivados del oxígeno) postula que el atontamiento cardíaco es causado por especies reactivas del oxígeno (ROS) que incluyen al anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, las evidencias indican que ambos orígenes se entrecruzan siendo responsables en diverso grado según la duración de la isquemia.

2.a Alteraciones en la homeostasis de calcio:

Durante la isquemia se origina un rápido agotamiento de las reservas energéticas del miocito. La contractilidad cardíaca se reduce abruptamente, hecho que fuera atribuido al acortamiento del potencial de acción por activación de canales K^+ -ATP dependientes de sarcolema (Cole y col., 1991) de modo de proteger al miocardio abreviando el influjo de Ca^{2+} durante la fase 2. En las mitocondrias, sucede la inhibición de la transferencia de electrones por lo cual cesa el bombeo de H^+ a través de la membrana interna, proceso necesario para generar y mantener el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Baines, 2009). En respuesta a esto, las mitocondrias trabajan para restablecer el $\Delta\Psi_m$ revirtiendo la función de la F_1F_0 ATP sintasa que comienza a funcionar en forma reversa hidrolizando ATP (Baines, 2009). La isquemia entonces, produce la caída de los niveles de ATP y de creatina fosfato (PCr) y un aumento concomitante de las concentraciones de AMP y fosfatos inorgánicos (Pi) (Ferdinandy y col., 2007; Halestrap y col., 2007). Éstos pueden incrementarse desde aproximadamente 1 a 20 mM durante la isquemia (Allen y Orchard, 1987). Además, dado que la fosforilación oxidativa está inhibida durante la isquemia, el cardiomicito se abastece de ATP por medio de la glicólisis anaeróbica. Esto conlleva a la producción de lactato, y la acumulación de ácido láctico conduce a una disminución drástica del pH intracelular (pHi) o citosólico (Halestrap y col., 2004; Di Lisa y col., 2007). Tanto la acidosis como los niveles altos de Pi disminuyen la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} ejerciendo un fuerte efecto depresor contráctil típico de la isquemia (Lee y col., 1988; Bers, 2001). Esto se suma al ya mencionado

acortamiento del potencial de acción por activación de los canales K dependientes de ATP (I_{KATP}) que reduce el influjo de Ca^{2+} (Cole y col. 1991) y así la contractilidad se reduce bruscamente hasta desaparecer en los primeros minutos de isquemia. La caída de los niveles de ATP y PCr reduce la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, por lo cual aumenta la $[Na^+]_i$ (Pike y col., 1990). Consecuentemente, el reducido gradiente de Na^+ origina una disminución del eflujo de Ca^{2+} por el NXC-SL, y las Ca-ATPasa reducen su flujo por la baja $[ATP]$. Todo esto induce una contractura diastólica durante la isquemia, asociada al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la reducida $[ATP]$ para los miofilamentos (Bolli y Marbán, 1999). Se ha demostrado que durante la isquemia el Ca^{2+} miocárdico se incrementa en un 50% (Varadarajan y col., 2001). Además, durante la primera parte de la isquemia se eleva la $[K^+]_i$ hasta un valor de 20 mM aproximadamente. Esta pérdida de K^+ es una consecuencia pasiva de la ganancia de Na^+ durante la isquemia y provoca una despolarización que contribuye a la entrada de Ca^{2+} al citosol (Weiss y Lamp, 1989).

En la Fig. 5 se representa el conjunto de eventos celulares que ocurren en la I/R.

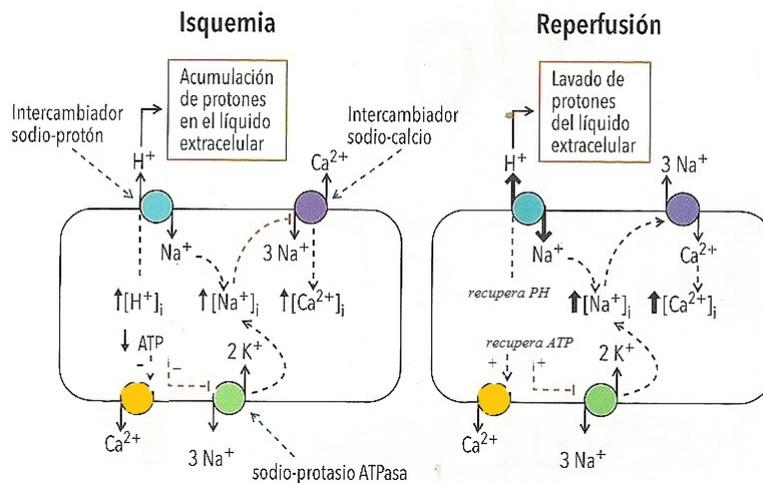


Fig. 5: Mecanismos que alteran la homeostasis iónica durante la isquemia y la reperfusión.

Adaptado de Hermann y col., 2013

Si bien la **reperusión** restaura la oxigenación al tejido y con ello la síntesis de ATP, este proceso también tiene potencial para causar daño irreversible en las células miocárdicas (Ferdinandy y col., 2007). Estas manifestaciones deletéreas hacia el tejido cardíaco se conocen

como injurias por reperfusión. Este proceso se caracteriza por una serie de eventos que pueden ser enteramente atenuadas con intervenciones adecuadas en el tiempo de reperfusión dependiendo fundamentalmente de la duración de la isquemia previa (Piper y col., 1998; Ferdinandy y col., 2007). Estas anormalidades incluyen arritmias por reperfusión, miocardio atontado e injuria letal o infarto por reperfusión (Piper y col., 1998).

Durante el período de reperfusión, al mismo tiempo que se restaura la oxigenación, se sintetiza ATP vía la refosforilación mitocondrial de ADP y AMP, los cuales fueron acumulados durante el período isquémico (Kloner y Jennings, 2001). El pHi retorna a niveles normales mientras que los valores de PCr se incrementan rápidamente (Kloner y Jennings, 2001). Se produce una recuperación parcial del balance de protones por una paulatina activación del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), que exporta protones aprovechando el gradiente electroquímico de Na^+ (Karmazyn, 1999) al restablecerse la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa. Este proceso está favorecido por el lavado extracelular de protones ejercido por la perfusión restaurada. El desbalance iónico es una de las mayores causas de la injuria por reperfusión. Durante los primeros minutos de la reperfusión, y principalmente como consecuencia de la puesta en marcha de mecanismos dirigidos a corregir la acidosis intracelular, puede precipitarse un empeoramiento abrupto de la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} por hiperactivación del intercambiador Na^+/H^+ y la pérdida de K^+ con la consecuente despolarización que alteran el influjo de Ca^{2+} (Pierce y Czubyrt, 1995). Bajo estas condiciones patológicas de gradientes iónicos alterados el NXC-SL reduce el eflujo e incluso puede permitir el influjo de Ca^{2+} actuando en modo reversa (Tani, 1990; Schafer y col., 2001) (ver Fig. 5). Esto ha conducido al daño miocárdico incluyendo la pérdida de la función mitocondrial (Tanaka y col., 2009). Se ha descrito un aumento del Na^+ citosólico de un 50 a un 150% (Misra y col., 2009) y un aumento del Ca^{2+} miocárdico de 4 o 5 veces (Varadarajan y col., 2001). Esta sobrecarga de Ca^{2+} causa una hipercontractura mayor que en la isquemia, y disfunción mecánico-energética en los cardiomiocitos (Misra y col., 2009). Los cambios del gradiente de Na^+ citosólico afectan también a

las mitocondrias, que tienen transportadores de Ca^{2+} dependientes de Na^+ como el NXCm. El inhibidor relativamente selectivo del NXC-SL SEA0400 ejerció efectos cardioprotectores durante la isquemia leve, los cuales fueron atribuidos a la prevención del daño mitocondrial (Motegi y col., 2007). Este daño se disparó por la sobrecarga de Na^+ mitocondrial durante la isquemia y/o por la sobrecarga de Ca^{2+} citosólica vía el modo reversa del NXC-SL durante la reperfusión (Motegi y col., 2007).

Experimentos con preparaciones aisladas mostraron que aun cuando los transitorios de Ca^{2+} no resultan muy afectados en el miocardio atontado hay una considerable caída en la contractilidad (Gao y col., 1995). Por ello se ha sugerido que los mecanismos implicados en esta falla son: disminución de la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} , sobrecarga de Ca^{2+} y desacoplamiento excito-contráctil por disfunción del RS (Bolli y Marbán, 1999). Diversos autores han mostrado evidencias en músculos sin membrana plasmática intacta (“skinned”) que sugieren que durante el atontamiento se reduce la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} (Hofmann y col., 1993). Sin embargo, en músculos intactos de diversas especies se demostró una reducción de la máxima fuerza activada por calcio pero no de la sensibilidad al Ca^{2+} tanto en el miocardio isquémico como en el reperfundido atontado (Soei y col., 1994). Esta caída en la fuerza máxima sería compatible con la acción deletérea de los ROS sobre la integridad de las miofibrillas (Bolli, 1990). Sin embargo, el Ca^{2+} juega un rol interactivo con las miofibrillas en la patogénesis del daño por I/R. Durante la fase inicial de la reperfusión, la $[\text{Ca}^{2+}]$ elevada sobreestimula las miofibrillas, causando una hipercontractura diastólica y el daño en el funcionamiento de la maquinaria contráctil (Piper y col., 1998). Puede ocurrir degradación proteolítica de los miofilamentos finos dependiente de Ca^{2+} en la reperfusión (Gao y col., 1996). La troponina I parece ser selectivamente degradada en corazones atontados, aunque luego de un período largo de isquemia también pueden degradarse otras proteínas de los miofilamentos y la α -actinina. En experimentos donde se reemplazó la troponina endógena con troponina proveniente de corazones atontados se redujo la función

contráctil y la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} , sin alterar los transitorios de Ca^{2+} celulares (Murphy y col., 2000). Por lo tanto, la degradación de la TnI sería un factor importante en la disfunción contráctil en el corazón atontado. Se ha indicado que este proceso puede ser revertido con la re-síntesis proteica en períodos tan variables como para explicar la reversibilidad del atontamiento (Bolli y Marbán, 1999).

Por otra parte, hay muchas evidencias que indican que la actividad de la SERCA se encuentra modificada durante la I/R (Abdelmeguid y Feher, 1994; Kaplan y col., 2003). En modelos de atontamiento en corazones aislados de rata se encontró que al final de la reperfusión los niveles de Ca^{2+} son normales pero la función del RS está alterada (Gao y col., 1995; Wu y Feher, 1996). Además se ha demostrado que la fosforilación de fosfolamban, se incrementa durante la isquemia en forma desfasada en sus dos sitios, más demorado en el de Ser^{16} (sustrato de PKA y dependiente de catecolaminas) respecto del sitio de Thr^{17} (sustrato de CaMKII y dependiente de Ca^{2+}). Así, la fosforilación de Thr^{17} al inicio de la reperfusión ha sido fundamental para la recuperación de la relajación en corazones de rata sometidos a un modelo de I/R reversible (Vittone y col., 2002). Experimentos en ratones transgénicos en los cuales se reemplazó los sitios de fosforilación de fosfolamban Ser^{16} y Thr^{17} por un residuo Ala no fosforilable, confirmaron que la fosforilación de ambos sitios es necesaria para la recuperación de los corazones con atontamiento, pero la fosforilación del sitio de Thr^{17} por CaMKII es más importante durante toda la reperfusión (Said y col., 2003). Se demostró que la fosforilación de Thr^{17} ocurre durante los primeros minutos de la reperfusión, y es una etapa crucial en la recuperación mecánica del corazón y de los transitorios de Ca^{2+} en este modelo de atontamiento (Valverde y col., 2006). La ausencia de fosforilación de fosfolamban produce alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} y en la recuperación contráctil después de I/R, demostrando el rol de la SERCA. Sin embargo, no afecta la contractilidad basal de los corazones, ni la sensibilidad de miofilamentos o la degradación de Tn-I como otros autores proponen (Valverde y col., 2006).

Otro mecanismo que puede alterar el manejo del Ca^{2+} citosólico durante la I/R es la captación mitocondrial de Ca^{2+} . Las mitocondrias pueden almacenar grandes cantidades de Ca^{2+} durante la reperfusión mediante el uniporter (UCam) (Gunter y col., 1994). Si la elevación del Ca^{2+} durante la reperfusión fuera excesiva, este aumento podría disparar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Baines, 2009). Está aceptado que la apertura del mPTP contribuye a la pérdida de viabilidad asociada con la I/R (Di Lisa y Bernardi, 2006) pero esto parece ser más un proceso asociado al daño irreversible por isquemias prolongadas que al atontamiento (Hausenloy y Yellon, 2003; Weiss y col., 2003). En efecto, en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con un modelo de atontamiento en corazones de rata pretratados con solución cardiopléjica de alta $[\text{K}^+]$ no se ha encontrado la activación del mPTP (Ragone y col. 2009). Otros autores describen el rol mitocondrial disparador de la apoptosis mediante la activación del mPTP y cascadas intracelulares pro-apoptóticas en un modelo de I/R prolongada con infarto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con activación de la CaMKII generando pérdida de citocromo c, hinchazón mitocondrial e interacción GSK3 β -VDAC mitocondrial (Salas y col. 2010; González Arbelaez y col. 2013). Las evidencias sugieren que aún con cascadas enzimáticas que desencadenan necrosis y apoptosis del miocito, el eje central de la disfunción está dado por una señal deletérea de Ca^{2+} desde el RS a las mitocondrias y una activación del mPTP en éstas que ocasiona una nueva sobrecarga de Ca^{2+} citosólica en la I/R con injuria severa. En forma análoga, en cardiomiocitos y mitocondrias aisladas sometidos a “isquemia simulada” por inhibición de la respiración mitocondrial (Ruiz-Meana y col. 2006) describieron alta captación mitocondrial de Ca^{2+} y disipación del potencial de membrana durante la isquemia, seguido de apertura del mPTP. Si bien la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial se previno por bloqueo del UCam, el consecuente aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica desencadenó apoptosis, sugiriendo que el ajuste de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en los diversos compartimentos es un proceso de regulación fina que se altera en la hipoxia o la isquemia drásticas. La apertura del mPTP desencadenó hipercontractura dependiente del Ca^{2+} y consumo de ATP

(Ruiz-Meana y col 2007). La hipercontractura se activó por ciclaje de Ca^{2+} proveniente del RS y revirtió por colchicina, demostrando que participa una red de microtúbulos entre el RS y las mitocondrias (Ruiz-Meana y col., 2009). En clínica, el uso de colchicina como despolimerizante de microtúbulos originó prevención de eventos secundarios cardiovasculares en pacientes con enfermedad coronaria estable (Nidorf y col., 2013). Evidencias de una interacción bidireccional entre las mitocondrias y el RS aparecen también para las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Murphy y Steenbergen, 2008; Ruiz-Meana y col., 2010), y su producción mitocondrial aumentó la aparición de “Sparks” u ondas de Ca^{2+} del RS (Yan y col., 2008). En cardiomiocitos con hipercontractura “isquémica” simulada la apertura del mPTP ocurrió tempranamente en la R, y fue debida a oscilaciones de Ca^{2+} del RS, y aumentó las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial (Abdallah y col., 2011). Por lo tanto, hay cada vez más evidencias de que en la I/R participa la interacción entre compartimentos que regulan la $[\text{Ca}^{2+}]$ como son el RS y las mitocondrias.

2.b Hipótesis de los radicales libres (ROS):

Hay evidencias de que durante la reperfusión en una cirugía de corazón entero o luego de una trombolisis la disfunción en la fuerza desarrollada por el ventrículo izquierdo o atontamiento cardíaco está relacionada al estrés oxidativo (Misra y col., 2009). Al proceso de agotamiento de ATP y los desbalances de Na^+ y Ca^{2+} ya descritos en la Fig. 5 se agrega la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), moléculas muy pequeñas como el superóxido, peróxido de hidrógeno, y el radical hidroxilo, que aumentan marcadamente con el reingreso del oxígeno a la célula cardíaca. Además, son liberados por parte de células sanguíneas fagocíticas que intervienen en la respuesta inflamatoria aguda en los focos de necrosis tisular como fagocitos y células endoteliales, disminuyendo los mecanismos celulares de defensa (Misra y col., 2009). La producción de ROS puede ser reducida mediante intervenciones antioxidantes como las vitaminas E (alfa-tocoferol) y C

(ácido ascórbico), y suplementos alimenticios antioxidantes como la yerba mate (Schinella y col., 2005). Uno de los mecanismos que actualmente está recibiendo gran atención es la pérdida de la estructura y función de las mitocondrias durante el proceso de I/R, en parte disparada por procesos de ROS y alteración de los flujos iónicos en la membrana mitocondrial interna. Existen estudios basados en la hipótesis de que los ROS producidos durante la reperfusión del miocardio isquémico representan la mayor causa de la injuria letal por reperfusión (Piper y col., 1998). Esto ocurre fundamentalmente en isquemias prolongadas que conducen a infarto miocárdico. La consecuencia de este daño se refleja en la actividad de la cadena respiratoria de las mitocondrias cardíacas (Halestrap y col., 2004).

Algunos trabajos han sugerido una vinculación entre la producción de ROS y la activación del NHE-1 (Myers y col., 1998). Un inhibidor del NHE-1 como cariporide puede inhibir al NHE mitocondrial demorando la acidificación de la matriz y la depleción de ATP (Ruiz-Meana y col., 2003). Más recientemente se ha descrito que los inhibidores del NHE-1 sarcolemal ejercen un efecto a nivel mitocondrial de reducción de la producción de ROS en el miocardio de gatos, el cual involucra la inhibición de la vía de las MEK-ERK1/2- p90 ribosomal S6 kinasa dependiente de los ROS (Garciaarena y col., 2008).

Además, los ROS contribuyen a disminuir la actividad de la Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), la cual juega un rol crucial en el manejo del Ca^{2+} cardíaco (Misra y col., 2009). Los ROS alteran la función de los RyR y de las proteínas de los miofilamentos (McCord, 1985). Además modifican un gran número de señales involucradas en el control de vías de apoptosis y proliferación celular importantes en distintos aspectos de la función celular cardíaca (Bolli y Marbán, 1999; Levraut y col., 2003). Estudios en perros conscientes sujetos a 15 min de oclusión coronaria demostraron que los ROS se generan después de la reperfusión, con un pico a los 2–3 min del inicio de la misma y caía dentro de los 20 min, que los antioxidantes atenúan

marcadamente este disparo de los ROS y el atontamiento miocárdico, indicando que los ROS son responsables de que ocurra esta disfunción contráctil (Bolli y Marbán, 1999).

En resumen, la generación de ROS, la rápida restauración del ATP en presencia de altas $[Ca^{+2}]_i$ y la proteólisis de miofilamentos durante la reperfusión podrían participar en el atontamiento (Bolli y Marbán, 1999). En cambio, la inducción de la apertura del mPTP durante la reperfusión puede resultar en hipercontractura y desencadenar los procesos de necrosis y apoptosis celular propios del infarto. El eslabón común a todos estos procesos es la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} y la consecuencia es una alteración en la energética y la economía cardíaca.

3. ENERGÉTICA CARDÍACA Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA ISQUEMIA Y REPERFUSION

Al igual que en todo sistema vivo, la célula miocárdica realiza trabajo mecánico y de transportes iónicos consumiendo energía como transformaciones sucesivas de enlaces químicos de alta energía a enlaces químicos de baja energía, transformando energía química en energía mecánica, y liberando estequiométricamente el calor proveniente de dichas reacciones exotérmicas. De esta manera, el músculo cardíaco actúa como transductor de energía. La energía química que la célula almacena en forma de ATP y fosfocreatina (PCr) es transformada en otras formas de energía: trabajo mecánico, movimiento iónico contragradiente, y calor liberado. Dada la actividad continua cardíaca, los niveles de ATP y PCr deben ser restaurados en simultáneo a su consumo en procesos de recuperación metabólica en su mayoría aeróbicos, que involucran consumo de oxígeno y sustratos (glucosa, ácidos grasos), desprendimiento de dióxido de carbono y liberación de calor (Gibbs y Chapman, 1979). De esta manera, la *medición del consumo de oxígeno* es proporcional a la demanda cardíaca pero estima sólo el componente de resíntesis aeróbica de la energía química. En cambio, la medición del calor liberado permite obtener una estimación de todos los procesos de consumo de energía química y resíntesis de la misma sean éstos aeróbicos o anaeróbicos. Es decir, que todos los procesos celulares exotérmicos pueden estimarse mediante la *calorimetría*.

Estudiando el flujo de calor del músculo cardíaco se ha logrado entender la regulación energética del mismo, tomando como antecedente a los estudios previos realizados en el músculo esquelético (Hill y Rahimtulla, 1965). Como en este último, en el miocardio el flujo de energía por latido ha sido dividido fundamentalmente en dos componentes: a) el componente de reposo correspondiente al período diastólico donde se mantiene el metabolismo basal y la actividad basal de transportes activos primarios como Na^+ , K^+ -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasas, y b) el componente del metabolismo activo, que incluye la energía utilizada en cada contracción del músculo cardíaco y la

recuperación de una fracción similar a nivel metabólico (Gibbs y Chapman, 1979; Gibbs, 2003). A diferencia del músculo esquelético en el que el calor de recuperación se encuentra demorado respecto del calor activo, en el músculo cardíaco la fracción de recuperación metabólica está integrada en cada contracción (Mulieri y Alpert 1982; Ponce-Hornos y col. 1995).

La Energética cardíaca, y en particular la Calorimetría, brindan una herramienta para analizar la posibilidad de ocurrencia “in situ” de un mecanismo dado, en integración con otros en una célula o tejido funcional. Cuando el músculo no realiza trabajo (contracciones isométricas) existe una relación estequiométrica entre la energía medida como la entalpía (ΔH) de una reacción y las cantidades de sustratos intercambiadas en esa reacción, o el flujo de un ión transportado activamente mediante la hidrólisis del ATP cuyo equivalente energético es de -80 kJ/mol incluyendo su resíntesis (Gibbs y Chapman 1979; Ponce-Hornos, 1990). Por lo tanto, las mediciones efectuadas en células o tejidos enteros, como las obtenidas a través de un estudio miotérmico, permiten establecer los límites a la extrapolación del conocimiento específico obtenido separadamente para los diversos transportadores celulares. La extrapolación de la información (datos de flujos iónicos, por ejemplo) obtenida por aislamiento de los sistemas de transporte específicos está lejos de representar el funcionamiento integral en una célula, y la medición energética permite establecer el límite.

3.a. Calorimetría y metodologías miotérmicas:

Los estudios sobre liberación de calor comenzaron en músculo esquelético aislado con Helmholtz en 1848 quien utilizó tres termocuplas en serie con un galvanómetro (Hill, 1965). En 1909, A.V. Hill comienza un estudio sistemático e integrado de la termodinámica de la contracción muscular esquelética, utilizando las termopilas (gran número de termocuplas en serie) a las que mejora progresivamente tanto en rapidez de respuesta como en sensibilidad. Esta metodología, con diferentes

variantes continúa siendo aplicada en el estudio energético del músculo esquelético y cardíaco. Inicialmente se buscó la distinción entre metabolismo basal y activo, como en músculo esquelético (Hill, 1965).

Las mediciones miotérmicas brindan un enfoque más amplio que la medición del consumo de O₂, puesto que registran tanto los procesos de resíntesis aeróbica del ATP (equivalentes al consumo de O₂) como los procesos anaeróbicos que hidrolizan ATP. La tensión parietal (fuerza de estiramiento tangencial que soporta la pared en cada punto de su superficie) es el mayor determinante del consumo de O₂ (Burton, 1957). Las primeras medidas miotérmicas en músculo cardíaco con el método de las termopilas desarrollado por A.V. Hill se realizaron en el músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo (Ricchiuti y Gibbs, 1965). Esas termopilas se mejoraron tanto en velocidad de respuesta como en sensibilidad por el grupo de Mulieri y col. (1977). Poco después se desarrolló un método calorimétrico con una sensibilidad comparable al método de las termopilas, con suficiente velocidad de respuesta y que permite el estudio simultáneo de parámetros energéticos, contráctiles, iónico-cinéticos y metabólicos (Ponce-Hornos y col. 1982). Este último método ha sido mejorado en sensibilidad de las termocuplas (Ponce-Hornos y col. 1995; Consolini y col. 2007) y es el que ha sido aplicado en esta tesis para el estudio mecánico-energético de los corazones enteros de rata y de cobayo, ya que es el único que permite efectuar mediciones en presencia y ausencia de perfusión, para detectar cambios en la I/R.

A continuación se describirá brevemente cada uno de estos métodos y se expondrán las ventajas, desventajas y aplicabilidad de los mismos:

3.a.1. Método de las termopilas

En 1965, Ricchiuti y Gibbs consiguieron desarrollar un sistema de termopilas (termocuplas conectadas en serie) diseñadas para medir producción de calor en preparaciones musculares con ciertas características (Ricchiuti y Gibbs, 1965; Gibbs y col., 1967). Entre estas características, la más

limitante es que la preparación muscular debe ser suficientemente delgada para permitir la adecuada difusión de oxígeno en el tejido, y que su forma sea tal que permita que la mayor parte de su superficie esté en contacto con las uniones termosensibles. La preparación muscular más utilizada ha sido el músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo o el papilar de ventrículo izquierdo de corazón de rata, siempre realizando contracciones isométricas. El calor producido por el músculo es medido como el producto entre la variación de temperatura, registrada por las termopilas, y el calor específico del músculo. Para la medición, el músculo contenido en una pequeña cuba debe ser removido de ella durante 5 seg para ponerlo en contacto con las termopilas. Los inconvenientes técnicos están relacionados, por un lado, con la elevada pérdida de calor que se produce, y consiguiente inestabilidad de la línea de base, el pequeño tamaño de las preparaciones utilizadas (masa promedio 5 mg), la cantidad de solución que permanece adherida a la preparación y que puede inducir una incertidumbre en la masa tisular a utilizar en los cálculos, y la pequeña isquemia a la que está sometida la preparación durante la medición. Este último punto y el hecho de que el músculo está sumergido pero no perfundido por vía fisiológica son los que originan que este método no pueda ser utilizado para efectuar mediciones en isquemia de no flujo ni en hipoperfusión. Las ventajas más relevantes de esta metodología son su alta sensibilidad y rápida respuesta (constantes de tiempo de alrededor de 10 segundos). Las termopilas fueron posteriormente mejoradas por Mulieri y col. (1977) y permitieron describir varias fracciones de calor del miocardio, pero siempre con las limitaciones mencionadas.

3.a.2. Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos:

El método desarrollado por Ponce-Hornos y col. (1982) que se aplicó en esta tesis permite evaluar simultáneamente parámetros mecánicos, bioquímicos e iónico-cinéticos en preparaciones de corazón entero perfundido por vía arterial, en contracciones isovolumétricas, y proveniente de especies pequeñas como rata, cobayo y ratón, o en porciones de miocardio de especies mayores como

el conejo. El método se basa en la medición del flujo de calor desde la cámara interna de un microcalorímetro, en donde se encuentra la pieza muscular en estudio, hacia las paredes externas del mismo en contacto con un baño mantenido a temperatura constante. La medición detecta la diferencia de temperatura entre el interior de la cámara y el exterior en contacto con el baño de agua a temperatura estable. Se lleva a cabo mediante dos unidades Peltier que forman las paredes de la cámara, cada una de ellas con 127 unidades termosensibles, conectadas en serie. Las paredes de cerámica de cada unidad toman contacto con el músculo del lado interno y en el externo con la base compacta de cobre que, una vez cerrada herméticamente está en contacto con el baño calefaccionante. Dada la perfusión por vía arterial fisiológica, se resuelve el inconveniente del espesor tisular como factor limitante de la difusión de oxígeno hacia el tejido, y permite efectuar mediciones continuas, tanto en presencia como en ausencia de perfusión (isquemia). En cuanto a su velocidad de respuesta (constante de tiempo de alrededor de 20 seg) es menor que el método de termopilas, pero no afecta mediciones estacionarias como las alcanzadas durante el reposo o la estimulación continua del músculo, como las abordadas en esta tesis. Su sensibilidad es comparable con la de las termopilas y varía con el flujo de perfusión, debiéndose determinar el factor de calibración en cada condición. Además, ha sido utilizada para la evaluación simultánea de actividad contráctil, parámetros metabólicos (mediante métodos bioquímicos), flujos iónicos (mediante el uso de iones marcados), con las mediciones del flujo de calor (Dominguez-Mon y col., 1984; Ponce-Hornos y col., 1987). Cabe destacar que por su versatilidad, capacidad de respuesta y sensibilidad, este método es el que se ha utilizado en la presente tesis, encontrándose detallado en sección: Materiales y Métodos.

3.a.3. Otros estudios miotérmicos:

Mediante una metodología que combine la medición energética conjuntamente con la contractilidad cardíaca se logra una estimación del funcionamiento del conjunto de eventos dependientes e independientes de tensión. Otros métodos miotérmicos fueron empleados para

evaluar los efectos de cambios en la longitud de la fibra medidos simultáneamente con la fuerza, y el calor en músculos papilares aislados de rata (Kiriazis y Gibbs, 2000), y para estimar el componente energético de trabajo y el independiente de tensión mediante el consumo de oxígeno durante el ciclo cardíaco con acortamiento y trabajo en el loop presión-volumen-tiempo (Suga y col. 1983). Hace pocos años, el grupo de Loiselle comparó los resultados de ambas metodologías aplicadas respectivamente al miocardio latiendo isométricamente y al que realiza trabajo en el ciclo, hallando congruencias e imponiendo el concepto de “isoeficiencia” (Han y col. 2012). Más tarde, Taberner y col. (2011) desarrollaron una metodología que permite medir en forma simultánea el calor liberado por trabéculas aisladas de ratas utilizando una cámara calorimétrica de 1 mm de diámetro interno junto con la longitud muscular y una termopila con gran sensibilidad que detecta un mínimo de 52 nW. Más recientemente, en el grupo de Loiselle, Han y col., (2014a) midieron el consumo de oxígeno de corazones enteros aislados de ratas diabéticas a medida que generaban cambios en la precarga y postcarga. En otro trabajo los autores emplearon el sistema microcalorimétrico de alta sensibilidad con trabéculas cardíacas aisladas de ratas diabéticas para medir en forma simultánea la longitud de acortamiento del preparado (la diabetes prolongó la duración de la contracción) y la producción de calor que no fue afectada, y estableció similitud entre los resultados obtenidos en trabéculas con otros previos obtenidos en corazones enteros midiendo consumo de oxígeno (Han y col., 2014b). Así, en los últimos años la energética se está aplicando al estudio de patologías miocárdicas, puesto que la eficiencia o economía energética del músculo puede afectarse antes que otras variables bioquímicas o contráctiles, y así permitir la comprensión de los mecanismos implicados.

3.b. Metabolismo Basal

El metabolismo basal es una medida de la energía química utilizada y re-sintetizada durante el estado de reposo contráctil (Gibbs y Cahpman, 1979; Loiselle, 1987). Este componente del metabolismo solo puede ser estudiado cuando el corazón se encuentra inactivo (en ausencia de actividad contráctil), lo cual se logra ya sea por extirpación de las aurículas y focos de automaticidad, minimizando las condiciones de automatismo a baja temperatura o por el tratamiento con soluciones cardioplégicas. Puesto que en esta tesis se trabajó a 37°C y con I/R no se ha podido determinar el flujo de calor de reposo.

Se considera que el metabolismo basal está constituido por: procesos regenerativos de mantenimiento de la estructura e integridad funcional del músculo, procesos para la homeostasis iónica citosólica, y metabolismo anaeróbico y aeróbico basal.

El metabolismo basal del músculo cardíaco es alto en comparación con el de músculo esquelético, y representa el 25-30% del metabolismo total (Loiselle, 1987). El alto valor está asociado a la regulación fina de la homeostasis de Ca^{2+} y la elevada población mitocondrial cardíaca, que representa un 35% del volumen del miocito en los mamíferos (Barth y col, 1992). La magnitud del metabolismo basal cardíaco es claramente dependiente de la especie, y se cree que estaría relacionada con diferencias de estructura y función relativa de sarcolema, retículo sarcoplásmico y otras organelas intracelulares (Gibbs y Loiselle, 2001). Consistentemente, las diferencias observadas en el flujo de calor de reposo (Hr) cardíaco entre distintas especies se correlacionaron con el volumen mitocondrial de sus corazones (Loiselle, 1987). Así, se han obtenido estimaciones de calor basal de alrededor de 1 mW/g para gato, 1.8 mW/g para conejo, 2.5 mW/g para cobayo, y 3.5 a 4 mW/g para rata (Gibbs y Loiselle, 1978, Márquez y col. 1997).

Del metabolismo basal, estimado como consumo de O_2 , aproximadamente el 20-30% es utilizado para mantener el $\Delta\Psi$ mitocondrial frente al continuo influjo pasivo de H^+ hacia la matriz

(Loiselle, 1987). El 60-70% del O_2 consumido es utilizado para la síntesis de ATP mitocondrial necesario para la síntesis de proteínas y el mantenimiento de los gradientes de Na^+ y Ca^{2+} (Gibbs y Loiselle, 2001). El uso de técnicas miotérmicas permite estimar no sólo la fracción de resíntesis del ATP consumido (comparable al consumo de O_2) sino también la fracción exotérmica de hidrólisis del mismo (equivalente a -40 kJ/mol ATP cada una, Curtin y Woledge 1978). Mediante técnicas miotérmicas conjuntamente con métodos radioisotópicos también se ha estimado que en el flujo de calor durante el reposo mecánico (H_r , estimado en mW/g o mJ/s.g) participarían la Na^+,K^+ -ATPasa en un 10 a 25% (Gibbs y Chapman, 1979; Gibbs, 1987; Ponce-Hornos y col., 1987), el recambio de proteínas hasta un 20% (Gibbs y Chapman, 1979) y el mantenimiento del gradiente protón-matriz mitocondrial en un 33 % (Loiselle, 1987). Se ha calculado que el mantenimiento de una baja $[Ca^{2+}]_i$ citosólica en el miocardio mediante la Ca^{2+} -ATPasa del RS (SERCA) representaría menos de un 28 % del flujo de calor de reposo promedio entre especies (Ponce-Hornos, 1990). De hecho, cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ no afectaron al flujo de calor de reposo en $[K^+]_i$ cercanas a la fisiológica (Gibbs y Loiselle, 1978; Wendt y Loiselle, 1981; Suga y col., 1983; Ponce-Hornos y Taquini, 1986) a menos que el miocardio esté despolarizado con una solución cardiopléjica que activa el influjo de Ca^{2+} a través de los LCC y en el cual H_r crece con la $[Ca^{2+}]_i$ (Consolini y col. 1997; Márquez y col. 1997; Consolini y col. 2011).

3.c. Metabolismo activo:

Cuando un músculo se contrae, su tasa metabólica inmediatamente aumenta, reflejando el costo energético implicado en la activación muscular, y el flujo de calor total (H_t , en mW/g o mJ/s/g) ahora está formado por el flujo de calor de reposo (H_r) más el flujo de calor activo (H_a). La fracción metabólica que acompaña al ciclo contracción-relajación es lo que se conoce como “metabolismo activo”, que incluye la resíntesis de la energía química consumida en el ciclo. La

energética permite estimar una fracción de calor liberado en cada contracción, denominada calor activo (H_a , estimada en mJ/g) que puede definirse como la fracción del flujo de calor (H_t , estimado en mW/g) que se libera por encima del flujo de calor basal o de reposo (H_r) integrado en el tiempo correspondiente a una contracción (Gibbs y col., 1988). Clásicamente se lo calcula como el área bajo la curva definida entre H_t y H_r por el intervalo entre dos contracciones (Fig. 6).

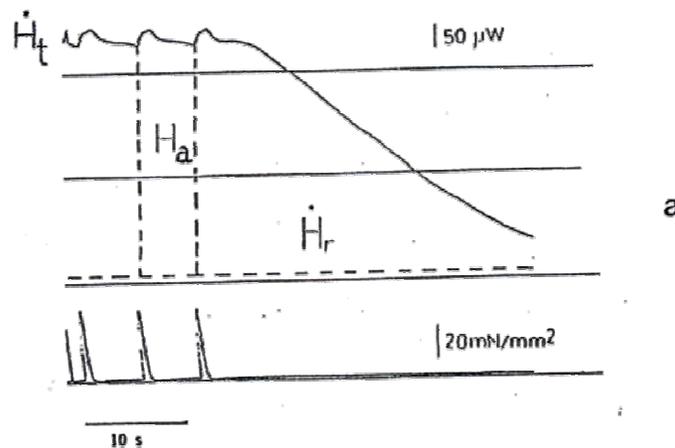


Fig. 6: Registro simultáneo del flujo de calor total (H_t) y el desarrollo de presión isovolumétrica del ventrículo izquierdo perfundido de rata ante un tren estacionario de estímulos mediante el calorímetro para tejidos perfundidos. Al suspender la estimulación, el registro retorna al flujo de calor de reposo (H_r). El área H_a corresponde al calor activo por latido.

La energía calculada en la fracción de calor activo (H_a) es superior a la energía calculada a partir de la correspondiente medición de consumo de O_2 de una contracción (metabolismo activo asociado a la resíntesis del ATP). Esto es debido a que en el calor activo se registran las reacciones exotérmicas de hidrólisis de ATP o PCr (necesarias para el acoplamiento actomiosínico y bombeos iónicos) más la energía implicada en el metabolismo aeróbico (re-síntesis del ATP consumido). Cuando se trabaja con corazones isovolúmicos que no realizan trabajo externo, es posible comparar

las mediciones miotérmicas con el consumo de O_2 mediante el equivalente energético metabólico de 477 kJ/mol de O_2 (Curtin y Woledge, 1978). Asimismo, pueden compararse los flujos de calor con los flujos iónicos de ciertos transportadores, conociendo la estequiometría del ión respecto del ATP y la entalpía de hidrólisis y resíntesis del ATP, que corresponde a 80 kJ/mol de ATP.

Debido a que el miocardio desarrolla una actividad contráctil ininterrumpida, la energía química consumida durante la contracción no puede demorarse en ser recuperada hasta la finalización del ciclo. Por lo tanto, en el corazón no se ha encontrado una clara distinción temporal entre el calor activo proveniente del consumo y el “metabolismo de recuperación” proveniente de la resíntesis de los compuestos de alta energía, que está contenido en H_a (Gibbs y Chapman, 1979).

En el músculo cardiaco la energía total transformada es máxima cuando el músculo se contrae isométricamente (Gibbs y col., 1988). La energía química consumida durante el evento contráctil es empleada para realizar acortamiento interno a expensas de la extensión del elemento elástico y en parte, liberada en forma de calor (Gibbs y Chapman, 1979; Gibbs, 1987). Generalmente la energía (consumo y resíntesis) vinculada a la generación de fuerza constituye aproximadamente un 70-75 % del total del componente activo, mientras que el 20-30 % restante está asociado a los procesos de activación por unión de Ca^{2+} a sitios específicos (como TnC) y transportes iónicos activos (Gibbs, 2003). El flujo de calor total (H_t) alcanza un estado estacionario que depende de la actividad contráctil y metabólica (frecuencia, longitud diastólica), así como de la homeostasis celular del Ca^{2+} .

Conceptualmente la energía activa miocárdica (H_a) puede ser subdividida en tres diferentes procesos con sus respectivas fracciones de calor, aunque ha tomado tiempo distinguirlas en cada contracción:

a) Dependientes de la generación de fuerza, relacionados con la hidrólisis de ATP actomiosínico.

b) Independientes de la generación de fuerza: asociados a los procesos exotérmicos de unión a los sitios específicos (troponina C y calmodulina) e inespecíficos, y a la remoción iónica activa del citosol por Ca-ATPasas, intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y la Na^+/K^+ -ATPasa (Gibbs y Chapman, 1979),

c) Recuperación metabólica, asociada a las reacciones exotérmicas del metabolismo anaeróbico, aeróbico y fosforilación oxidativa.

Un problema ha sido la distinción cuali- y cuantitativa entre los componentes dependiente e independiente de tensión y su correspondiente recuperación. Ha habido varios intentos y metodologías para separar los componentes de calor dependiente de tensión (THD) de los de calor independiente de tensión (TIH), aunque ambos incluyen la respectiva fracción de recuperación. Los métodos incluyeron la anulación del componente de contracción, ya sea por el empleo de soluciones hiperosmóticas, por gradual acortamiento o rápida liberación del músculo de su longitud inicial en papilares cardíacos por el método de termopilas (Gibbs y col., 1988). Alternativamente se lograron separar los componentes en contracciones aisladas o estacionarias de corazones enteros perfundidos en un calorímetro de flujo similar al empleado en esta tesis, en presencia de desarrollo contráctil (Ponce-Hornos y col., 1995). En estas condiciones se encontró además un componente de calor que aparecía muy demorado en una contracción aislada, y como una fracción suprabasal que se sumaba al Hr en el tren estacionario de latidos, y que se caracterizó como un componente de actividad mitocondrial altamente dependiente del oxígeno y de la frecuencia (Ponce-Hornos y col., 1995). Este componente se exacerbó especialmente por aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ en medio despolarizante que estimulaba el influjo del ión (Consolini y col. 1997).

3.d. Consideraciones bioenergéticas del ciclo de Ca^{2+} mitocondrial:

El proceso de ciclaje de Ca^{2+} mitocondrial involucra continuos flujos de Ca^{2+} , de Na^+ y de H^+ conducidos por la cadena respiratoria (Crompton, 1990). El influjo de Ca^{2+} disipa el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$ cercano a -180 mV), mientras el eflujo disipa el gradiente de H^+ (ΔpH) indirectamente vía los intercambios $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NXCm) y Na^+/H^+ (Crompton, 1990). Además, el bombeo de H^+ de la F_1F_0 -ATP-sintasa puede contribuir a mantener el $\Delta\Psi_m$ durante la captación de Ca^{2+} a expensas de la hidrólisis del ATP, por lo que el ciclaje de Ca^{2+} mitocondrial es energéticamente caro. Sin embargo, diversos trabajos mostraron que el aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (propia del aumento en la demanda cardíaca) originó consecuentes aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, con la activación de las enzimas del ciclo de Krebs y la producción de NADH, todos ellos establecidos lentamente en comparación a las oscilaciones del transitorio de Ca^{2+} citosólico (O'Rourke y Blatter, 2009). De esta forma, los autores proponen que la integración de las señales mitocondriales vía Ca^{2+} permite restaurar los niveles de NADH. Experimentos en los que se inhibió el uniporter o se aumentó la $[\text{Na}^+]_i$ impulsando al NXCm, condujo a aumentada oxidación del pool de NADH por la mayor postcarga cardíaca, activando la fosforilación oxidativa para mantener el balance (Liu y O'Rourke, 2008). Todos estos procesos activos resultan exotérmicos y por lo tanto tienen su contribución a la respuesta calorimétrica del músculo cardíaco.

3.e. Aplicación de la calorimetría al estudio de la isquemia/reperfusión y al rol mitocondrial en corazones de rata y cobayo:

Con el método de calorimetría de corazones enteros perfundidos se lograron avances en el estudio de la isquemia/reperfusión en el laboratorio previos al desarrollo de esta tesis, que en buena parte sirvieron como marco de comprensión del proceso de I/R. Especialmente, contribuyeron al conocimiento del rol de las mitocondrias en el proceso de disfunción por I/R con atontamiento cardíaco. Como primer

anteriormente, se encontró que la isquemia de no-flujo reducía los componentes de calor independiente de tensión asociados a los movimientos de Ca^{2+} de contracciones aisladas de rata, mientras estos no se afectaban en un modelo de hipoperfusión, mientras en ambos modelos se reducía el componente de calor asociado al metabolismo mitocondrial (Consolini y col. 1999). En condiciones de estimulación estacionaria a baja temperatura (30°C) se evaluó el efecto cardioprotector de una solución de alta $[\text{K}^+]_e$ y baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (componente esencial de las cardioplejias utilizadas en cardiología para detener el corazón en diástole previo a una intervención quirúrgica). Este pretratamiento (CPG) protegió al miocardio de la contractura diastólica de I/R y mejoró la recuperación contráctil en la reperfusión con activación de la remoción del Ca^{+2} vía el SL-NXC (Consolini y col. 2004). Además, el tratamiento cardiopléjico incrementó el rol de las mitocondrias como organela donadora de Ca^{+2} al reservorio del RS vía el NXCm en corazones de rata adulta, contribuyendo así a la recuperación contráctil postisquémica (RCPI). La inhibición del NXCm por $10\ \mu\text{M}$ clonazepam disminuyó la RCPI por reducción de la fracción de Ca^{+2} del RS liberable por cafeína (Consolini y col. 2007). Las intervenciones que aumentan la $[\text{Ca}^{+2}]_m$ durante el tratamiento con CPG (como el inhibidor del canal mK_{ATP} 5-HD) elevaron el flujo de calor de reposo (Hr) sin modificar la RCPI pero previnieron el efecto negativo de la inhibición del mNCX (Ragone y Consolini, 2009). En cambio, las intervenciones que reducen el contenido de Ca^{+2} mitocondrial (bloqueo del uniporter de Ca^{+2} con Ru-360 o apertura del mK_{ATP} con diazóxido para reducir el gradiente del uniporter) redujeron la RCPI y aumentaron el flujo de calor total (Ht), reduciendo la economía del corazón post-isquémico. Esto evidencia efectos opuestos del bloqueo de los dos transportadores mitocondriales, mK_{ATP} y NXCm, y un rol de la $[\text{Ca}^{+2}]_m$ en la contribución del Ca^{+2} mitocondrial al RS, el cual en última instancia determina la RCPI (Ragone y Consolini, 2009). Contrariamente, los corazones de rata neonata no experimentaron protección post-isquémica por la cardioplejia de $25\ \text{mM}$ $[\text{K}^+]_o$ y $[\text{Ca}^{+2}]_o$ $0.5\ \text{mM}$ (CPG) en el modelo de atontamiento como los de rata adulta, pero sí cuando se mantuvo la $[\text{Ca}^{+2}]_o$ en $2\ \text{mM}$. Mediante el uso de clonazepam y

KB-R7943 (inhibidor no selectivo del uniporter y NXC-SL) se demostró un comportamiento diferente en los corazones de rata neonata de 10-12 días de edad (que tienen escaso desarrollo del RS comparado con los de rata adulta), respecto de la recuperación contráctil y energética (Consolini y Bonazzola, 2008). La CPG-2 mM Ca^{2+} y el KB-R7943 protegieron a los corazones neonatos con mejoría de la RCPI bajo condiciones isotónicas, pero no isométricas, concluyendo que en CPG-baja $[\text{Ca}]_o$ se estimula la captación mitocondrial de Ca^{2+} vía uniporter lo cual reduce el Ca^{2+} disponible para el RS y la RCPI. En cambio, a 2 mM Ca^{2+} la CPG estimuló la recarga del reservorio del RS, como en los corazones de rata adulta. Los resultados descriptos muestran que las mitocondrias pueden variar su grado de participación como receptor o dador de Ca^{2+} dependiendo de la interacción con el citosol o el RS, lo cual depende de varios factores que regulan la homeostasis de Ca^{2+} . Para dilucidar los efectos de la CPG sobre el Ca^{2+} celular, se midieron los cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico y mitocondrial de cardiomiocitos de rata adulta en normoxia, mediante microscopía confocal, evaluando la hipótesis del aporte de Ca^{2+} mitocondrial al RS. En cardiomiocitos de rata la CPG (25 mM K-1 mM Ca) aumentó los niveles de Ca^{2+} libre citosólico y mitocondrial, que decayeron exponencialmente excepto cuando se inhibió la SERCA con tapsigargina, la cual elevó lentamente el nivel de Ca^{2+} mitocondrial. La misma intervención aumentó la presión diastólica de los corazones, la cual fue más incrementada por el bloqueo del uniporter con KB-R7946, ambos con una leve reducción del flujo de calor de reposo (Hr) (Consolini y col. 2011). Estos resultados avalaron la hipótesis de que en corazones de rata adulta la CPG aumentaría el rol mitocondrial como reservorio y fuente lenta de Ca^{2+} en competencia con el RS y con creciente rol cuando éste es no funcional.

La misma hipótesis se evaluó en corazones enteros de cobayo sometidos a I/R y en cardiomiocitos de cobayo, donde la CPG protegió reduciendo la contractura diastólica y aumentando la RCPI. Sin embargo, el bloqueo del NXCm por clonazepam o la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ por diazóxido, ambos en CPG, mejoraron la RCPI a diferencia de lo obtenido en rata. Por

otra parte, el aumento de la $[Na^+]_i$ con ouabaína (para incrementar la extrusión de Ca mitocondrial vía mNCX) redujo el efecto protector de clonazepam. En los cardiomiocitos de cobayo bien perfundidos la CPG elevó las señales de Ca^{2+} citosólica y mitocondrial como en la rata, pero el bloqueo del mNCX redujo la señal mitocondrial y aumentó la citosólica, mientras el agregado de ouabaína invirtió este efecto en la señal de $[Ca^{2+}]_m$, sugiriendo que el mNCX puede variar su dirección predominante dependiendo de los gradientes iónicos. Así las mitocondrias en corazones de cobayo juegan un mayor papel en la captación del Ca^{2+} citosólico que en la cesión al RS, diferenciándose de los corazones de rata. Esto acuerda con reportes de que la captación mitocondrial de Ca^{2+} en cobayos depende de la velocidad de liberación del RS durante el transitorio citosólico (Kohlaas y Maack, 2010). Estos resultados sugirieron que las diferencias entre las respuestas de rata y cobayo dependen de la $[Na^+]_i$ y de la carga de Ca^{2+} del RS, los cuales afectan el rol mitocondrial en la homeostasis del Ca^{2+} (Ragone y col. 2013). Las diferencias de comportamiento son de importancia porque el corazón humano sería más parecido al de cobayo que al de rata en el rol RS/sarcolema sobre la homeostasis de Ca^{2+} (Terracciano y col. 1997; Bers 2001; Guo y col. 2011), pero estados fisiopatológicos que afectan a la $[Na^+]_i$ y carga de Ca^{2+} del RS (como la I/R) podrían cambiar el comportamiento de un corazón “atontado” frente a drogas empleadas como protectoras (ouabaina, clonazepam, diazóxido).

4. EFECTOS DE LA GENISTEINA:

La genisteína (GST) es un fitoestrógeno extraíble de la soja al que se le atribuye protección cardiovascular, en parte por sus efectos favorables sobre el perfil lipídico (Anderson y col., 1995; Anthony y col., 1998) y por sus propiedades vasodilatadoras (Figtree y col., 2000, Li y col., 2004).

Si bien se han descrito algunos efectos cardíacos, al momento no se ha establecido si ejerce efectos cardioprotectores frente a la I/R. Se describen a continuación los antecedentes acerca de sus efectos cardíacos.

4.a Efectos mediados por la vía de las Tirosinas Kinases:

Se ha evidenciado que GST es capaz de inhibir la vía de las Tirosinas Kinases (Akiyama y col., 1987; Hasinoff y col., 2008). Esta vía participa fosforilando residuos de tirosinas de una gran variedad de canales iónicos, entre ellos se encuentran canales de K^+ gatillados por voltaje, corriente rectificadora “inward” de K^+ , canales de Ca^{2+} de tipo L (LCC) sean estos activados por voltaje o por receptor en el músculo liso (Davis y col., 2001). De esta manera está involucrada en el acoplamiento excito-contráctil en células del musculo liso vascular (Hollenberg, 1994; Watts y col., 1996; Jansen y col., 2001;), aunque su rol en el músculo cardíaco aún no está completamente claro (Keef y col., 2001).

En la bibliografía ha sido también discutido cuáles de los efectos de GST son mediados por la vía de las TK. Las evidencias se resumen en cada aspecto a continuación.

4.b Efectos en la corriente de Ca^{2+} :

En cardiomiocitos de ratas jóvenes (10 a 18 días) GST redujo la corriente de Ca^{2+} con una CI_{50} de 11 μ M. Sin embargo, también su análogo estructural daidzeina generó este efecto, a pesar de no tener acción inhibitoria de TK (Yokoshiki y col., 1996). En otro trabajo Katsube y col. (1998)

evaluaron los efectos de GST sobre los canales de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados de rata, comparando las diferencias de efecto entre ratas adultas y neonatas. Si bien GST inhibió la corriente de Ca^{2+} en ambos preparados, los autores encontraron que el efecto fue del 43,3% en ratas neonatas y del 30,6 % en adultas. Los autores adjudicaron estas diferencias a la conocida prevalencia de la actividad de TK en ratas neonatas. Por lo tanto, en corazones de rata el efecto bloqueante de los LCC sería parcialmente debido a la inhibición de TK. Por otra parte, en cardiomiocitos de cobayo Belevych y col. (2002) encontraron que GST 50 μM inhibió la amplitud de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales LCC, utilizando la técnica de patch-clamp. El grado de inhibición de estos canales fue proporcional a la concentración de GST aplicada y obtuvieron una CI_{50} de $20 \pm 3.5 \mu\text{M}$. Interesantemente, el efecto de GST se observó si GST se administraba de manera extracelular pero no si se administraba directamente en el lado citosólico, por lo que este resultado no estaría de acuerdo con un efecto mediado por la inhibición de las TK. Esto fue confirmado cuando los autores agregaron peroxivanadato (un potente inhibidor de las tirosinas fosfatasa) junto con GST, sin lograr revertir los efectos inhibitorios de GST. Teniendo en cuenta estos resultados, los autores realizaron una intervención muy interesante: agregaron $\text{ATP}\gamma\text{S}$ antes del agregado de GST. El $\text{ATP}\gamma\text{S}$ puede sustituir al ATP en las reacciones de quinasas, de esta forma los residuos de serina, treonina o tirosina de las proteínas no pueden ser desfosforilados por las fosfatasa. Con esta intervención no lograron revertir el efecto de GST, apoyando la hipótesis de que el efecto no sería a través de la inhibición de las TK. Sumado a estos resultados, los autores no lograron mimetizar el efecto de GST con lavendustrin A (un potente inhibidor de la vía de las TK que no está relacionado estructuralmente con GST) apoyando fuertemente la hipótesis de que en el corazón de cobayo el bloqueo de los canales de Ca^{2+} L por GST no está relacionado con la vía de las TK (Belevych y col, 2002).

Sin embargo, dos años más tarde, Ji y col. (2004a), realizaron un trabajo muy similar pero con resultados contrarios. Estos autores evaluaron los efectos de GST sobre las corrientes de Ca^{2+} en

cardiomiocitos de cobayo mediante el método de patch clamp. A las 3 concentraciones evaluadas de GST (10, 50 y 100 μM) observaron un efecto inhibitorio de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales LCC, proporcional a la concentración. Nótese que hasta aquí los resultados estaban de acuerdo con los publicados por Belevych y col. (2002). Sin embargo, Ji y col. (2004a) encontraron que daizeina (el análogo estructural sin actividad inhibitoria de TK) no inhibió los canales Ca^{2+} tipo L y el inhibidor de las tirosinas fosfatasas (TP) ortovanadato de sodio (OVN) logró revertir el bloqueo generado por GST, demostrando que los efectos son mediados a través de la inhibición de TK. Una variable que podría explicar las diferencias entre los dos últimos trabajos mencionados es que los autores no tuvieron en cuenta la diferencia de género al comparar los efectos de GST, y la participación en mayor o menor medida de la vía de las TK en el bloqueo de los canales de Ca^{2+} podría estar influida por la mayor o menor proporción de uno de los géneros.

Afortunadamente, Liew y col. (2003) tuvieron en cuenta la diferencia de género y evaluaron los efectos de GST en cardiomiocitos de cobayo macho. Estos autores encontraron que GST (10 y 40 μM) aumentó el acortamiento celular y los transitorios de Ca^{2+} . A pesar de tener un efecto inotrópico positivo, estos autores encontraron que GST también inhibe la corriente de Ca^{2+} L, dando la pauta de que ambos mecanismos opuestos son desencadenados por GST. Además, el agregado de bpV (phen) (un inhibidor de las TP), logró revertir en parte el efecto inotrópico positivo de GST, evidenciando la participación de la vía de las TK en el efecto inotrópico positivo de GST en corazones de cobayo macho.

Con el fin de evaluar los efectos de GST sobre la homeostasis de Ca^{2+} , Ji y col (2004b) midieron el contenido de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}_i]$ en cardiomiocitos de cobayo mediante microscopía confocal. GST (10, 20 y 40 μM) generó una significativa disminución en la $[\text{Ca}^{2+}_i]$, que fue dependiente de la concentración. Sorprendentemente, los autores encontraron que dicha inhibición se observó tanto con solución Tyrode normal como con solución Tyrode libre de Ca^{2+} , y esto permitió interpretar que GST reduciría el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular como así

también la salida de Ca^{2+} desde el RS. En solución Tyrode normal, el efecto inhibitorio de GST fue marcadamente atenuado por el inhibidor de TP ortovanadato de sodio, evidenciando que el efecto inhibitorio de GST sobre el influjo de Ca^{2+} se debe a su efecto inhibitorio sobre la vía de las TK. Además GST redujo marcadamente el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado por el compuesto Bay K8644 (un agonista de los canales de Ca^{2+} de tipoL), lo cual comprueba su efecto inhibitorio sobre los LCC. Congruentemente, en músculos papilares aislados de cobayo GST redujo la duración del potencial de acción, de manera dependiente de la concentración (Ma y col., 2002), lo cual es compatible con la inhibición de los canales LCC.

4.c Efectos sobre el contenido de calcio sarcoreticular:

Liew y col. (2003) buscaron un mecanismo que explicara el aumento en el acortamiento celular generado por GST en cardiomiocitos de cobayo. Estos autores encontraron que GST 40 μM generó un aumento en la cantidad de Ca^{2+} liberada desde el RS por el agregado de pulsos de 10 mM caféina. Sin embargo, en otro trabajo realizado en cardiomiocitos de cobayo Ji y col (2004b) encontraron que GST 40 μM generó una significativa disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuantificada mediante microscopía confocal en una solución Tyrode libre de Ca^{2+} , sugiriendo que GST inhibió la salida de Ca^{2+} desde el RS. Estos autores también encontraron que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado por dosis bajas de Ryanodina en una solución libre de Ca^{2+} fue atenuado por GST (Ji y col., 2004b).

Contrariamente, Li y col. (2008) evidenciaron un efecto inotrópico positivo de GST (a partir de una concentración 1 μM) en músculos papilares de ventrículo izquierdo de cobayo, y adjudicaron este efecto a la inhibición de la vía de las TK, asociado a modulación de PI3K, y a la producción de AMPc, lo cual facilita la movilización de Ca^{2+} del RS.

4.d Efectos sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal:

Liew y col. (2003) encontraron que en cardiomiocitos de cobayo GST redujo la constante de relajación en la contracción generada por el agregado de cafeína, por lo que sugirieron que GST reduce la actividad del NXC-SL. Pero el efecto inotrópico positivo de GST evidenciado por Li y col. (2008) en músculos papilares de ventrículo izquierdo de cobayo no pudo ser revertido por KB-R7943, una droga considerada inhibidora del NXC-SL. Sin embargo, es conocido que el KB-R7943 también inhibe al uniporter mitocondrial (UCam) (Santo-Domingo y col., 2007) mecanismo que podría participar también en la lenta relajación de la contractura inducida por cafeína, por lo que el efecto de GST se podría extender a las mitocondrias.

4.e Efectos sobre los miofilamentos:

En cardiomiocitos de cobayo, GST aumentó el acortamiento celular, mientras que tuvo poco efecto sobre los transitorios de Ca^{2+} (Liew y col., 2003). Además durante una estimulación sostenida y en presencia de tapsigargina (inhibidor irreversible de la SERCA) GST mantuvo su efecto inotrópico positivo, por lo que Liew y col. (2003) sugirieron que GST aumentaría la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos.

Schwab y col (2012) estudiaron los efectos de GST sobre el proteoma cardíaco en ratones hembra ovariectomizados. La administración de GST oral modificó la composición de muchas proteínas contráctiles y del citoesqueleto, y aumentó la fosforilación de la cadena liviana de la miosina (CLM), debido a un incremento de la actividad de la quinasa de la CLM y la inhibición de la fosfatasa. Estos efectos sensibilizantes de los miofilamentos podrían explicar los efectos inotrópicos positivos de GST en corazón de cobayo, aun cuando se reduzca el influjo de Ca^{2+} .

4.f Efectos de genisteína sobre los receptores estrogénicos:

Debido a que GST es un fitoquímico cuya estructura se asemeja a la de los estrógenos endógenos (ver fig 7), varios autores han evaluado su habilidad para actuar sobre los receptores estrogénicos. Liew y col. (2003) encontraron que en cardiomiocitos de cobayo macho el agregado de 17β estradiol reducía el acortamiento celular, efecto opuesto al que generaba una concentración equimolar de GST en las mismas condiciones experimentales. Por lo tanto, el efecto inotrópico positivo de GST no parece ser mediado por el receptor estrogénico. Acuerda con esto el hecho de que en músculos papilares de ventrículo izquierdo de cobayo, el efecto inotrópico positivo de GST (a concentración mayor de $1\ \mu\text{M}$), no pudo ser reducido por ICI 182780, un antagonista específico del receptor estrogénico α y β (Li y col., 2008).

Si bien en corazones aislados de rata GST había resultado inotrópica negativa, cuando éstas fueron ovariectomizadas (OVX) la aplicación de GST aumentó la contractilidad en el rango de 10 a $50\ \mu\text{M}$, pero la redujo a concentraciones más altas (100 y $150\ \mu\text{M}$) (Al-Nakkash y col., 2009). Esto muestra la complejidad de efectos y cierta interacción con el estado hormonal.

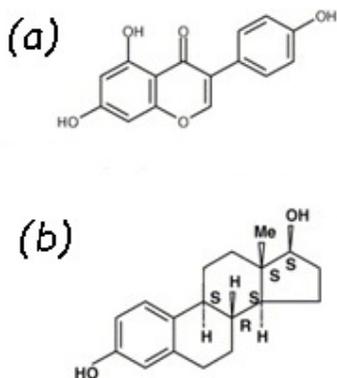


Fig. 7: Estructura molecular de genisteína (a) y estradiol (b). Observar la parcial semejanza estructural

Adaptado de McClain y col., 2006.

4.g Efectos en otras vías asociadas a tirosina-kinasas:

En cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de rata, GST 10 μ M no generó aumento en la apoptosis en ningún género. Sin embargo, la combinación de 10 μ M de GST y concentraciones fisiológicas de estradiol (100 pM) generaron un aumento en la muerte celular de cardiomiocitos de ratas macho pero no en hembra (Haines y col., 2012). Estos autores también demostraron que en cardiomiocitos aislados de rata GST es capaz de inhibir receptores asociados a las TK tanto en macho como en hembra. Sin embargo, algunos de estos receptores fueron inhibidos sólo en macho (como el receptor insulínico, Tie-2, EphA1, ErbB4 y c-Ret), lo que lleva a suponer que estos receptores son los responsables de las diferencias de género en los efectos de GST (Haines y col., 2012).

4.h Efectos de genisteína en modelos in vivo:

En ratones machos alimentados con una dieta suplementada con GST y daidzeína, tratados durante 28 días con sunitinib 40 mg/Kg/día (compuesto que se une a múltiples receptores de TK inhibiendo señales celulares) se encontró un aumento considerable en la letalidad, reducción de la función cardíaca y dilatación ventricular de los corazones in situ respecto de los tratados sólo con sunitinib y alimentados con una dieta carente de dichos fitoestrógenos (Harvey y col., 2015). Además estos autores encontraron que los cardiomiocitos aislados de rata tratados con GST conjuntamente con sunitinib exhibieron mayor inhibición contráctil y un aumento en la apoptosis comparado con los tratados solamente con sunitinib. Estos efectos negativos de GST fueron adjudicados a la inhibición de 21 subtipos diferentes de receptores de TK (Harvey y col., 2015).

En ratones sometidos a ovariectomía (OVX), GST a las dosis de 3 y 10 g/Kg de alimento revirtió la caída en la relación entre el peso del corazón y el peso corporal causada por la

ovariectomía (Nguyen y col., 2012). Además los autores encontraron un aumento en la expresión del factor de crecimiento insulínico (IGF1) y de miocardina por las mencionadas dosis de GST respecto de los bajos niveles alcanzados en los ratones OVX. Sin embargo, no encontraron un aumento en la expresión de los receptores estrogénicos (Nguyen y col., 2012).

4.i Efectos de genisteína en modelos que mimetizan patologías cardíacas:

En modelos de isquemia/reperfusión, también se comparó el efecto de GST con el de estrógenos. Tissier y col. (2007) encontraron que la administración intravenosa (IV) de GST (100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) aplicado como postcondicionamiento redujo el tamaño de infarto generado por 20 minutos de oclusión de la arteria coronaria en corazones de conejo, y también observaron cardioprotección con la administración IV de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de 17- β estradiol. Este efecto cardioprotector de GST fue bloqueado por el antagonista no selectivo del receptor estrogénico fulvestran, y por wortmanina (un inhibidor de PI3K). Esto sugiere que el efecto cardioprotector en el infarto se debía a la activación del receptor estrogénico y la vía de PI3K. Estos autores demostraron además mediante la técnica Western blots que los corazones tratados con GST tenían un aumento significativo en la fosforilación de la quinasa cardioprotectora Akt (Tissier y col., 2007).

En corazones aislados de ratas Sprague-Dawley sometidas a isquemia de 45 minutos y 5 horas de reperfusión la administración de GST por vía IV luego de la oclusión coronaria redujo el área de infarto. Este efecto cardioprotector se observó en dosis entre 0,24 y 1 mg/Kg de GST, pero a dosis mayores a 1 mg/Kg se perdió su efecto cardioprotector (Deodato y col., 1999).

En otra patología cardíaca como es la hipertrofia, considerando que la GST está altamente presente en la soja, es interesante el hallazgo de Stauffer y col., (2006) que encontraron que al cambiar de una dieta basada en soja a una dieta basada en caseína se mejoró la función cardíaca en

un modelo de cardiomiopatía hipertrófica (HCM) en ratones transgénicos. La primera dieta rica en soja generaba dilatación ventricular y falla cardíaca en M, pero no en H, evidenciando nuevamente diferencias de género para los efectos de GST.

Por otra parte, en los ratones macho con HCM, una dieta suplementada durante meses con GST y Daizeina redujo significativamente la función contráctil (medida a través de un ecocardiograma), sin embargo este tratamiento no afectó a las hembras (Haines y col., 2012). Este efecto fue asociado con un aumento en las dimensiones internas del ventrículo izquierdo durante la diástole y en varios marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca (factor natriurético atrial, β miosina de cadena pesada, α actina esquelética). Además, los fitoestrógenos aumentaron 3 veces el depósito de colágeno en el corazón, y aumentaron varios marcadores de apoptosis, entre ellos Bax (un intermediario pro-apoptótico) y caspasa-9 (indicador de apoptosis iniciada por disfunción mitocondrial). Además, luego de realizar gonadectomía a ratones con HCM de ambos géneros, los autores lograron proteger a las hembras pero no a los machos mediante la administración de estradiol, sugiriendo que las diferencias de efecto se deben a otros factores diferentes de los estrógenos plasmáticos (Haines y col., 2012).

En otro trabajo, Maulik y col. (2012) encontraron que GST era capaz de revertir la hipertrofia cardíaca generada por la administración crónica de isoproterenol en ratas Wistar macho. Este efecto fue bloqueado por L-NAME, sugiriendo que este efecto benéfico es mediado por la activación de la NOS.

PROBLEMA DE ESTUDIO:

A pesar de que se ha adjudicado a la GST la protección cardiovascular, las evidencias bibliográficas no son concluyentes en cuanto a sus efectos a nivel cardíaco y a diferencias de especie y de género en modelos de isquemia/reperfusión reversible (atontamiento). Establecerlo permitirá predecir si el fitoestrógeno podría ser eficaz para prevenir la disfunción miocárdica en una eventual, incipiente y transitoria afección coronaria.

HIPOTESIS:

Puesto que GST reduce el influjo de Ca^{2+} y mejora la función del RS en preparados de miocardio no isquémico, su administración podría reducir la sobrecarga citosólica de Ca^{2+} y mejorar la fracción liberada desde el RS en miocardios con cierto grado de atontamiento por estar expuestos a isquemia de no-flujo o hipoperfusión. Con ello, mejoraría la recuperación contráctil y la economía muscular cardíaca, reduciendo la disfunción.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos de genisteína sobre la homeostasis de Ca^{2+} miocárdica a través de las respuestas mecánico-energéticas de corazones aislados expuestos a dos modelos de atontamiento:

- a) isquemia de no-flujo/reperfusión, e
- b) hipoperfusión/reperfusión,

considerando las diferencias de especie (cobayo vs rata) y de género.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Para alcanzar el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a. Evaluar los efectos del fitoestrógeno genisteína en los modelos de atontamiento por isquemia de no-flujo/reperfusión (I/R) ya caracterizados en el laboratorio en ratas y en cobayos mediante enfoque mecánico-energético.
- b. Comparar los efectos de genisteína en el modelo de I/R según el género y la especie
- c. Comparar los efectos de genisteína en corazones de rata en I/R con diversos grados de atontamiento y diferente vía de administración (perfusión *ex vivo* vs. administración intravenosa)
- d. Caracterizar los efectos y mecanismos participantes en un modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión (HIP/R) en corazones de rata.
- e. Estudiar los efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión (HIP/R) en corazones de rata.
- f. Comparar los efectos de la perfusión *ex vivo* de genisteína con los de su administración *in vivo*
- g. Evaluar los mecanismos implicados en los efectos de genisteína mediante el uso de intervenciones farmacológicas relativamente selectivas por los transportadores celulares.
- h. Contribuir a la comprensión del mecanismo evaluando los cambios producidos en las concentraciones de calcio de cardiomiocitos aislados mediante microscopía confocal

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PREPARACIONES BIOLÓGICAS

1.a. Animales de experimentación empleados:

La tesis se realizó empleando ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, provenientes por donación del bioterio de Laboratorios Bagó, y cobayos de ambos sexos adquiridos en veterinarias de la ciudad. En ambos casos, los animales se mantuvieron hasta el día del experimento en el Bioterio de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas, con ciclos de 12 hs luz/12 hs oscuridad, en jaulas aprovisionadas con el correspondiente alimento estándar y agua ad-libitum. La estadía, tratamiento, uso de la mínima cantidad necesaria, sujeción, anestesia y eutanasia de los animales se realizó bajo las reglas éticas internacionalmente aceptadas (Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de la Agencia Nacional de Medicamentos y Accesorios Tecnológicos (ANMAT); Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publicada por el United States National Institute of Health (NIH) Publication No. 85-23, revisada en 1985, 1996 y 2010; y la Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

1.b. Corazones aislados de rata:

Ratas Sprague-Dawley de ambos sexos (200 a 250 g de peso) se anestesiaron con sobredosis de pentotal (60 mg/kg, vía intraperitoneal, i.p.) y se heparinizaron (HNF sódica 2000 UI). Después de detectar la pérdida de reflejos y del tono muscular esquelético, el corazón fue rápidamente removido por toracotomía y sumergido en solución Krebs. Inmediatamente se perfundió en forma retrógrada mediante la técnica de Langerdorff con un flujo constante de 6 ml/min mediante bomba peristáltica (Gilson Minipuls, France). El flujo de perfusión se calculó mediante la siguiente ecuación: $CF = 7.43 * HW^{0.56}$ (donde CF es el flujo coronario y HW es el peso del corazón), que es válida para diversas especies y es la recomendada para prevenir el edema cardíaco causado por el alto flujo de perfusión con solución salina como el Krebs (Dhein., 2005).

Se empleó una técnica de preparación previamente descrita (Ponce-Hornos y col., 1995; Ponce-Hornos y col., 1999; Consolini y col., 2001; Consolini y col., 2004; Consolini y col., 2007; Ragone y Consolini, 2009) que constó de los siguientes pasos: remoción de ambas aurículas y eliminación de las contracciones espontáneas mediante pequeñas compresiones o cortes en el tabique interventricular, introducción de un balón de látex (sujeto a cánula conteniendo agua) dentro del ventrículo izquierdo el cual se cerró por medio de una sutura, colocación de dos electrodos (uno en el ventrículo derecho y otro en el ápice), e introducción del corazón dentro del interior de la cámara de un calorímetro de flujo previamente estabilizado a 30.0 o 37.0 ± 0.01 °C. Los corazones de rata fueron estabilizados con estímulo eléctrico de 5 V- 5 ms mediante un estimulador eléctrico (Letica 12406) a frecuencia constante de 1 , 2 o 3 Hz (según el protocolo empleado (ver detalles más adelante).

1.c. Corazones aislados de cobayo:

Se anestesiaron cobayos (200 – 300 g de peso) con inyección intraperitoneal de uretano 25% (0.6 ml/ 100 g) y se heparinizaron (HNF sódica 2000 UI). El uretano proporciona mejor relajación del músculo esquelético del cobayo que el pentotal (Ragone y col., 2013). El corazón fue rápidamente removido por toracotomía y sumergido en solución Krebs. Inmediatamente se perfundió en forma retrógrada mediante la técnica de Langerdorff con un flujo constante de 6 ml/min mediante bomba peristáltica (Gilson Minipuls, France). A diferencia del corazón de rata, en el de cobayo se conservaron las aurículas y la frecuencia espontánea (2.29 ± 0.08 latidos por minuto, $n= 37$). Posteriormente se introdujo un balón de látex (sujeto a una cánula conteniendo agua) dentro del ventrículo izquierdo, cerrándolo por medio de una sutura. Seguidamente, se introdujo el corazón dentro del interior de la cámara del calorímetro de flujo, al igual que el corazón de rata. Una vez que se colocó el corazón dentro de la cámara, esta se cerró rápidamente y se sumergió el calorímetro en un baño de agua mantenido a temperatura controlada de 30 ± 0.01 °C.

1.d. Aislamiento de cardiomiocitos de rata:

Se anestesiaron con pentotal las ratas Sprague-Dawley (200-250 g de peso). El corazón fue rápidamente removido por toracotomía y perfundido mediante la técnica de Langendorff durante 5 minutos con solución Krebs modificada libre de Ca^{2+} (Krebs-HEPES-24, compuesta en mM por: 4.4 KCl, 1.0 NaH_2PO_4 , 5 MgCl_2 , 24 HEPES, 22 dextrosa, 20 taurina, 5 creatina, 0.5 piruvato sódico, ajustada con NaOH a pH 7.4 y burbujeada con O_2 100%). Luego durante 14 minutos se perfundió la misma solución a la que se le agregó 50 μM CaCl_2 , 0.1 mg/mL de colagenasa P (Roche) y 0.02 mg/mL protease XIV (Sigma, USA), tal como ha sido previamente descrito (Consolini y col., 2011; Ragone y col. 2013). Todas las soluciones fueron burbujeadas con O_2 y mantenidas a 37 °C. Luego las enzimas se lavaron durante 5 minutos con la solución conteniendo 50 μM CaCl_2 y finalmente los ventrículos fueron removidos, cortados en piezas y agitados suavemente en la solución de bajo- Ca^{2+} durante 10 min y filtrados. La concentración de Ca^{2+} fue elevada en pasos hasta 1 mM y los miocitos fueron mantenidos por hasta 6 horas en esta solución buffer salina-HEPES.

2. MEDICIONES MECÁNICO-CALORIMÉTRICAS EN CORAZONES ENTEROS PERFUNDIDOS

En ambas preparaciones de corazón entero el balón intraventricular de volumen regulable fue conectado mediante una cánula llena con agua a un transductor de presión (Bentley DEL900) para el registro continuo de la presión intraventricular durante las contracciones isovolumétricas. El transductor de presión se calibró (en mm Hg) antes de cada experimento. El volumen del balón se aumentó progresivamente en pequeños pasos cada 5 minutos, hasta que en dos sucesivos aumentos no se incrementara la máxima presión desarrollada durante la contracción (P). Este volumen diastólico se mantuvo durante todo el experimento para obtener contracciones isovolumétricas. La señal se amplificó y se registró simultáneamente, ya sea en un polígrafo Beckman R511A (Braintree, MA, USA) con adquisición A/D a un sistema National Instruments P-516, o directamente en un sistema de adquisición de 2 canales (PowerLab 2/26, AD Instruments, Australia). Se registró a frecuencias bajas (1 Hz) o altas (100 Hz) según se estuviera respectivamente en un estado estacionario sin contracciones o durante las contracciones. A partir del registro continuo de presión intraventricular (LVP) se calcularon la máxima presión desarrollada en cada contracción (P) y los cambios en la presión diastólica con respecto a la condición preisquémica con solución Krebs-C (Δ LVEDP), ambas en mm de Hg. Durante la isquemia y la reperfusión la P también fue expresada como el porcentaje del valor preisquémico inicial durante la estabilización en solución Krebs-C. Además, se calculó la integral presión-tiempo (IPt) como el área bajo la curva del registro de presión desarrollada en una contracción, y las máximas velocidades de contracción (+dP/dt) y relajación (-dP/dt) a partir de los máximos y mínimos de la primera derivada del registro de LVP de cada contracción, que luego se normalizaron por la máxima presión desarrollada P (+P= +dP/dt/P y -P= -dP/dt/P, respectivamente). Cada latido fue dividido en 4 períodos de tiempo como se detalla a continuación: t_{c1} : tiempo medido desde el inicio de la contracción hasta el tiempo en que se produce la máxima velocidad de contracción, t_{c2} : tiempo

medido desde la máxima velocidad de contracción hasta la máxima presión desarrollada t_{pp} (tiempo a la presión pico, que comprende $t_{c1} + t_{c2}$), t_{R1} : el período desde el t_{pp} hasta el tiempo de la máxima velocidad de relajación ($-P$) y t_{R2} : tiempo desde $-P$ hasta el final de la contracción. El tiempo de relajación total (t_R) comprende $t_{R1} + t_{R2}$ del latido (ver fig. 8).

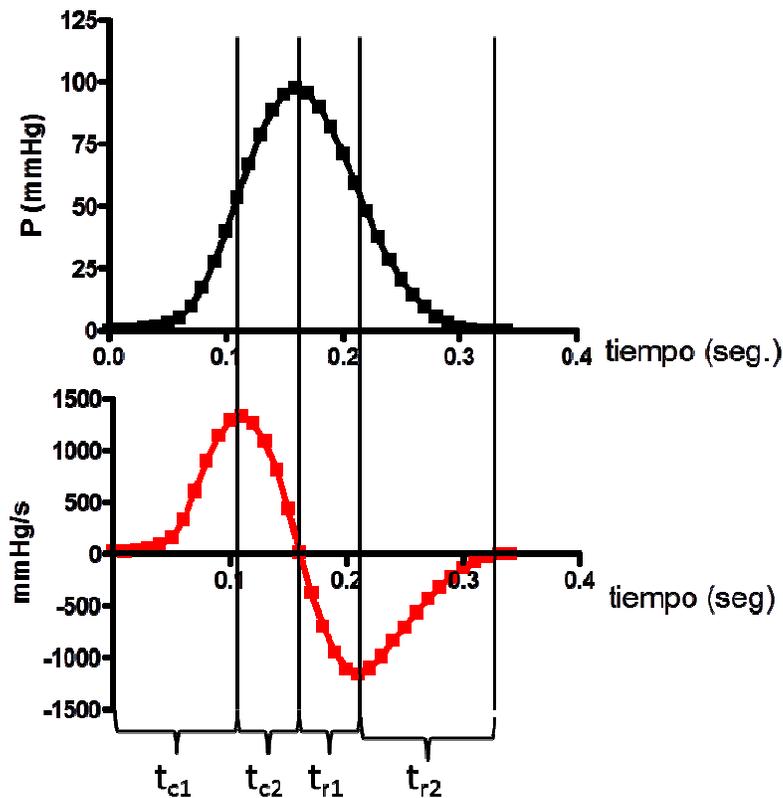


Fig. 8: Registro de P (en mmHg) de un latido cardiaco control en función del tiempo (gráfico superior en color negro). El gráfico inferior (en color rojo) muestra la primer derivada de P o dP/dt (en mmHg/s). Observar los 4 períodos de tiempo correspondientes a la contracción (t_{c1} y t_{c2}) y la relajación (t_{r1} y t_{r2}).

Simultáneamente, se midió el flujo de calor total liberado (Ht , calibrado en mW) por el corazón en el interior de la cámara calorimétrica continuamente durante todo el experimento, tanto en presencia como en ausencia de perfusión, como se explica en el punto siguiente. Dado que los corazones varían su flujo de calor de reposo (Hr) durante el proceso de I/R, no fue posible calcular el calor activo por latido (Ha). Las señales de flujo de calor (Ht) y presión intraventricular (LVP) fueron amplificadas y registradas en simultáneo con la señal de LVP en el mismo sistema de adquisición digital. Para comparar la eficiencia mecánica con la energética, se reemplazó el clásico cálculo de la “economía de la contracción” por el cálculo de la “economía muscular total”. La

primera se define como la relación entre P y la energía de un latido (H_a) (la cual se calcula por diferencia entre el H_t y el H_r multiplicada por el período entre dos contracciones, como se explicó en el punto 3C de la Introducción). Pero como no fue posible estimar el H_r durante la I/R, se calculó un índice de “economía muscular total” a partir de la relación P/H_t donde H_t contiene el flujo de energía basal más el componente activo del corazón.

Al finalizar cada experimento se extrajo el corazón del calorímetro, se pesó el mismo en un recipiente tarado para obtener el peso húmedo con el cual se expresó el flujo de calor (en mW/g) y luego fue llevado a estufa para su secado hasta peso constante. La ausencia de edema significativo fue confirmada en los corazones de rata y de cobayo por el contenido de agua después de someterlos a I/R. Se obtuvieron los siguientes porcentajes de agua:

- $80,88 \pm 0,35$ % (n=78) para los corazones de rata a 30 °C.
- $80,27 \pm 0,34$ % (n=64) para los corazones de rata a 37°C sometidos a 20 min. de isquemia.
- $81,44 \pm 0,55$ % (n=27) para los corazones de rata a 37°C sometidos a 30 min. de isquemia.
- $80,88 \pm 1,01$ (n=56) para los corazones de rata a 37 °C sometidos a hipoperfusión.
- $82,93 \pm 1,23$ (n=39) para los corazones de cobayo a 30 °C.

Estos valores no son diferentes del contenido de agua reportado en corazones de rata sin I/R a 25 °C (Ponce Hornos y col., 1995), lo cual demuestra que en estas condiciones de flujo y de reperfusión el preparado estuvo bien perfundido, sin generar edema importante.

En los corazones en que se estimó la participación del RS mediante reperfusión con una solución de Krebs con 10 mM cafeína y 36 mM Na LVP provocó una contractura proporcional al contenido de Ca^{2+} del RS (Consolini y col. 2007). Esto se analizó registrando la LVP que excede a la línea de base de la condición control preisquémica, y luego se calculó el área bajo la curva de LVP durante la reperfusión por sobre la línea del final de la isquemia.

3. CALIBRACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DEL CALORÍMETRO

El calorímetro de flujo utilizado es análogo al originalmente desarrollado por Ponce-Hornos y col. (1982) y mejorado en sensibilidad (Ponce-Hornos y col., 1995; Consolini y col., 1997; Consolini y col., 2001). Para su uso en la I/R ha sido ampliamente descrito en trabajos previos del grupo (Consolini y col., 2007; Ragone y Consolini 2009; Ragone y col., 2013; Ragone y col. 2015). Está constituido por un cilindro compacto de cobre (rápido conductor de calor) que contiene una cámara interna delimitada por dos módulos Peltier de cerámica paralelos, con 127 unidades termosensibles cada uno (Melchor Thermoelectrics, USA). Éstas registran las variaciones de temperatura entre el interior de la cámara y el baño externo que se mantiene a temperatura constante y las transforma en una diferencia de voltaje que luego es amplificada por el sistema de registro. Mediante este método puede medirse continuamente el flujo de calor liberado en el interior de la cámara, una vez calibrado el sistema (*Fig. 9*).

Aproximadamente 24 horas antes de cada experimento se procede a encender el sistema termostatzante del baño del calorímetro regulado a 30 o 37 ± 0.01 °C. Esta regulación se lleva a cabo por la circulación de agua entre tres baños de un volumen mayor a 10 litros cada uno: uno contiene el termorregulador al ± 0.01 °C (MGW Lauda, Alemania), el segundo contiene los matraces con las soluciones a perfundir y a su vez impulsa la circulación mediante bomba (Grundfos) hacia los otros dos baños, y finalmente el tercer baño contiene al calorímetro. Así se logra una temperatura uniforme en todo el sistema.

Líneas de base y calibraciones:

Antes y después de la colocación del músculo en la cámara se registró el flujo de calor debido a la perfusión, y los cambios producidos respectivamente por la hipoperfusión o por el corte de la misma (dependiendo del protocolo experimental desarrollado ese día). Estos registros se utilizaron como líneas de base para restar al registro general y así, con el factor de calibración, obtener el

flujo de calor (Ht) producido por el corazón a diversos tiempos del protocolo en cada experimento. El mismo día del experimento se calibraron los canales destinados a registrar la presión intraventricular y el flujo de calor liberado. La calibración del calorímetro se realizó al finalizar cada protocolo experimental, mediante la aplicación de una potencia constante de 2 mW (a frecuencia de 2.1 kHz y voltaje subumbral de 1 volt) a través del mismo músculo que actúa como resistencia. Así se obtuvieron en cada experimento dos factores de calibración (expresados en mW/V), uno en condiciones de presencia de la perfusión y otro en ausencia (para los experimentos de isquemia/reperfusión, I/R) o del flujo reducido (a 1.2 ml/min) en experimentos de hipoperfusión/reperfusión (HIP/R). En promedio, el factor de calibración con perfusión fue el doble del factor sin perfusión, de acuerdo al comportamiento previamente descrito, que indica la pérdida de calor ejercida por la perfusión (Ponce-Hornos y col., 1982).



Fig. 9: Foto del calorímetro y del montado del preparado (izquierda) y esquema del calorímetro de flujo (derecha) utilizado en esta tesis.

4. MICROSCOPIA CONFOCAL DE Ca²⁺

Los cardiomiocitos aislados de rata se incubaron con 12 μM Fluo-4 AM (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para medir la señal de calcio libre citosólica, o con 3 μM Rhod-2 AM (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante una hora a 4°C seguido de lavado durante una hora a 37°C para medir solo el calcio libre en el compartimento mitocondrial (Trollinger y col. 1997, Ragone y col. 2013). Luego las células fueron sembradas en una cámara de perfusión adaptada para el microscopio confocal pretratada con laminina (Roche).

Las células fueron perfundidas con solución Krebs-24 HEPES conteniendo 2 mM Ca²⁺ hasta estabilización, y luego con la respectiva solución indicada en el protocolo. Los cambios en la fluorescencia de las células fueron registrados utilizando un microscopio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Los datos fueron analizados utilizando el software Leica LAS AF Lite v. 2.2.1, y expresados como intensidad relativa de fluorescencia media de emisión (F/F₀). Los cambios en F/F₀ fueron calculados a lo largo del experimento usando un ajuste no lineal para la línea de base obtenida en medio control al inicio y final del protocolo, mediante el programa Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Para evaluar el calcio citosólico libre, las células cargadas con Fluo-4 fueron excitadas a 480 nm cada 20 s y se monitorearon los cambios en la fluorescencia de emisión a longitudes de onda más altas a 520 nm, durante los 20 a 25 min que duró el protocolo de perfusión de los miocitos. Para medir el calcio libre mitocondrial, las células cargadas con Rhod-2 fueron excitadas a 540 nm, cada 20s y fueron monitoreados los cambios en la emisión de fluorescencia a longitudes de onda más altas a 590 nm durante los 20 a 25 min del protocolo.

Los protocolos comenzaron con una condición basal de los miocitos en la cámara de perfusión con solución Krebs-24 HEPES (C) durante 5 min (sola o seguida de C con GST 20 μM), seguida

por la perfusión con Krebs-24- HEPES-cafeína 10 mM- Na⁺ 36 mM (con o sin GST 20 μM) durante 10 minutos y finalmente perfundidos durante 5 min con C.

A continuación se esquematizan los protocolos experimentales:

	C	Krebs-24- HEPES-cafeína 10 mM- Na+ 36 mM	C	C-C+caf36Na
C	C + GST	GST-Krebs-24- HEPES-cafeína 10 mM- Na+ 36 mM	C	C-GST- GST+caf36Na

Fig. 10: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata para evaluar los efectos de GST sobre la homeostasis de Ca²⁺.

5. MEDICION DEL GRADO DE INFARTO

Se midió en los corazones al finalizar algunos experimentos (aquéllos corazones en los cuales no se hizo la calibración final del calorímetro porque esta intervención los exponía a una demora e isquemia reiterada). Se limpiaron los corazones de restos de vasos sanguíneos, y aurículas (en cobayos en que no se trabajó a frecuencia espontánea). Luego se cortó transversalmente el corazón en 4 secciones (lonjas) desde el vértice (punta del corazón) hacia la base (normalmente formada por la cara posterior de las aurículas). Se colocaron los trozos en la solución. de cloruro de trifenil tetrazolium (TFT) previamente termostatizada, durante 15 minutos a 37°C (Inserte y col., 2002).

El TFT es un indicador redox utilizado para diferenciar tejidos metabólicamente activos del tejido muerto, tiene la capacidad de reaccionar con la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), para teñir de color rojo las células no infartadas, mientras que las zonas de tejidos muertos conservan color blanco o incoloro, debido a que las enzimas han sido desnaturalizadas o degradadas. El tetrazolio es algo inestable térmica y lumínicamente, por este motivo se evitó la exposición a estos ambientes.

Una vez transcurridos los 15 minutos se tomó una imagen de ambas caras de la pared. Se midió el área total y el área infartada por planimetría utilizando el programa Image-Pro Plus 6.0. Luego se pesaron los trozos individuales de corazón, para normalizar el área infartada por peso en cada lonja y en el ventrículo izquierdo completo. Finalmente se expresó como porcentaje de peso de músculo infartado respecto del peso total de ventrículo izquierdo (% AI/VI).

A continuación se muestra una imagen de una lonja de corazón de rata (izquierda) y de cobayo (derecha), incubados con sc. de cloruro de trifeniltetrazolio luego de ser sometidos a I/R (ver fig. 11).



Fig. 11: Muestra una lonja de un corazón de rata sometido a atontamiento por I/R a 30°C (izquierda), a 37°C (centro) y una lonja de corazón de cobayo sometido a I/R a 30°C (derecha). Los preparados fueron incubados con sc. de cloruro de trifeniltetrazolium durante 15 minutos al finalizar el protocolo experimental. En este caso no se observan significativas zonas de infarto.

6. SOLUCIONES Y DROGAS EMPLEADAS

La solución control de estabilización inicial de corazones enteros (Krebs-C) tuvo la siguiente composición (en mM): 1 MgCl₂, 125 NaCl, 0.5 NaH₂PO₄, 7 KCl, 25 NaHCO₃ y 2 mmol CaCl₂, burbujeado con carbógeno (95% O₂:5% CO₂), para alcanzar un pH de 7.4. La única diferencia entre la solución Krebs-C empleada para corazón de rata y de cobayo fue la concentración de glucosa, que fue de 6 mM para rata y 11 mM para cobayo. La concentración de 7 mM KCl ha sido empleada para evitar la actividad espontánea de los corazones que alteraría la frecuencia regular.

La solución Krebs-caf-bajo Na⁺ se obtuvo cambiando las concentraciones de NaCl del Krebs-C a 10,5 mM de NaCl, y manteniendo la osmolaridad con el agregado de 217 mM de sacarosa. Luego se agregó cafeína hasta alcanzar una concentración de 10 mM.

La solución de aislamiento para cardiomiocitos fue la siguiente: (en mM): 126 NaCl, 4.4 KCl, 1.0 NaH₂PO₄, 5 MgCl₂, 24 HEPES, 22 dextrose, 20 taurine, 5 creatine, 0.5 piruvato de sodio, ajustado con NaOH a pH 7.4 y burbujeada con O₂ 100%. La solución de Krebs-24- HEPES se preparó con las siguientes concentraciones (en mM): 126 NaCl, 4.4 KCl, 1 MgCl₂, 24 HEPES, 2 CaCl₂ and 11 dextrosa, ajustado con NaOH a pH 7.4 y burbujeado con O₂ 100%. Para los experimentos con Fluo-4 0.5 mM fue agregado probenecid. La solución Krebs-24- HEPES-cafeína 10 mM- Na⁺ 36 mM se obtuvo cambiando las concentraciones de NaCl de Krebs-24- HEPES a 36 mM de NaCl, y manteniendo la osmolaridad con el agregado de 21,98 M de sacarosa.

Para evidenciar mecanismos de la GST, se utilizaron las siguientes drogas:

-5-Hidroxidecanoato de sodio (5-HD, ICN Biochemicals and Reagents, CA, USA): se preparó una solución 100 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y fue diluido hasta llegar a una concentración de 100 μM en la solución Krebs.

-Genisteína (Gen, from Sigma, USA) fue preparada como solución madre en DMSO a 20 mM y fue diluida hasta llegar a una concentración de 20 μM en la solución Krebs.

-Ortovanadato de sodio (OV, from Sigma-Aldrich, Argentina) se preparó una solución madre de 10 mM y fue diluido hasta llegar a una concentración de 10 μ M en la solución Krebs.

- Clonazepam (Saporiti, Argentina): se preparó una solución acuosa de concentración 10 mM, luego se realizaron diluciones en solución krebs hasta llegar a una concentración final de 10 μ M.

- Ciclosporina-A (Cys-A, Fluka, Sigma-Aldrich, USA) se preparó como solución 0.2 mM en DMSO y fue diluido en Krebs-C hasta obtener una concentración 0.2 μ M.

- Ru-360 o (μ -oxo) bis (*trans*-formatotetramine ruthenium) (Calbiochem, USA-Canadá) se disolvió 0.1 mg en 0.2 ml de agua destilada libre de oxígeno y luego se diluyó en solución Krebs para obtener una solución 1 μ M.

-Adrenalina (Adrenalina iny. Biol amp. 1mg/mg) se preparó una solución madre en medio acuoso de $1 \cdot 10^{-4}$ M y fue diluida a una concentración de 0,05 μ M en la solución Krebs.

-Piruvato de sodio (Biopack, Arg.) se pesaron 0,033 grs el mismo día del experimento para preparar una sc. 3 mM en sc. Krebs.

- N^G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME, from Sigma-Aldrich, Argentina) se preparó una solución madre en DMSO de 30 mM y fue diluida hasta llegar a una concentración de 30 μ M en la solución Krebs.

- Los fluoróforos se prepararon a partir de un vial de 50 μ g en 100 μ l de DMSO, que luego se dividieron en 10 alícuotas de 10 μ l cada una, conservadas a -20 °C hasta el uso, y diluidas entonces en 1 ml del Krebs con células para la carga.

-Todas las drogas fueron diluidas en Krebs-C a partir de la respectiva solución madre (en general a 1/1000 o más baja) en el momento del experimento. Además la solución de Ru-360 y Cys-A fueron protegidas de la exposición a la luz cubriendo las líneas de perfusión con una cubierta oscura.

7. PROTOCOLOS MECANICO-ENERGETICOS

7.a. Modelo de atontamiento por isquemia de no flujo-reperusión:

Las condiciones experimentales de 30 °C y estimulación a 1 Hz se eligieron de previos estudios (Ragone y Consolini 2009, Ragone y col., 2013) en las cuales la energética y los mecanismos celulares de atontamiento fueron caracterizados en corazones de rata y cobayo. Sin embargo, dado que esas condiciones eran subfisiológicas, los efectos de GST en corazones de rata fueron también evaluados en un modelo a 37 °C y 3 Hz de frecuencia de estimulación. En ambas condiciones, se eligieron los períodos I/R para obtener un modelo de atontamiento con un 50% de recuperación contráctil post-isquémica (RCPI), y un modelo de atontamiento severo con alrededor de un 20% de RCPI en la condición control sin GST.

7.a.1 Corazones de rata:

7.a.1.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperusión a 30°C:

Dado que en el laboratorio se había caracterizado el modelo de atontamiento por isquemia de no flujo-reperusión a una temperatura de 30°C con estimulación a frecuencia de 1 Hz, se realizaron los primeros estudios de los efectos de genisteína en dichas condiciones. Se efectuó un protocolo control, en el cual luego de un período de estabilización de unos 30 minutos, en los cuales la presión máxima desarrollada (P) y el flujo de calor total (*Ht*) permanecieron constantes, se registraron las variables durante la perfusión con solución Krebs-C durante 25 minutos. Luego la

perfusión fue suspendida durante 45 minutos (isquemia) y finalmente fue reanudada (reperfusión) con solución Krebs-C durante 45 minutos (*ver Fig.12*).

En las series experimentales para estudiar los efectos de GST en la I/R, luego del período de estabilización se aplicó uno de los siguientes protocolos de pretratamiento durante 25 minutos previos a la isquemia (*Fig. 12*):

- 1) Perfusión con C + 20 μ M de genisteína (GST) (25 min)
- 2) Perfusión con C + 10 μ M de orto vanadato (OVN) (5 min), seguido de perfusión con C + 20 μ M GST + 10 μ M OVN (20 min).
- 3) Perfusión con C + 10 μ M OVN (25 min)
- 4) Perfusión con C + 30 μ M de N^G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) (5 min), seguido de perfusión con C + 20 μ M GST + 30 μ M L-NAME (20 min).

Luego del pretratamiento todos estos grupos de corazones fueron sometidos a 45 minutos de isquemia global de no flujo (I) seguidos de 45 minutos de perfusión (R) con Krebs-C.

- 5) Perfusión con C, luego I (45 min), y perfusión con C + 20 μ M de genisteína (GST) (45 min).

Para evaluar las diferencias de género se dividieron en subgrupos de machos y hembras (*ver fig. 12*).

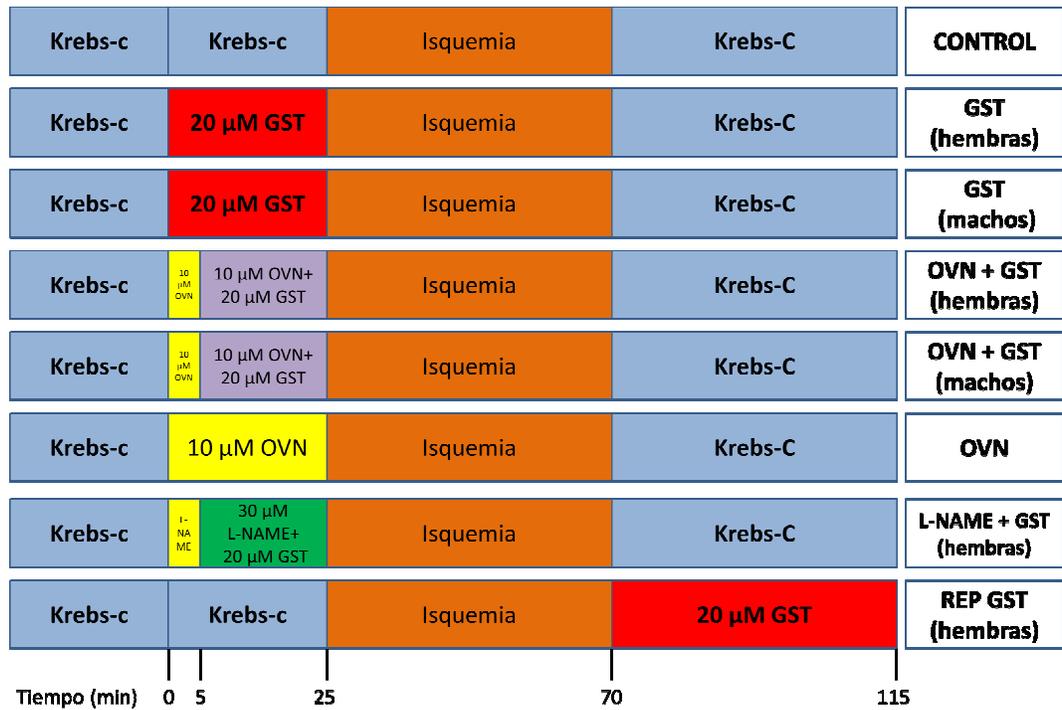


Fig. 12: Protocolos experimentales básicos de I/R realizados en corazones aislados de rata a 30°C y 1 Hz de frecuencia de estimulación (modelo de atontamiento)

Con el fin de evaluar la participación del RS en los efectos de GST, en otra serie experimental, los corazones fueron sometidos a diferentes tratamientos seguidos por un período de isquemia de no flujo de 45 min y otro de perfusión con solución Krebs conteniendo 36 mM de Na⁺ (para inactivar el flujo de Ca²⁺ por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺) y 10 mM de cafeína (para inducir la liberación de Ca²⁺ masiva desde el RS) (K-caf-36Na⁺) durante 45 min. Luego de la estabilización por unos 30 minutos en Krebs-C se aplicó uno de los siguientes protocolos de pretratamiento en cada grupo de corazones de rata durante 25 minutos previos a la isquemia (Fig. 13).

- 1) Perfusión con C (25 min)
- 2) Perfusión con C + 20 μ M GST (25 min)
- 3) Perfusión con C + 10 μ M OVN (5 min), seguido de perfusión con C + 20 μ M GST + 10 μ M OVN (20 min).

Perfusión con C + 3 mM Piruvato de sodio (PIR) (5 min), seguido de perfusión con C + 20 μ M GST + 3 mM PIR (20 min).

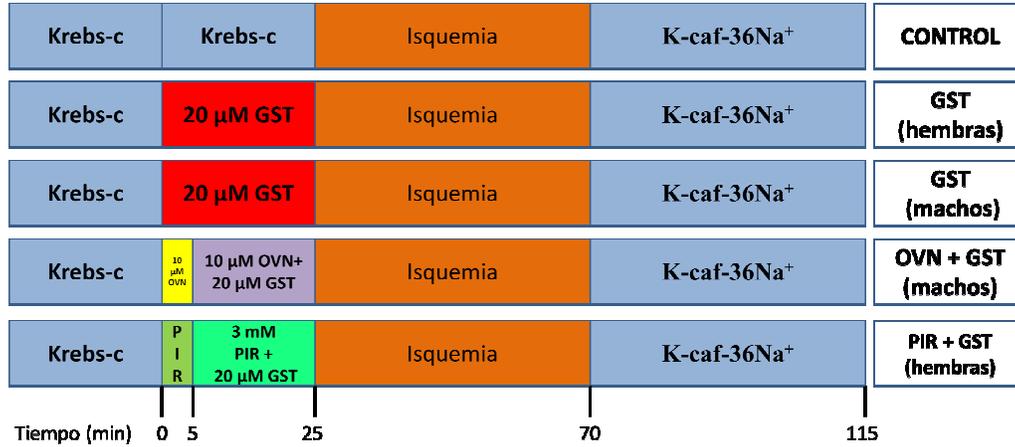


Fig. 13: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata para evaluar la participación del RS en el modelo de atontamiento a 30°C y 1 Hz de frecuencia de estimulación.

7.a.1.2. Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 37°C:

El siguiente objetivo fue caracterizar el modelo de atontamiento por isquemia-reperfusión en una condición más cercana a la fisiológica, perfundiendo los corazones con Krebs a 37 °C y estimulándolos eléctricamente a una frecuencia de 3 Hz. Para determinar la duración del período de isquemia se realizaron varias pruebas a distintos tiempos con el criterio de obtener una recuperación de la contractilidad en la reperfusión de aproximadamente 50%, lo cual representa un grado de atontamiento similar al logrado en el modelo a 30°C. El período de isquemia de no flujo que cumplió con tal condición fue de 20 minutos. Se estudiaron dos concentraciones de GST, 20 y 2 μ M. La primera era la que había demostrado efectos en estudios “*ex vivo*” (Ji y col., 2004a; Al-Nakkash y col., 2009), y la segunda se eligió por haber sido reportada como la concentración plasmática obtenida en el consumo frecuente de este fitoestrógeno (Setchell, 1998).

En esta serie de experimentos, luego de un período de estabilización de P y Ht, se aplicó uno de los siguientes protocolos de pretratamiento en cada grupo de corazones de rata previo a la isquemia (Fig. 14):

- 1) Perfusión con C (25 min)
- 2) Perfusión con C + 20 μ M GST (25 min)
- 3) Perfusión con C + 2 μ M GST (25 min) (antes y después de la isquemia)
- 4) Perfusión con C + 0,05 μ M Adrenalina (ADRE) (5 min), seguido de perfusión con C + 20 μ M GST + 0,05 μ M ADRE (20 min) (para generar la fosforilación del canal de Ca^{2+} tipo L provocando un aumento en la corriente de Ca^{2+} en el miocito ventricular y así oponernos a la inhibición generada por GST.
- 5) Perfusión con C + 0,05 μ M ADRE (25 min)
- 6) Un grupo de corazones de ratas hembra fue perfundió con GST 20 μ M antes y después de la isquemia (para evaluar si los efectos ocurren solo en presencia de GST y se lavan).

Luego del pretratamiento todos los corazones fueron sometidos a 20 minutos de isquemia global de no flujo (I) seguidos de 45 minutos de reperfusión (R) con Krebs-C.

Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	Krebs-C	CONTROL	
Krebs-c	20 μ M GST	Isquemia	Krebs-C	GST (hembras)	
Krebs-c	20 μ M GST	Isquemia	Krebs-C	GST (MACHOS)	
Krebs-c	20 μ M GST	Isquemia	20 μ M GST	Rep GST (hembras)	
Krebs-c	2 μ M GST	Isquemia	2 μ M GST	GST 2 (hembras)	
Krebs-c	2 μ M GST	Isquemia	2 μ M GST	GST 2 (MACHOS)	
Krebs-c	ADRE 5 10^{-8} M ADRE+ 20 μ M GST	Isquemia	Krebs-C	ADRE + GST (hembras)	
Krebs-c	10 μ M OVN 5 10^{-8} M ADRE+ 20 μ M GST	Isquemia	Krebs-C	ADRE + GST (machos)	
Tiempo (min)	0	5	25	45	90

Fig. 14: Protocolos experimentales de I/R en el modelo de atontamiento a 37 °C y frecuencia de estimulación de 3 Hz realizados en corazones aislados de rata.

7.a.1.3. Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento severo:

En corazones de rata se generó un modelo de atontamiento severo a 37°C con un período de isquemia más prolongado (30 minutos), de manera de reducir aún más la recuperación contráctil postisquémica (ver fig. 15). En este modelo se evaluó el efecto de una administración intraperitoneal (IP) de GST (5mg/Kg) 24 horas previas al experimento, este protocolo se realizó en ambos géneros. La dosis IP de GST se eligió de previas publicaciones (Fatehi-Hassanabad y col. 1997; McClain y col. 2006; Gurkan Yazici y col., 2007; Jefferson y col., 2007). Para evaluar si los efectos de la administración IP de GST son mediados por su acción inhibitoria de la vía de las TK, a un grupo de ratas H y otro de M se les administró 15 mg/Kg de OVN por vía intraperitoneal 24 hs

antes de la administración de GST 5 mg/Kg. La dosis de OVN se eligió de publicaciones previas (Roman y col., 1981; Hasegawa y col., 2003; Wang y col., 2013).

Además, con el fin de evaluar la participación del RS en los efectos generados por la administración IP de 5 mg/Kg GST, en otra serie experimental y luego de transcurridas las 24 hs. de la administración IP, los corazones fueron sometidos a la isquemia de no flujo de 30 min y se reperfundieron con la solución Krebs conteniendo 36 mM de Na⁺ y 10 mM de cafeína (K-caf-36Na⁺) durante 45 min (para evaluar los efectos de GST in vivo sobre la función del RS) (Fig. 15).

	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	Krebs-C	CONTROL
Administración IP de GST 5mg/KG	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	Krebs-C	GST 5 mg/Kg (machos)
Administración IP de GST 5mg/KG	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	Krebs-C	GST 5 mg/Kg (hembras)
Administración IP de GST 5mg/Kg + OVN 15 mg/Kg	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	Krebs-C	GST+OVN IP (hembras)
Administración IP de GST 5mg/Kg + OVN 15 mg/Kg	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	Krebs-C	GST+OVN IP (machos)
	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	K-Caff-36Na ⁺	CONTROL REP CAF
Administración IP de GST 5mg/KG	Krebs-c	Krebs-c	Isquemia	K-Caff-36Na ⁺	GST 5 mg/Kg (machos) REP CAF
Tiempo (min)	0	5	25	55	100

Fig. 15: Protocolo experimental de I/R a 37 °C realizados en corazones aislados de rata sometidos a atontamiento severo con 30 minutos de isquemia.

7.a.2 Corazones de cobayo:

7.a.2.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperusión a 30°C:

Dado que en el laboratorio se había caracterizado el modelo de atontamiento por isquemia de no flujo-reperusión a una temperatura de 30°C con frecuencia espontánea, se evaluaron los efectos

de genisteína en dichas condiciones. Luego de un período de estabilización de aproximadamente 20 minutos con solución de Krebs-C (C), se aplicó uno de los siguientes protocolos en cada grupo de corazones de cobayo previo a la isquemia:

- 1) Perfusión con solución C (20 min)
- 2) Perfusión con GST 20 μ M (20 min)

Luego del pretratamiento todos los corazones fueron sometidos a 30 minutos de isquemia global de no flujo (I) seguidos de 45 minutos de reperfusión (R) con Krebs-C (Fig. 16).

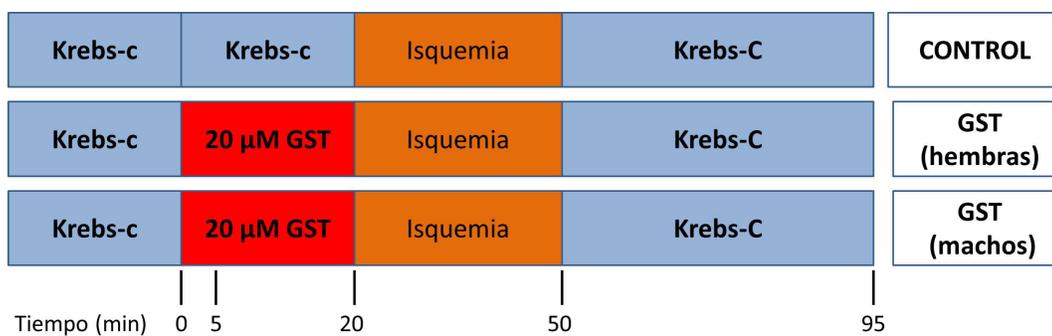


Fig.16: Protocolos experimentales del modelo de atontamiento por I/R a 30 °C realizados en corazones aislados de cobayo.

7.a.2.2 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión con pre condicionamiento isquémico:

Luego de un período de estabilización de aproximadamente 30 minutos con solución de Krebs-C (C), se aplicó uno de los siguientes protocolos en cada grupo de corazones de cobayo previo a la isquemia:

- 1) Perfusión con solución C (15 min), seguido de isquemia global (3 min), y de perfusión con solución C (5 min).

2) Perfusión con solución C + GST 20 μ M (15 min), seguido de isquemia global (3 min), y perfusión con solución C + GST 20 μ M (5 min).

3) Perfusión con solución C + GST 20 μ M + 5-Hidroxicanoato de sodio (5-HD) 100 μ M (15 min), seguido de isquemia global (3 min), perfusión con solución C + GST 20 μ M + 5-HD 100 μ M (5 min) (para evaluar si la cardioprotección se produce mediante la activación de los mK_{ATP}).

Luego del pretratamiento todos los corazones fueron sometidos a 30 minutos de isquemia global de no flujo (I) seguidos de 45 minutos de reperfusión (R) con Krebs-C. Para evaluar las diferencias de género se dividieron en subgrupos de machos y hembras (*ver fig. 17*).

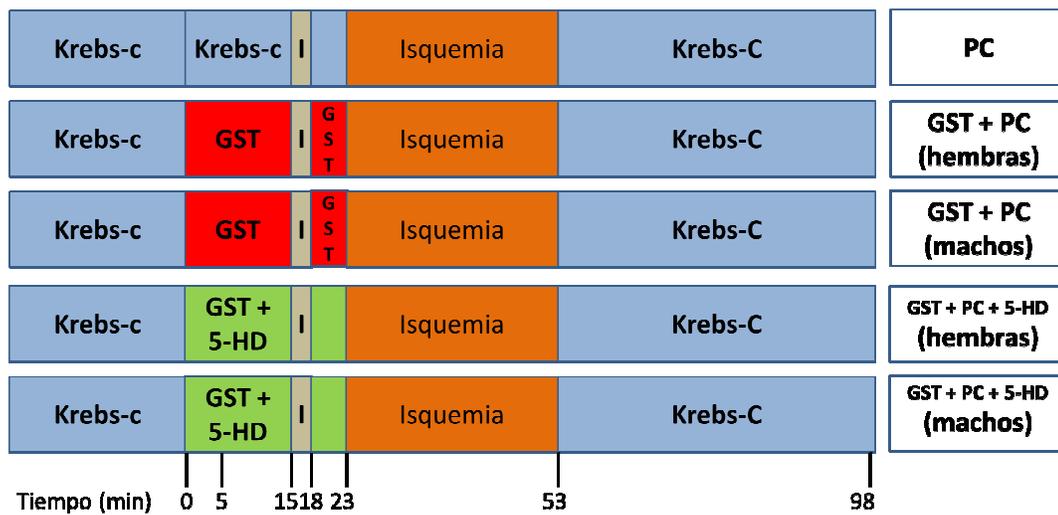


Fig. 17: Protocolos experimentales de I/R a 30 °C realizados en corazones aislados de cobayo expuestos a un episodio de preconditionamiento (PC).

7.b. Modelo de atontamiento por hipoperfusión y reperfusión en corazones de rata:

Este modelo se realizó con perfusión del Krebs a 37°C y estimulación eléctrica a frecuencia de 2 Hz. Se realizaron varias pruebas para determinar la duración del período de isquemia que permitiera la recuperación de la contractilidad en alrededor de un 50 % en la reperfusión, de modo

de obtener un modelo de atontamiento comparable a los anteriores, lo cual se logró con la reducción del flujo a 1,2 ml/min durante 45 min.

7.b.1. Caracterización de la participación de transportadores mitocondriales:

Dado que este modelo no estaba caracterizado en el laboratorio, iniciamos el estudio del rol mitocondrial. Luego de un período de estabilización de aproximadamente 30 minutos con solución de Krebs-C (C), se aplicó uno de los siguientes protocolos en cada grupo de corazones de rata previo a la isquemia:

- 1) Perfusión con solución C (20 min)
- 2) Perfusión con solución C + clonazepam (CLZ) 10 μ M (20 min) (Para evaluar el rol del NXCm en la disfunción por HIP/R)
- 3) Perfusión con solución C + (μ -oxo) bis (*trans*-formatotetramine ruthenium) (RU360) 1 μ M (5 min) (para evaluar la participación del UCam en este modelo experimental)
- 4) Perfusión con solución C + 5-HD 100 μ M (20 min) (Para evaluar el rol del mKATP en la disfunción por HIP/R)

Luego del pretratamiento, se disminuyó la velocidad de perfusión desde 6 ml/min a 1,2 ml/min durante 45 min, seguidos de 45 minutos de reperfusión (R) con Krebs-C. (*ver fig. 18*).

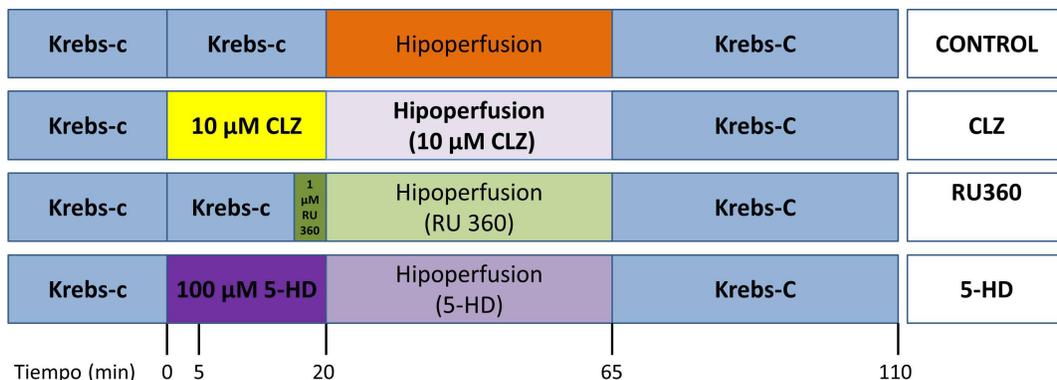


Fig. 18: Protocolos experimentales de HIP/R a 37°C realizados en corazones aislados de rata para caracterizar el modelo de atontamiento.

7.b.2 Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión y reperfusión:

Luego de un período de estabilización de aproximadamente 20 minutos con solución de Krebs-C (C), se aplicó uno de los siguientes protocolos en cada grupo de corazones de rata previo a la isquemia:

- 1) Perfusión con solución C (20 min)
- 2) Perfusión con solución C + GST 20 μ M (20 min)
- 3) Perfusión con solución C + (CLZ) 10 μ M (5 min), seguido de perfusión con CLZ 10 μ M + GST 20 μ M (20 min)
- 4) Perfusión con solución C + Cys-A 0,2 μ M (5 min), luego Cys-A 0,2 μ M + CLZ 10 μ M (5 min), seguido de perfusión con Cys-A 0,2 μ M + CLZ 10 μ M + GST 20 μ M (20 min)
- 5) También se evaluó el efecto de una administración intraperitoneal de GST (5 mg/Kg) 24 horas previas al experimento. Este protocolo se realizó en corazones de ratas macho.

Luego de estos pretratamientos, se disminuyó la velocidad de perfusión desde 6 ml/min a 1,2 ml/min durante 45 min, seguidos de 45 minutos de reperfusión (R) con Krebs-C. Para evaluar las diferencias de género se dividieron en subgrupos de machos y hembras (*ver fig. 19*).

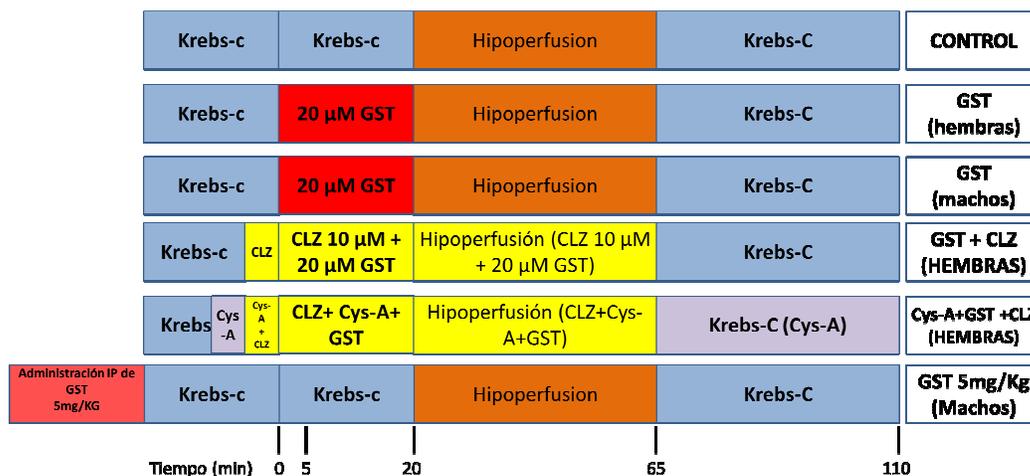


Fig. 19: Protocolos experimentales de HIP/R a 37 °C realizados en corazones aislados de rata para caracterizar los efectos de genisteína (GST) con el uso de clonazepam (CLZ) y ciclosporina-A (Cys-A).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados fueron expresados como media \pm ESM (n= número de experimentos). En los protocolos en que se compararon los efectos de más de dos tratamientos a lo largo del período de isquemia y/o reperfusión, se realizaron comparaciones múltiples mediante ANOVA de dos vías (variables: tratamiento y tiempo), seguidos por post-tests de Bonferroni para las varias comparaciones pareadas. En casos de comparación de dos tratamientos se empleó el t-test de Student, y en casos de comparaciones de múltiples tratamientos con una sola variable se empleó el ANOVA de una vía. Se consideró diferencia significativa al nivel de $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa GraphPad Prism v. 4.0. Los resultados estadísticos se presentan en cada figura y en cada tabla.

RESULTADOS

1) MODELO DE ATONTAMIENTO POR ISQUEMIA DE NO FLUJO Y REPERFUSIÓN:

1.a Corazones de rata:

1.a.1 Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 30°C:

1.a.1.1 Efectos de la perfusión de genisteína 20 μ M previo a la I/R:

Cuando los corazones de rata perfundidos con solución Krebs-C a 30°C se expusieron a un corte global de la perfusión (isquemia de “no-flujo”, I) durante 45 minutos seguido de reperfusión (R) con la solución Krebs-C (grupo control) se manifestó una disfunción caracterizada por contractura diastólica y reducida recuperación contráctil. Este modelo de “corazón atontado” por I/R fue adoptado en esta tesis para el estudio de los efectos de la Genisteína (GST). En la Fig. 20 se muestra un registro típico de la adquisición A/D del período de I/R en un corazón aislado de rata, apreciando las señales provenientes de la presión intraventricular LVP (convertida a mmHg) y del flujo de calor liberado total (aún expresada en mV). Este último será convertido a Ht (en mW/g) después de restarle las líneas de base del sistema vacío, con perfusión y sin perfusión, según el respectivo período del registro, y de multiplicarlo por los factores de calibración respectivos, descritos en la sección 3 de Materiales y Métodos.

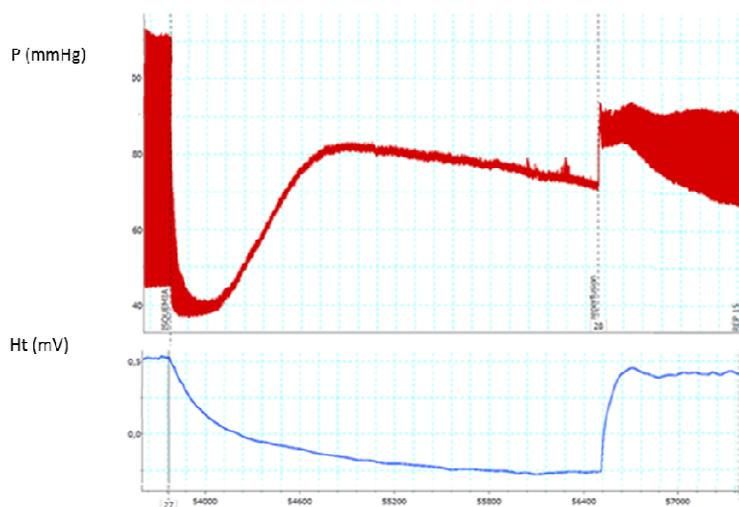


Fig. 20: Registro experimental (adquisición A/D) de las señales provenientes de la presión intraventricular (LVP, en rojo) en forma simultánea con el flujo de calor total liberado (Ht, en azul) del corazón aislado de rata expuesto a 45 minutos de isquemia global de no-flujo seguido de 45 minutos de reperfusión (de la cual se muestran sólo los primeros 15 minutos).

En las Figs. 21 y 22 se muestran los valores absolutos de P y *Ht* a lo largo del protocolo y se detallan los porcentajes de recuperación de cada uno de estos parámetros respecto de la condición pre-isquémica en Krebs-C al final del período de estabilización.

Otro grupo de corazones fueron tratados con GST 20 μ M antes de la isquemia, durante este período GST redujo la P desde 86.4 ± 12.0 a 69.6 ± 10.4 mmHg en corazones de rata macho (CRM) ($p= 0.0247$, $n= 17$) y de 105.5 ± 10.0 a 83.5 ± 9.6 mmHg ($p= 0.0017$, $n= 16$) en corazones de rata hembra (CRH), sin cambios significativos en el flujo de calor total (*Ht*) (de 13.2 ± 0.8 a 13.9 ± 1.4 mW/g en CRM, y de 13.5 ± 0.7 a 12.7 ± 1.0 mW/g en CRH). Por lo tanto, GST generó una tendencia a reducir la economía muscular total (P/*Ht*) de 8.0 ± 1.0 a 5.9 ± 0.8 mmHg.mW/g ($p= 0.0174$) en CRM y de 8.0 ± 0.9 a 6.8 ± 0.8 mmHg.mW¹/g ($p= 0.062$) en CRH. Genisteína también indujo un aumento en la velocidad de relajación en CRH ($-dP/dt$)/P de $+0.42 \pm 0.21$ s⁻¹ ($t= 1.94$, $n= 10$, $p<0.05$), mientras que no generó cambios en CRM (0.02 ± 0.88 s⁻¹, NS).

En las figs. 21 y 22 se observa que el tratamiento con GST 20 μ M no cambió el comportamiento de los corazones frente a la isquemia de no flujo (I), ya que P y *Ht* cayeron hasta cero similarmente al grupo de corazones no tratados (control). Durante la reperfusión (R), encontramos diferencias de género en los efectos de GST. Los CRM tratados con GST desarrollaron una recuperación contráctil postisquémica (RCPI) de $25,6 \pm 8,6$ % de P inicial

($P < 0,001$) a los 45 minutos de R, que es más baja que el grupo de corazones no tratados ($65,8 \pm 6,7$ % de P inicial). En cambio, los CRH tratados con GST tuvieron una RCPI similar al grupo control ($62,5 \pm 10,66$ % de P inicial, $n=8$) (fig. 21).

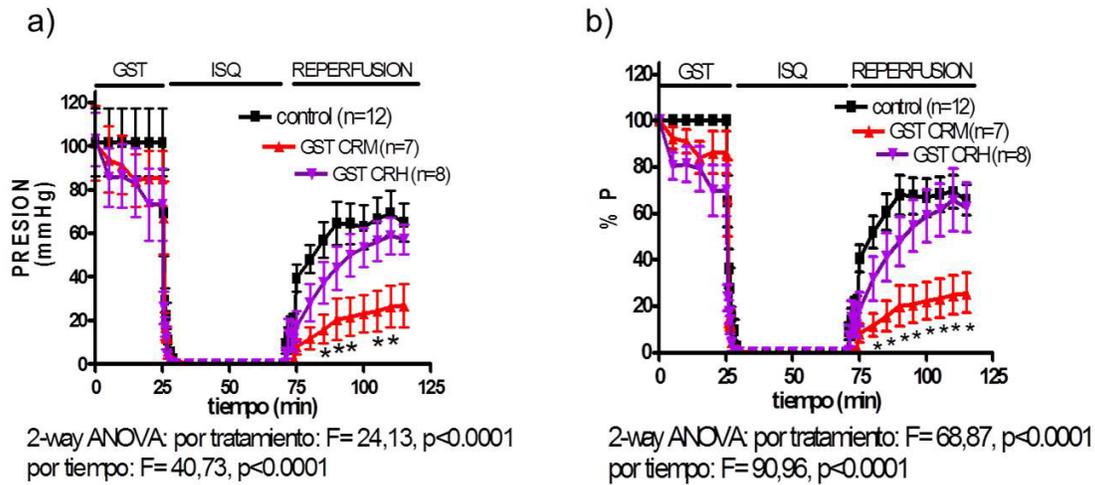


Fig. 21: Valores absolutos de P (en mmHg) (a) y porcentajes respecto del P inicial (b) durante todo el protocolo de I/R en corazones de rata de ambos sexos pretratados con GST 20 μ M y sin tratamiento (control) en un modelo de atontamiento a 30 $^{\circ}$ C. Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias significativas por el test de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs control)

Simultáneamente, el gasto energético durante la reperfusión aumentó en corazones que habían sido tratados con GST antes de I, similarmente en los CRM ($123,4 \pm 13,8$ % de Ht inicial, $n=7$) y en los CRH ($151,3 \pm 24,6$ % de Ht inicial, $n=8$), pero más alto que en el control ($96,0 \pm 8,7$ % de Ht inicial, $n=12$) (fig. 22).

En consecuencia a la caída en P y al aumento en Ht, GST 20 μ M redujo la economía muscular total (P/Ht) durante la reperfusión, respecto al valor preisquémico. Sin embargo, la caída en P/Ht en CRM (desde $7,8 \pm 1,4$ hasta $1,8 \pm 0,7$, $n=7$ mmHg.g/mW) fue superior que en los CRH (desde $8,1 \pm 0,9$ hasta $3,8 \pm 0,9$, $n=8$ mmHg.g/mW), y en ambos mayor que en el grupo control (desde $7,8 \pm 1,0$ hasta

6,4±1,5 mmHg.g/mW, n=12). Por lo tanto, al final de la reperfusión, tanto en CRM como en CRH tratados con GST, P/Ht fue significativamente más bajo que los corazones no tratados (*Fig. 23*).

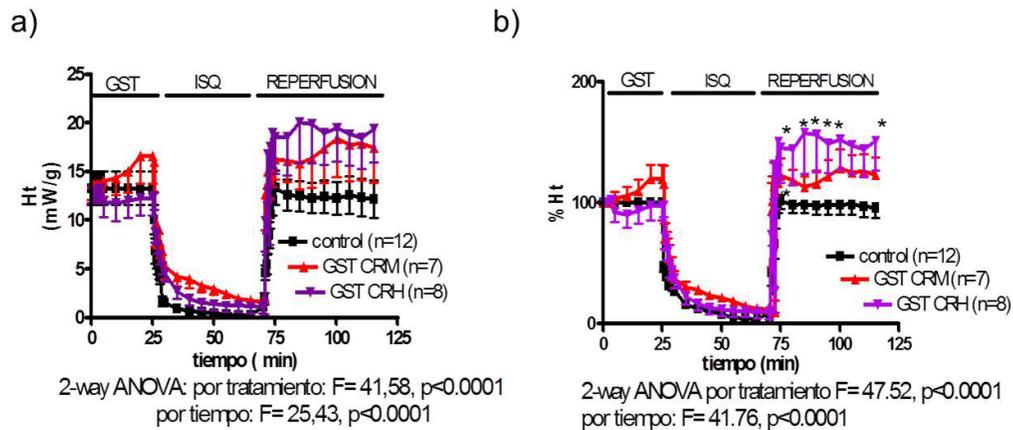


Fig. 22: Valores absolutos de Ht (en mW/g) (a) y porcentajes respecto del Ht inicial (b) durante todo el protocolo de I/R en corazones de rata de ambos sexos pretratados con GST 20 μ M o sin tratamiento (control) en un modelo de atontamiento a 30 °C. Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias significativas por el test de Bonferroni ($p<0.05$ vs control).*

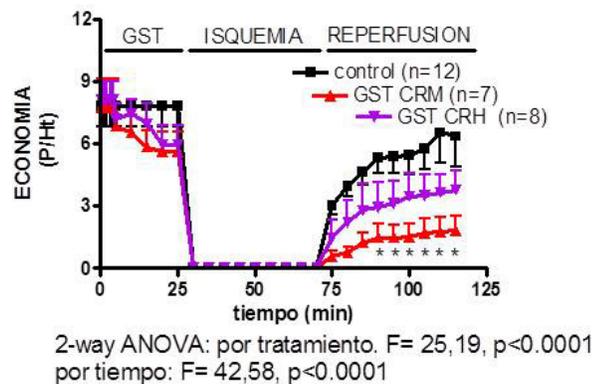


Fig. 23: Valores de economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW) durante todo el protocolo de I/R en corazones de rata pretratados con GST 20 μ M o sin tratar (control) en un modelo de atontamiento a 30 °C. Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias significativas por el test de Bonferroni ($p<0.05$ vs control).*

GST 20 μ M también redujo la contractura diastólica, más en CRM que en CRH al final de la I y durante el comienzo de la R (*Ver fig. 24*).

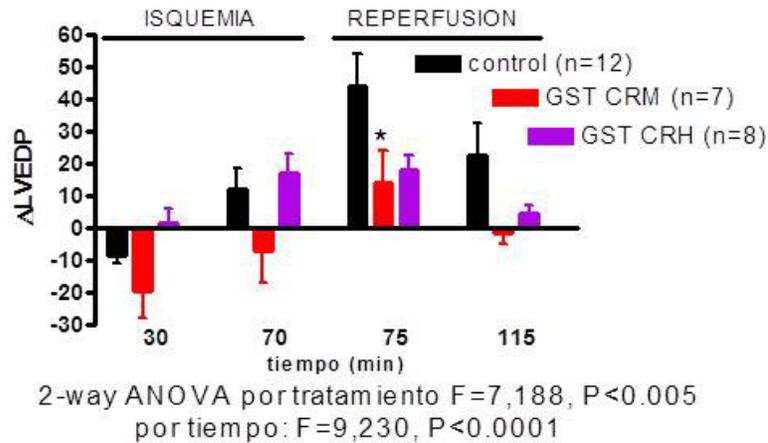


Fig. 24: Cambios en la presión diastólica (Δ LVEDP, en mmHg) respecto de su valor preisquémico producidos a los 5 y 45 minutos de la isquemia y a los 5 y 45 minutos de la reperusión en los protocolos de corazones tratados con GST 20 μ M o sin tratar (control) en un modelo de atontamiento a 30°C. Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias significativas por el test de Bonferroni (* p <0.05 vs control).

El pretratamiento con GST no modificó los tiempos de contracción ni de relajación de las contracciones isovolúmicas, ya sea individualmente o mostrados respectivamente como $t_{pp}=t_{c1}+t_{c2}$ (tiempo a la presión pico) y $t_R= t_{R1}+t_{R2}$ (tiempo de relajación, en los períodos desde el inicio hasta la máxima velocidad de relajación y desde ésta hasta el final de la misma). Tampoco modificó las velocidades normalizadas de contracción y relajación (+P/P y -P/P) ni la relación IPT/P (Tabla 1). Por lo tanto, los cambios en la integral presión-tiempo (IPT) se deben sólo a los cambios de P.

Tabla 1: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata controles (n=6) o pretratados con GST (CRH n=8; CRM n=7) expuestos a 45 minutos de isquemia a 30°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C:						
C preisquémico	15,81±6,20	0,12±0,03	11,08±0,50	-7,94±0,85	0,14±0,01	0,20±0,03
R 5	7,83±1,96	0,19±0,02	10,80±2,46	-7,05±1,47	0,13±0,004	0,29±0,04
R 25	10,99±3,94	0,16±0,03	9,76±1,82	-7,06±2,12	0,13±0,01	0,16±0,02
R 45	10,34±3,04	0,17±0,04	10,87±1,48	-8,45±1,781	0,13±0,01	0,21±0,03
Grupo C-GST (CRH):						
C preisquémico	17,28±3,58	0,16±0,02	14,88±1,08	-6,56±0,718	0,12±0,014	0,24±0,01
C-GST-preisquem.	14,05±4,51	0,16±0,02	15,51±1,23	-6,93±0,823	0,11±0,005	0,25±0,03
R 5	3,80±1,08	0,25±0,08	9,31±2,98	-6,94±2,529	0,11±0,04	0,12±0,04
R 25	7,26±1,69	0,16±0,02	11,37±2,69	-6,76±0,49	0,13±0,02	0,19±0,03
R 45	8,20±1,60	0,15±0,02	12,55±2,76	-7,56±0,94	0,11±0,01	0,18±0,02
Grupo C-GST (CRM):						
C preisquémico	21,86±5,62	0,21±0,05	15,49±0,73	-6,86±0,73	0,12±0,01	0,28±0,01
C-GST-preisquem.	18,41±4,72	0,21±0,05	15,74±1,44	-6,78±1,00	0,10±0,01	0,24±0,03
R 5	4,13±2,95	0,14±0,06	7,33±3,17	-5,66±2,457	0,07±0,03	0,11±0,05
R 25	3,06±1,38	0,15±0,02	13,58±1,31	-8,87±1,113	0,12±0,01	0,19±0,02
R 45	4,56±2,60	0,14±0,03	14,69±1,51	-8,77±1,261	0,16±0,03	0,23±0,02
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,4362, P= 0,6479, NS Por tiempo: F= 7,629, P<0.0001	Por tratamiento: F= 0,5617, P= 0,5725, NS Por tiempo: F= 0,3770, P= 0,8244, NS.	Por tratamiento: F= 2,501 P=0,0899, NS Por tiempo: F= 3,096 P= 0,0214	Por tratamiento: F= 0,3792 P= 0,6859, NS. Por tiempo: F= 0,6258 P= 0,6458, NS.	Por tratamiento: F= 1,401 P= 0,2532, NS. Por tiempo: F= 1,165 P= 0,3340, NS.	Por tratamiento: F= 0,4280 P= 0,6535, NS. Por tiempo: F= 2,847 P= 0,0301

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

Las diferencias de género halladas para los efectos de GST hicieron suponer que actuaría en más de un mecanismo regulador de la homeostasis de Ca²⁺, y que el grado de participación de cada mecanismo podría ser diferente según el género. Se evaluaron entonces varios mecanismos posibles en los dos géneros.

1.a.1.2 Participación de las tirosina-kinasas en los efectos de genisteína en CRH:

Para evaluar si los efectos de GST en corazones aislados de rata fueron generados por la inhibición de la vía de las tirosinas kinasas (TK), se realizó un pretratamiento con 10 µM de

ortovanadato de sodio (OVN). El OVN es capaz de inhibir selectivamente a las tirosinas fosfatasas (TF) (Di Salvo y col., 1993), evitando la desfosforilación de los residuos de tirosina. Este mecanismo le permitiría al OVN oponerse a la hipotética inhibición de las TK generada por GST. Teniendo en cuenta las diferencias de género encontradas en los efectos de GST, se estudiaron los efectos de OVN en los 2 subgrupos: machos y hembras.

En corazones de rata hembra (CRH), el agregado de OVN a GST no modificó significativamente la RCPI en comparación con el grupo pretratado solo con GST (Fig. 25a). Los efectos benéficos del agregado de OVN a GST aparecen sólo en la economía muscular (P/Ht) que fue ligeramente aumentada al final de la reperfusión (Fig. 25c). El agregado de OVN a GST tampoco modificó los efectos de ésta sobre la contractura distólica ($+\Delta\text{LVEDP}$) inducida en el ciclo de I/R (Fig. 25d).

Para evaluar si la falta de efecto de GST en CRH se debe al lavado de GST durante la reperfusión o si se contrarresta con otros efectos positivos, un grupo de corazones de rata hembra fueron tratados con 20 μM de GST solamente durante la reperfusión. La fig. 25a muestra que la presencia de GST sólo durante R no afectó significativamente la RCPI. A pesar de que GST redujo el flujo de calor total (Ht) durante R, respecto al grupo tratado con GST previo a la isquemia, no modificó la economía muscular (P/Ht, ver Fig. 25b y c). Esto sugiere que en CRH la presencia de GST antes o después de la I mantiene la contractilidad y la economía muscular, posiblemente activando otros mecanismos protectores que son menos importantes en CRM. Como el tratamiento con OVN + GST no modificó los efectos de GST en CRH, se estima que tanto los mecanismos negativos como los positivos de GST en CRH estarían mediados por la inhibición de la vía de las TK.

El agregado de OVN a GST en CRH no modificó los tiempos de contracción ni de relajación de las contracciones isovolúmicas, ni las velocidades normalizadas de contracción y relajación

(+P/P y -P/P). La presencia de GST en la reperfusión aumentó la relación IPT/P respecto del grupo pretratado con GST, debido a una tendencia a prolongar la segunda fase de la relajación (Tabla 2).

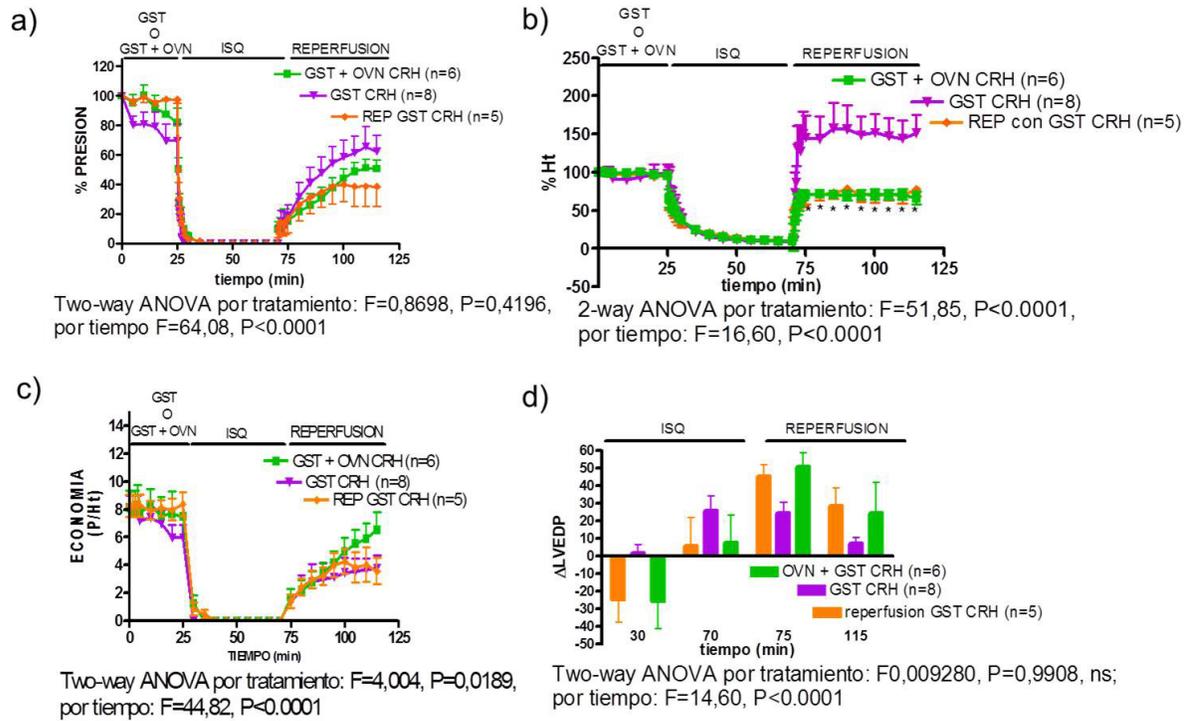


Fig. 25: Presión desarrollada (% del P preisquémico) (a), flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) y contractura diastólica (Δ LVDP) (d) en corazones de rata hembra expuestos a I/R y tratados en el período previo a la isquemia con GST 20 μ M o GST 20 μ M +OVN 10 μ M, o tratados solamente durante la reperfusión con GST 20 μ M. Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias según el test de Bonferroni (* $p<0,05$ vs GST hembras).

Tabla 2: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata hembra pretratados con GST (n=8), GST + OVN (n=6) o con GST durante la reperfusión (n=7), expuestos a 45 minutos de isquemia a 30°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C-GST (CRH):						
C preisquémico	17,28±3,58	0,16±0,02	14,88±1,08	-6,56±0,718	0,12±0,014	0,24±0,01
C-GST-preisquem.	14,05±4,51	0,16±0,02	15,51±1,23	-6,93±0,823	0,11±0,005	0,25±0,03
R 5	3,80±1,08	0,25±0,08	9,31±2,98	-6,94±2,529	0,11±0,04	0,12±0,04
R 25	7,26±1,69	0,16±0,02	11,37±2,69	-6,76±0,49	0,13±0,02	0,19±0,03
R 45	8,20±1,60	0,15±0,02	12,55±2,76	-7,56±0,94	0,11±0,01	0,18±0,02
Grupo C-GST+OVN (CRH):						
C preisquémico	18,68±3,88	0,18±0,01	17,81±0,58	-7,27±1,18	0,11±0,005	0,28±0,03
C-GST+OVN-preisquem.	12,61±3,25	0,14±0,01	16,99±0,70	-8,32±1,03	0,10±0,01	0,22±0,02
R 5	1,79±0,52	0,16±0,03	12,34±1,96	-10,01±0,94	0,13±0,02	0,26±0,07
R 25	4,50±0,67	0,13±0,01	15,82±0,70	-9,89±0,75	0,12±0,02	0,18±0,01
R 45	6,06±0,78	0,13±0,01	16,18±0,43	-9,75±0,69	0,11±0,01	0,18±0,01
Grupo C-R GST (CRH):						
C preisquémico	20,45±3,31	0,25±0,05	12,70±1,34	-6,23±0,75	0,15±0,01	0,29±0,03
C preisquémico	20,81±3,63	0,26±0,05	12,05±1,80	-6,39±0,91	0,16±0,02	0,29±0,04
R 5	2,40±0,82	0,32±0,10	13,23±1,28	-9,96±1,81	0,15±0,02	0,27±0,03
R 25	6,23±0,82	0,20±0,05	12,05±1,05	-7,27±0,59	0,15±0,01	0,30±0,05
R 45	5,81±1,15	0,29±0,08	12,13±1,41	-7,88±0,703	0,15±0,01	0,26±0,03
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,9099 P= 0,4067, NS Por tiempo: F= 19,69 P<0.0001	Por tratamiento: F=7,916 P=0,0007 Por tiempo: F= 0,3578 P= 0,8380, NS	Por tratamiento: F= 6,639 P< 0.05 Por tiempo: F= 2,141 P= 0,0849, NS	Por tratamiento: F= 5,417 P < 0.05 Por tiempo: F= 2,160 P= 0,0826, NS	Por tratamiento: F= 7,349 P < 0.05 Por tiempo: F= 0,2216 P= 0,9255, NS.	Por tratamiento: F= 6,534 P < 0.05 Por tiempo: F= 1,648 P= 0,1721, NS.

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs GST (CRH)).

1.a.1.3 Participación de las tirosina-quinasas en los efectos de genisteína en CRM:

Durante la perfusión con OVN 10 µM de los corazones de rata macho (CRM) previo a la isquemia no hubo cambios significativos en P, pero con OVN+GST se previno el inotropismo negativo generado por GST 20 µM antes de la isquemia. Además, la perfusión de OVN+GST mejoró la RCPI que era reducida por el tratamiento con GST sola (ver fig. 26a). Al final de la R los corazones tratados con OVN + GST recuperaron hasta el 67.1 ± 11.6 % de la P inicial, similar a los corazones control (65.8 ± 6.7%), y a aquellos tratados sólo con OVN (42.9 ± 5.5%), siendo todas

estas RCPI mayores que la de los CRM tratados solo con GST ($25.5 \pm 8.6\%$). El flujo de calor total fue reducido con el agregado de OVN a GST antes de la I, pero no se encontraron diferencias durante el período de I/R (Fig. 26b), con correlato en la economía muscular total (P/Ht) (Fig. 26c).

El agregado de OVN a GST en CRM no modificó los tiempos de contracción ni de relajación de las contracciones isovolúmicas, ni modificó las velocidades normalizadas de contracción y relajación (+P/P y -P/P), o la relación IPT/P (Tabla 3).

Considerando que GST reducía la RCPI en CRM, el efecto protector más importante sería la prevención de la contractura diastólica durante la I/R, y es interesante que OVN inhibió en parte ambos efectos (ver fig. 26d). Estos resultados sugieren que en CRM, los efectos negativos de GST son mediados a través de la inhibición de la vía de la TK, y podrían relacionarse con la inhibición del influjo de Ca^{2+} .

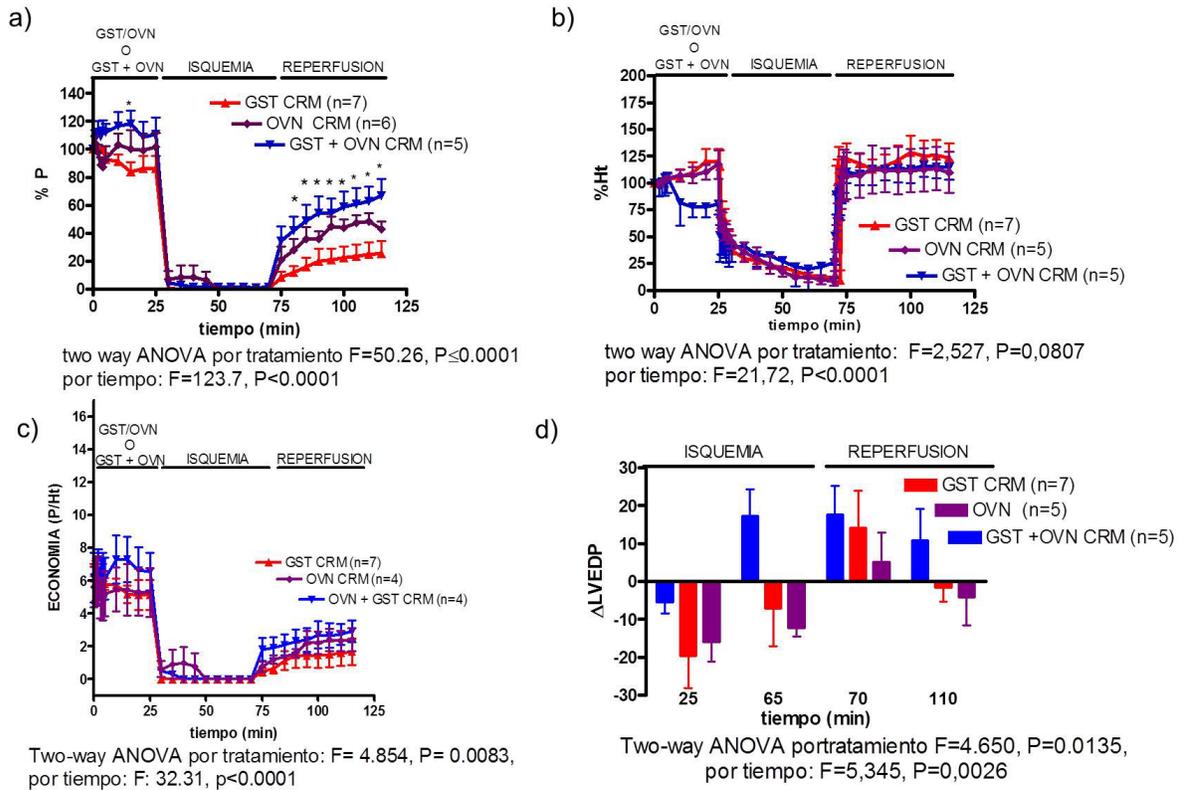


Fig. 26: Efectos de GST, OVN o GST+OVN sobre la máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) y el flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), sobre la economía muscular (P/Ht) (c) y sobre la contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de rata macho expuestos a isquemia global y reperfusion (I/R). Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias significativas por el test de Bonferroni ($*p < 0.05$ vs GST CRM).

Tabla 3: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata macho pretratados con GST (n=7), GST + OVN (n=3) o con OVN (n=6), expuestos a 45 minutos de isquemia a 30°C.

	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C-GST (CRM):						
C preisquémico	21,86±5,62	0,24±0,04	15,49±0,73	-6,86±0,73	0,12±0,01	0,28±0,01
C-GST-preisquemico	18,41±4,72	0,24±0,04	15,74±1,44	-6,78±1,00	0,10±0,01	0,24±0,03
R 5	4,13±2,95	0,09±0,04	7,33±3,17	-5,66±2,46	0,07±0,03	0,11±0,05
R 25	3,06±1,38	0,18±0,01	13,58±1,31	-8,87±1,11	0,12±0,01	0,19±0,02
R 45	4,56±2,60	0,18±0,01	14,69±1,51	-8,77±1,26	0,16±0,03	0,23±0,02
Grupo C-OVN (CRM)						
C preisquémico	15,80±2,70	0,36±0,1	10,63±0,93	-6,51±1,03	0,15±0,02	0,26±0,02
C-GST+OVN-preisquemico	14,62±3,96	0,47±0,2	10,22±1,15	-6,65±0,65	0,15±0,02	0,24±0,04
R 5	2,89±0,74	0,49±0,23	11,80±1,35	-8,50±1,46	0,15±0,02	0,24±0,04
R 25	5,05±2,06	0,27±0,14	11,05±1,76	-8,42±1,06	0,13±0,02	0,19±0,03
R 45	4,15±1,65	0,29±0,15	12,16±2,32	-8,36±1,06	0,14±0,02	0,19±0,03
Grupo C-GST+OVN (CRM):						
C preisquémico	15,14±7,24	0,15±0,04	13,95±1,59	-7,55±1,49	0,15±0,02	0,20±0,02
C preisquémico	21,75±10,20	0,17±0,04	13,02±1,84	-7,15±1,52	0,14±0,02	0,20±0,04
R 5	6,05±4,22	0,14±0,04	10,37±2,45	-8,60±1,49	0,14±0,03	0,19±0,04
R 25	8,67±4,29	0,12±0,04	13,22±2,76	-9,45±2,39	0,15±0,01	0,20±0,02
R 45	9,36±4,65	0,12±0,04	12,25±2,69	-8,97±2,55	0,14±0,02	0,15±0,03
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,7194 P= 0,4921, NS. Por tiempo: F= 7,081 P= 0,0001	Por tratamient: F= 6,367 P= 0,0033 Por tiempo: F= 0,6374 P= 0,6380, NS	Por tratamiento: F= 2,033 P= 0,1414, NS. Por tiempo: F= 1,548 P= 0,2024, NS	Por tratamiento: F= 0,5096 P= 0,6038, NS Por tiempo: F= 1,361 P= 0,2604, NS	Por tratamient: F= 3,019 P= 0,0573, NS. Por tiempo: F= 0,4525 P= 0,7701, NS.	Por tratamiento: F= 1,360 P= 0,2653, NS. Por tiempo: F= 2,142 P= 0,0881, NS.

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs GST (CRM)).

1.a.1.4 Participación del óxido nítrico (NO) en los efectos de genisteína en CRH:

La unión de los esteroides sexuales a su receptor, no sólo modifica la expresión genética sino que también genera acciones más rápidas, como la activación de diferentes intermediarios en vías metabólicas, llevando a un aumento en la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Fukumoto y col., 2013), como consecuencia de la activación de la vía fosfatidil inositol 3 kinasa/AKT

(PI3K/AKT) (Murphy y col., 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes se evaluó si las diferencias de género encontradas en los efectos de GST se deben a la estimulación de la síntesis de óxido nítrico (NO) en CRH. Para ello un grupo experimental fue tratado con L-NAME 30 μ M + GST 20 μ M para comparar los efectos con el grupo tratado solamente con GST.

En esta serie de experimentos se observó que L-NAME evitó el inotropismo negativo producido por GST antes de la I, y aceleró la RCPI durante la R sin diferencias en la RCPI al final de la misma, comparado con el grupo tratado con GST (Fig. 27 a). A pesar de que se encontró una disminución en el gasto energético en el grupo tratado con L-NAME + GST (Ht inicial de 13.7 ± 3.2 mW/g) al final de la reperfusión (Fig. 27b), ésta siguió a la tendencia de P, y no hubo diferencias significativas en la economía muscular (ver fig. 27c) ni en la contractura diastólica (ver fig. 27d). Tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de GST y L-NAME+GST en la relación IPt/P (ANOVA de 2 vías por tratamiento: $F= 0,6454$, $p=0.42$) ni en las velocidades relativas $+P/P$ (ANOVA de 2 vías por tratamiento: $F= 0,18$, $p=0.67$). Pero la $-P/P$ resultó levemente más alta en el grupo de L-NAME + GST (ANOVA de 2 vías por tratamiento: $F= 5,25$, $p=0.026$).

Estos resultados sugieren que la producción de NO jugaría en rol menor en los efectos postisquémicos de GST, participando en el inotropismo negativo previo a la isquemia.

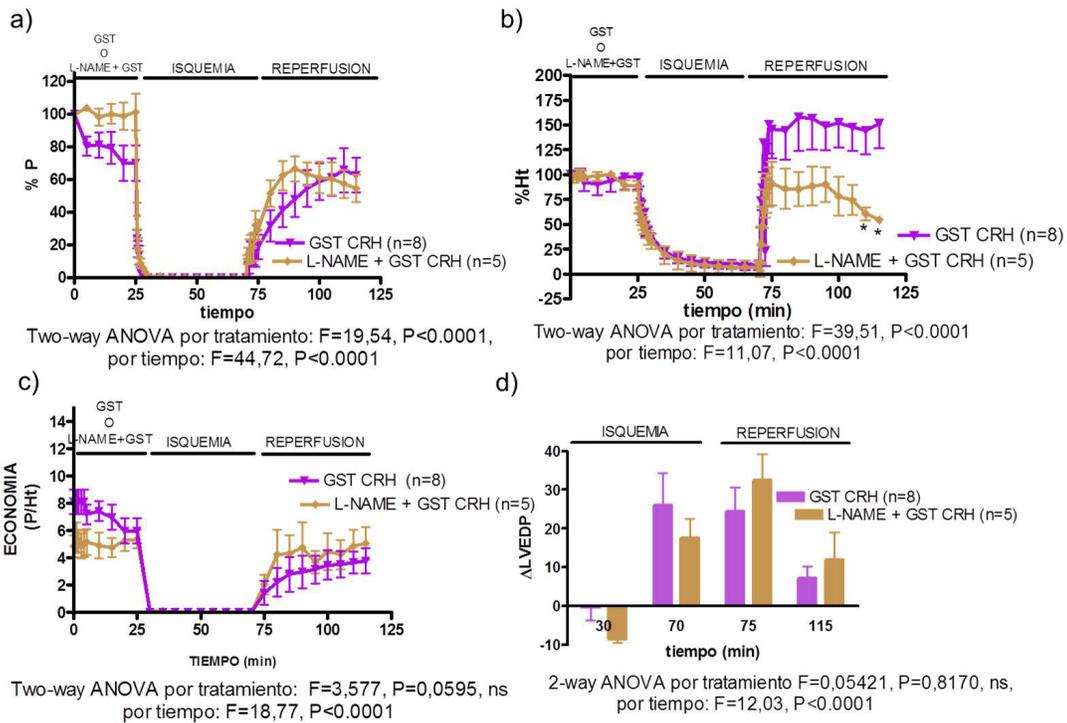


Fig. 27: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) y contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de rata hembra (CRH) tratados con GST 20 μ M o L-NAME 30 μ M + GST 20 μ M antes de ser expuestos a isquemia global y a reperfusion con Krebs-C (I/R). Se indican los resultados del ANOVA de 2 vías y de las diferencias significativas por el test de Bonferroni (* $p<0.05$ vs GST).

1.a.1.5 Efectos de genisteína y de orto-vanadato sobre el contenido de Ca^{2+} sarcorreticular:

Para evaluar si los efectos inotrópicos negativos de GST y su reversión con OVN en CRM fueron generados por cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS, se realizaron experimentos en los cuales luego del tratamiento y del período de isquemia, se reperfundieron los corazones con Sc. Krebs conteniendo 10 mM de cafeína (para liberar el Ca^{2+} desde el RS) y 36 mM de Na^+ (para

evitar la salida de Ca^{2+} por el NXC-SL). Con este protocolo la reperfusión genera una contractura y un aumento en el flujo de calor liberado (ver fig. 28).

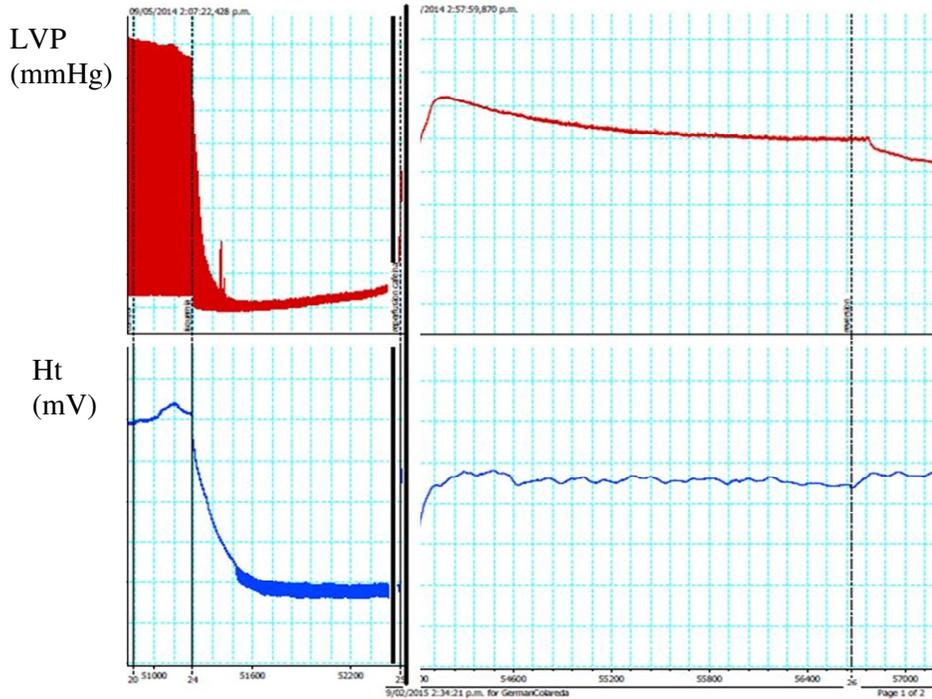


Fig. 28: Registro experimental simultáneo (adquisición analógico/digital) de las señales provenientes de la presión intraventricular (LVP en mmHg, rojo) y del flujo de calor total liberado (Ht en mV, azul) del corazón aislado de rata tratado con GST y sometido a 45 minutos de isquemia global de no-flujo seguido de 45 minutos de reperfusión con Sc. Krebs conteniendo 10 mM de cafeína y 36 mM de Na^+ . No se puede visualizar en el registro el inicio de la reperfusión, debido a su alta frecuencia de muestreo.

Por otra parte, la falta de efecto de GST en CRH sugirió la acción sobre un mecanismo positivo que podría contrarrestar el inotropismo negativo visto en CRM, y se hipotetizó que podría ser el aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el RS al citosol. Se efectuó entonces el mismo protocolo de reperfusión con Krebs-10 mM cafeína-36 mM Ca^{2+} para evaluar si estaba afectado el contenido de Ca^{2+} del RS o su liberación.

Las fig. 29a y 30a, muestran que GST redujo la velocidad de relajación de la contractura dependiente de cafeína, tanto en CRM como en CRH. Se calculó la constante (k) de la caída exponencial de la contractura durante la reperfusión, las cuales fueron de -0.0260 ± 0.0120 , de -0.0055 ± 0.0018 y $-0.0122 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ para los grupos control, GST-CRH y GST+CRM respectivamente (comparación no paramétrica de Kruskal-Wallis: $p=0.05$). En esta condición de estimulación del RS en ausencia de eflujo de Ca^{2+} por el NXC-SL el único transportador capaz de quitar Ca^{2+} del citosol es el uniporter de Ca^{2+} mitocondrial (UCam). Estos resultados sugieren que GST reduciría el transporte de Ca^{2+} desde el citosol hacia las mitocondrias por el UCam.

En la fig. 29a, también se observa que la contractura inducida por cafeína (ΔLVP) en CRM fue levemente más baja en el grupo de GST que en los grupos control y OVN+GST. Además se observó un aumento en el gasto energético (Ht) para el grupo de OVN+GST (Fig. 29b). La Fig. 29c muestra que no hubo diferencias en el área bajo la curva de la contractura en la reperfusión, calculada sobre la línea de base de la isquemia ($\text{ABC}-\Delta\text{LVP}$). En cambio, la Fig. 29d muestra que el área bajo la curva de Ht respecto del nivel preisquémico ($\text{ABC}-\Delta\text{Ht}$) fue significativamente más alto para el grupo de OVN+GST que para los grupos control y GST (ANOVA: $F= 13,43$, $p<0.0001$). Estos resultados sugieren que GST tiende a reducir la liberación inicial de Ca^{2+} del RS pero no su contenido, y OVN, al oponerse a su acción inhibitoria de la vía de TK, aumenta el gasto energético probablemente asociado al aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el RS.

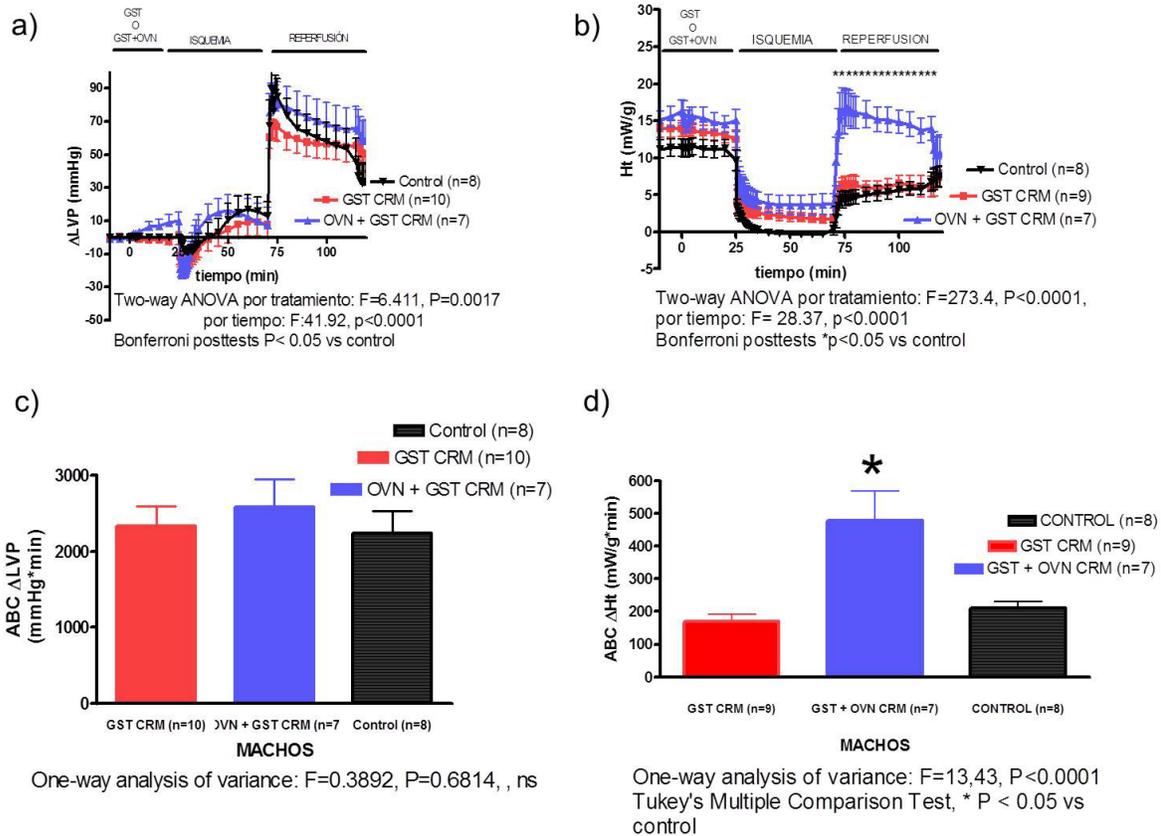


Fig. 29: Efectos de $20 \mu M$ de GST en ausencia y presencia de $10 \mu M$ de OVN agregados antes de la isquemia en CRM y reperfundidos con solución Krebs conteniendo $10 mM$ de cafeína- $36 mM$ de Na^+ , en comparación con un grupo de corazones no tratados antes de la I/R. En a) cambios en LVP medido sobre la condición preisquémica (en mmHg), b) flujo de calor total (Ht en mW/g), c) Área debajo de la curva de la contractura en la reperfundición (ABC- ΔLVP) y d) área bajo la curva de Ht en la reperfundición (ABC- ΔHt).

En CRH tampoco hubo cambios en el ABC- ΔLVP en el grupo GST versus control (Fig 30 a y c), aunque GST potenció la contractura diastólica durante la isquemia. Considerando que, durante la reperfundición, el NXC-SL se encuentra inhibido por el bajo contenido de Na^+ en la sc. Krebs y la recaptación de Ca^{2+} por el RS se mantiene compensada por la liberación sostenida, los dos únicos mecanismos que podrían participar en la relajación de esta contractura son la Ca^{2+} ATPasa

sarcolemal y el uniporter de Ca^{2+} mitocondrial (UCam). Por lo tanto evaluamos si al menos parte del mecanismo de inotropismo positivo de GST en CRH (que balancea al negativo visto en CRM) era debido a una inhibición de la captación mitocondrial por el UCam. Para poner a prueba esta hipótesis se pretrataron los corazones con GST junto con piruvato de sodio (PIR) 10 mM, un sustrato aeróbico que estimula la captación del UCam (Mallet 2005; Bonazzola y col. 2014). La fig. 30 (a y b) muestra que PIR redujo la contractura isquémica exacerbada por GST ,y generó un aumento en el gasto energético durante la R, pero no modificó el ABC- Δ LVP (Fig. 30c). El ABC- Δ Ht fue significativamente más alta para el grupo PIR+GST que para el grupo tratado con GST o el grupo control, los cuales no fueron diferentes entre sí (Fig. 30d). Estos resultados sugieren que la contractura diastólica podría ser inducida por la inhibición del UCam generada por GST.

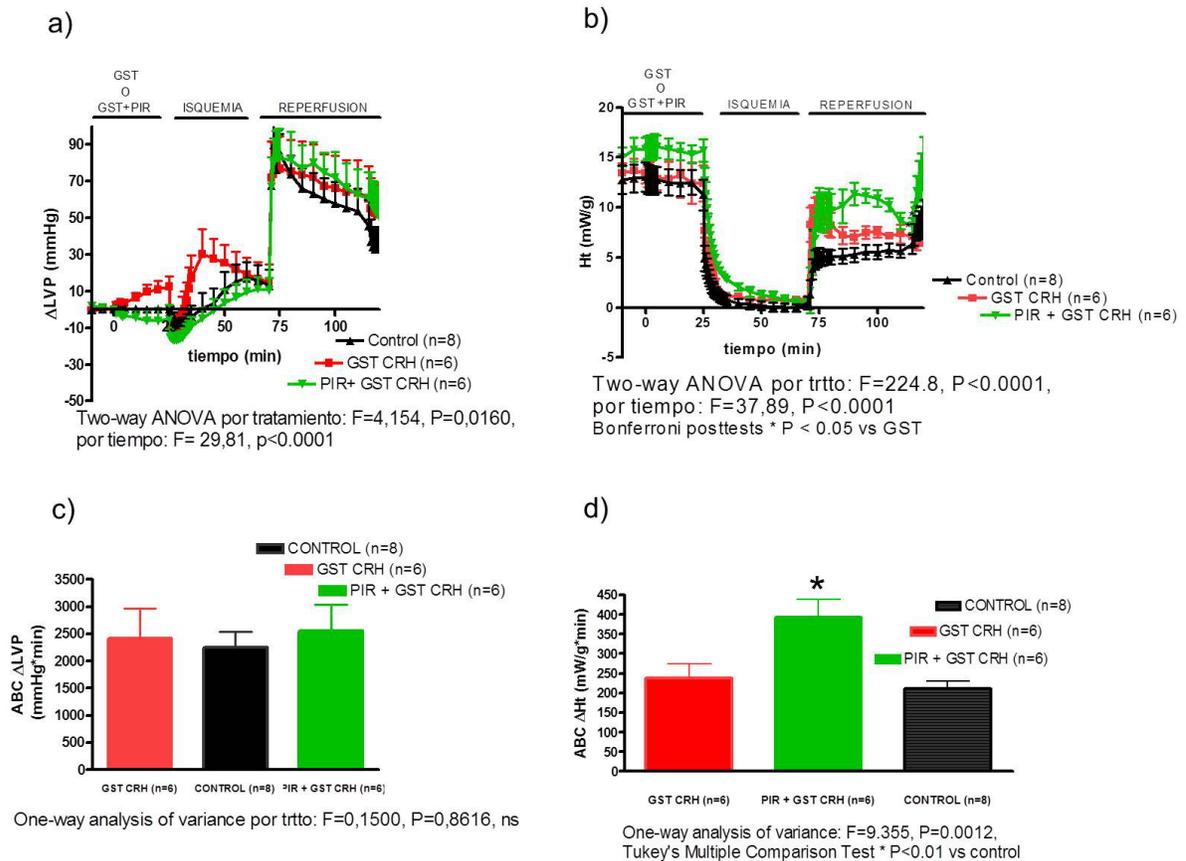


Fig. 30: Efectos de 20 μ M de GST en ausencia y presencia de 10 mM de PIR agregados antes y durante la isquemia en CRH y reperfundidos con solución Krebs conteniendo 10 mM de cafeína-36 mM de Na^+ , en comparación con el grupo sin tratamiento previo a la I/R (control). En a) cambios en LVP medido sobre la condición preisquémica (en mmHg), b) flujo de calor total (Ht en mW/g), c) área debajo de la curva de contractura en la reperfusión (ABC- Δ LVP) y d) área bajo la curva de Ht en la reperfusión (ABC- Δ Ht).

1.a.2. Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión a 37°C:

Teniendo en cuenta los resultados encontrados en rata a 30°C se hipotetizó la existencia de un mecanismo preventivo positivo de GST en CRH que compense el efecto negativo sobre RCPI predominante en CRM. Para ponerlos en evidencia se intentó desbalancear ambos tipos de efectos evaluando la presencia de GST durante todo el período de I/R en la condición más fisiológica de 37 °C. Es conocido que la temperatura afecta más las velocidades de mecanismos de transporte facilitado (como la SERCA y el NXC-SL) que la cinética de los canales iónicos a los cuales GST inhibe.

1.a.2.1 Efectos de genisteína 20 μM durante todo el período I/R en CRH:

Como se muestra en la Fig. 31a, en este modelo de atontamiento a 37°C con 20 minutos de isquemia, el grupo control (P inicial $79,0 \pm 8,7$ mmHg) recuperó durante la reperfusión hasta el $67,9 \pm 4,3$ % de la P inicial. El tratamiento con GST (P inicial de $75,0 \pm 8,1$ mmHg) recuperó más lentamente que el control, pero similarmente al final de R ($52,6 \pm 9,2$ %, NS). En la energética, el grupo control (con Ht inicial de $20,2 \pm 1,5$ mW/g), recuperó hasta el $79,3 \pm 7,2$ % del inicial. Pero el tratamiento con GST (Ht inicial de $16,4 \pm 1,4$ mW/g) redujo el gasto energético durante R (recuperando hasta el $44,6 \pm 6,2$ %) (Fig. 31 b). Por lo tanto, el pretratamiento con GST aumentó la economía (P/Ht) durante R, llegando a $5,5 \pm 1,0$ mmHg.g/mW a los 45 minutos, el cual es mayor que en el grupo control ($3,2 \pm 0,5$ mmHg.g/mW) (Fig. 31 c).

Sin embargo, la Fig. 31d muestra que GST indujo un aumento de la contractura diastólica durante la I, que se mantuvo alto durante la R (Δ LVEDP) . En la tabla 4 se observa que GST aceleró la velocidad normalizada de relajación ($-P/P$) de las contracciones durante R, sin modificar

significativamente los tiempos de contracción ni de relajación de las contracciones isovolúmicas, el cociente IPt/P ni la velocidad normalizada de contracción (+P/P).

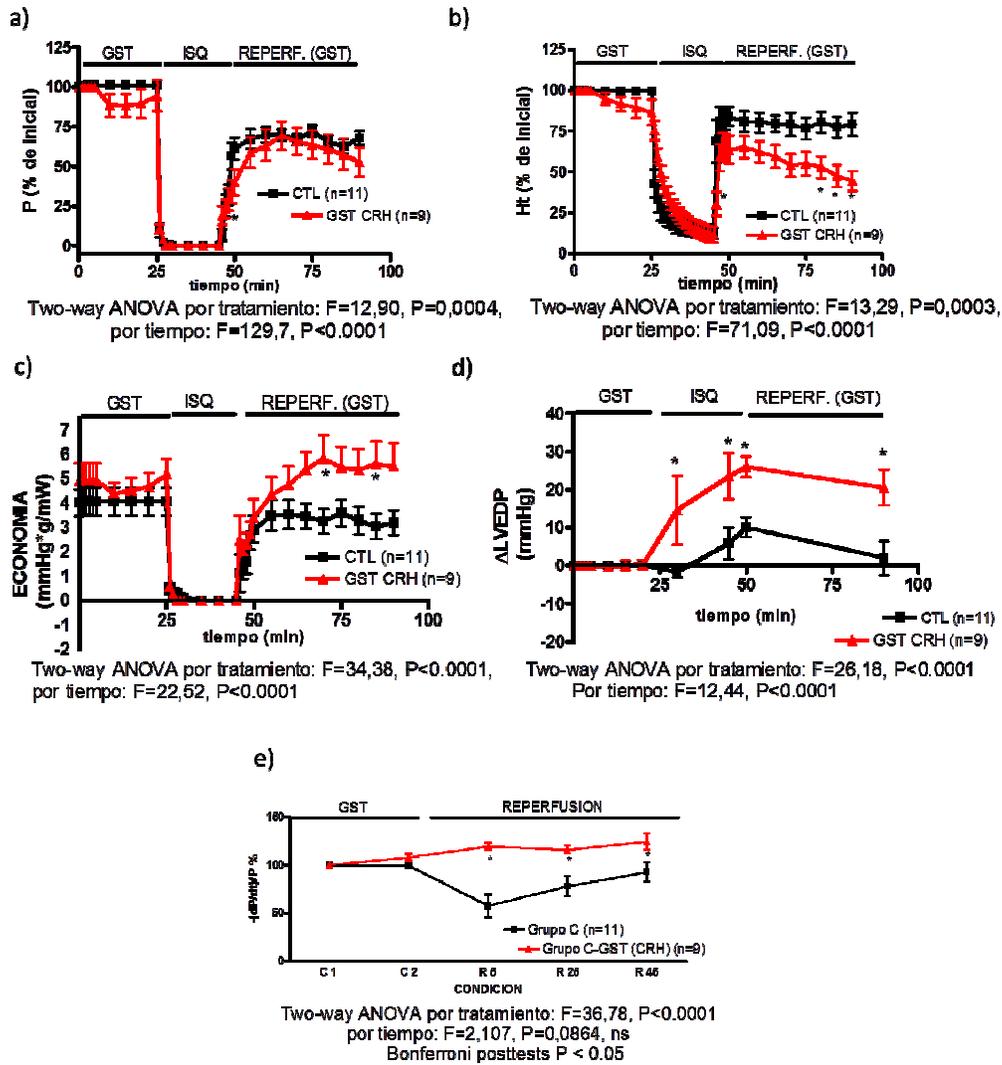


Fig. 31: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d), cambios porcentuales en la $-dP/dt/P$ respecto al inicio en corazones de rata hembra (CRH), tratados con GST 20 μ M antes de la isquemia global y durante la reperusión (I/R) en el modelo de atontamiento a 37°C. Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$ vs control

Tabla 4: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones controles (n=11) o CRH tratados con GST 20 μ M (antes de la isquemia y durante la reperfusión) (n=9), expuestos a 20 minutos de isquemia a 37°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C (CRH):						
C preisquémico	16,41±2,93	0,18±0,02	16,29±1,67	-8,64±1,26	0,17±0,01	0,16±0,01
C- preisquemico	16,46±2,91	0,12±0,01	15,98±1,70	-8,56±1,25	0,17±0,01	0,16±0,01
R 5	4,10±1,01	0,10±0,02	9,91±2,20	-5,87±1,83	0,175±0,01	0,15±0,01
R 25	5,76±1,20	0,11±0,02	13,40±2,98	-6,88±1,58	0,16±0,01	0,16±0,01
R 45	6,15±1,44	0,13±0,02	15,66±3,81	-7,99±1,48	0,15±0,01	0,17±0,01
Grupo C-GST- -R-GST (CRH):						
C preisquémico	14,73±1,21	0,12±0,01	14,85±0,98	-11,38±0,64	0,13±0,01	0,17±0,01
C-GST preisquemico	13,07±1,89	0,11±0,01	15,44±0,89	-12,34±0,87	0,12±0,01	0,16±0,01
R 5	4,78±0,97	0,11±0,01	15,35±0,81	-13,84±1,25*	0,14±0,02	0,14±0,01
R 25	8,58±1,26	0,11±0,01	14,69±0,85	-13,29±1,03*	0,13±0,01	0,14±0,01
R 45	6,70±1,22	0,11±0,01	15,97±0,95	-14,18±1,22*	0,13±0,01	0,13±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,03019 P= 0,8625, NS. Por tiempo: F= 15,43 P<0.0001	Por tratamiento: F= 1,916 P= 0,1701, NS. Por tiempo: F= 2,232 P= 0,0728, NS.	Por tratamiento: F= 0,5512 P= 0,4598, NS. Por tiempo: F= 0,8149 P= 0,5190, NS.	Por tratamiento: F= 40,27 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,2637 P= 0,9005, NS.	Por tratamiento: F= 14,92 P=0,0002 Por tiempo: F= 0,6945 P= 0,5977, NS.	Por tratamiento: F= 3,701 P = 0,0576, NS. Por tiempo: F= 1,532 P= 0,1998, NS.

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 2 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

Los resultados indican que la perfusión de GST 20 μ M en CRH a 37°C no mejoró el atontamiento, y empeoró la contractura diastólica. Sólo mejoró la energética, quizás por estar en condiciones más óptimas de temperatura para el metabolismo.

1.a.2.2 Efectos de genisteína 2 μ M durante todo el período I/R :

Para evaluar si los efectos de GST podrían depender de la concentración utilizada, se perfundieron los corazones aislados de rata con Sc. Krebs conteniendo 2 μ M de GST antes de la isquemia y durante la reperfusión, este protocolo se realizó tanto en machos como en hembras para observar si existen diferencias de género. Se eligió esta concentración por haber sido reportada como la concentración plasmática obtenida en el consumo frecuente de este fitoestrógeno (Setchell, 1998).

En estas condiciones (P inicial = $77,0 \pm 13,1$ y $88,1 \pm 7,6$ mmHg para CRH y CRM respectivamente) GST 2 μ M también lentificó la recuperación contráctil pero finalmente alcanzó similar RCPI al final de R que el grupo control (Fig. 32a). Se observa que GST (Ht inicial de $18,9 \pm 2,1$ y $22,3 \pm 2,1$ mW/g para CRH y CRM respectivamente) demoró la recuperación energética recuperando ambos el mismo grado que el grupo control (ver fig. 32 b). Por lo tanto, GST a 2 μ M no modificó la economía en ninguno de los géneros (fig. 32 c). Sin embargo, al igual que a mayor concentración, GST a 2 μ M aumentó la contractura diastólica al final de I y el inicio de R en comparación con el grupo control (Fig 32d).

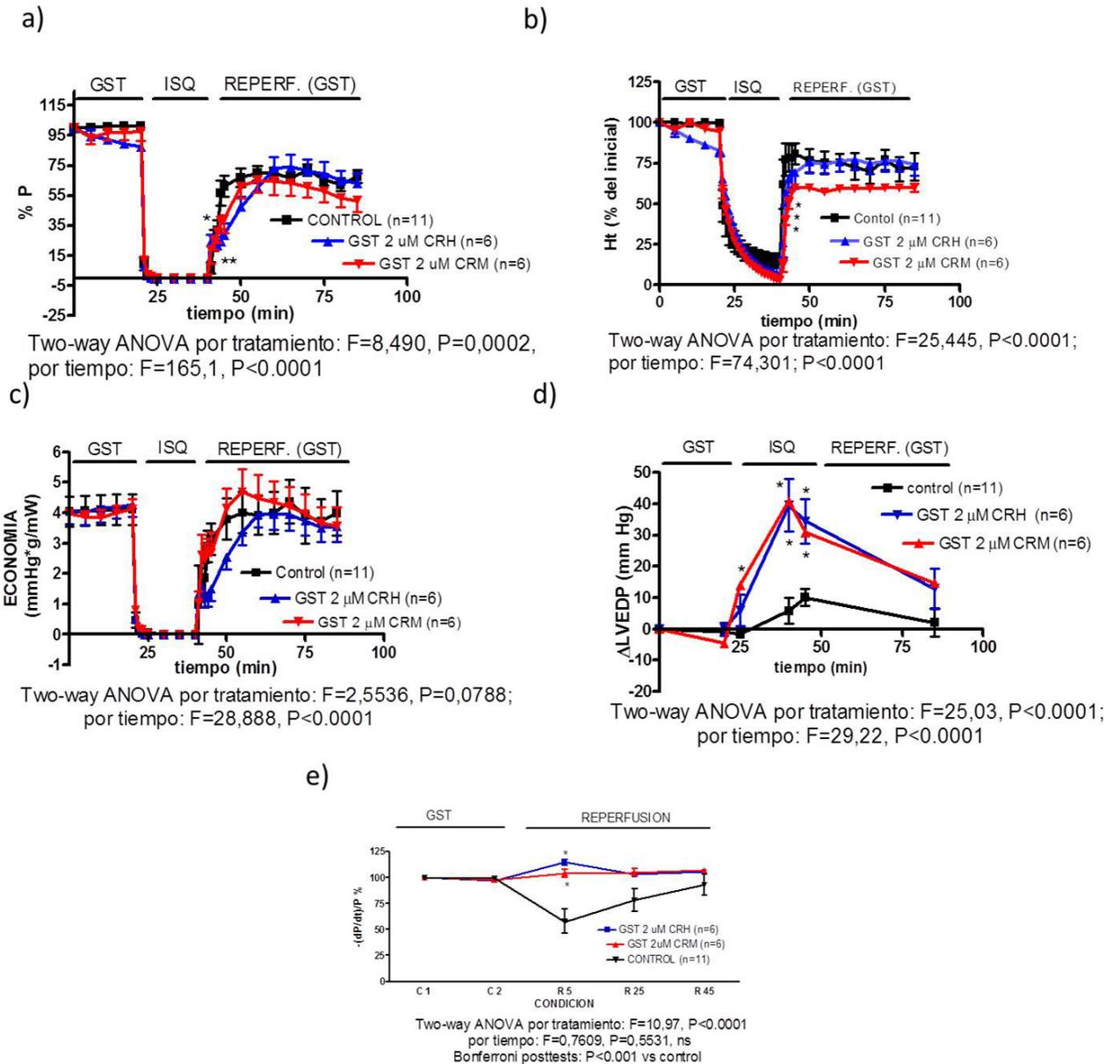


Fig. 32: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (C) contractura diastólica (Δ LVDP) (d), cambios porcentuales en la $-(dP/dt)/P$ respecto al inicio, en corazones de rata hembra (CRH) tratados con GST 2 μ M antes de la isquemia global y la reperfusion (I/R) en el modelo de atontamiento a 37°C. Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0,05$ vs control.

A esta baja concentración de 2 μM , GST también aumentó la velocidad normalizada de relajación (-P/P) de las contracciones durante R, y redujo los tiempos de contracción y de relajación de las contracciones isovolúmicas, pero no modificó la velocidad normalizada de contracción (+P/P), ni la relación IPt/P (ver tabla 5).

Tabla 5: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata tratados con GST 2 μM (antes de la isquemia y durante la reperfusión), expuestos a 20 minutos de isquemia a 37°C.

	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C:						
C preisquémico	16,41±2,93	0,18±0,02	16,29±1,67	-8,64±1,26	0,17±0,01	0,16±0,01
C- preisquemico	16,46±2,92	0,12±0,01	15,98±1,70	-8,56±1,25	0,17±0,01	0,16±0,01
R 5	4,10±1,01	0,10±0,02	9,91±2,20	-5,87±1,83	0,175±0,01	0,15±0,01
R 25	5,76±1,20	0,11±0,02	13,40±2,98	-6,88±1,58	0,16±0,01	0,16±0,01
R 45	6,15±1,44	0,13±0,02	15,66±3,81	-7,99±1,48	0,15±0,01	0,17±0,01
Grupo C-GST 2 μM (CRH):						
C preisquémico	16,27±1,90	0,11±0,01	14,91±0,18	-13,06±0,71	0,18±0,01	0,15±0,01
C-GST preisquemico	14,53±1,72	0,11±0,01	14,75±0,25	-12,66±0,72	0,18±0,01	0,15±0,01
R 5	5,02±0,58	0,12±0,01	15,04±0,36	-14,95±0,89*	0,15±0,03	0,12±0,01
R 25	12,54±2,23	0,11±0,01	14,53±0,22	-13,40±0,67*	0,19±0,01	0,14±0,01
R 45	10,67±1,93	0,11±0,01	15,24±0,31	-13,71±0,70*	0,19±0,02	0,14±0,01
Grupo C-GST 2 μM (CRM):						
C preisquémico	15,01±1,06	0,10±0,01	17,27±1,76	-14,44±1,27	0,12±0,02	0,14±0,02
C-GST preisquemico	15,12±1,64	0,10±0,01	17,13±1,62	-14,02±1,14	0,13±0,02	0,14±0,02
R 5	6,83±1,07	0,10±0,01	16,97±1,62	-14,85±1,04*	0,14±0,02	0,12±0,01
R 25	9,65±1,82	0,10±0,01	17,82±1,75	-14,98±1,11*	0,13±0,02	0,12±0,01
R 45	7,34±1,03	0,10±0,01	18,23±1,80	-15,36±1,22*	0,12±0,02	0,12±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 1,314 P= 0,2733, NS. Por tiempo: F= 14,72 P<0.0001	Por tratamiento: F= 3,078 P= 0,0509, NS. Por tiempo: F= 0,9243 P= 0,4535, NS	Por tratamiento: F= 2,493 P=0,0878, NS Por tiempo: F= 14,72 P<0.0001	Por tratamiento: F= 41,38 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,08811 P= 0,9860, NS	Por tratamiento: F= 8,304 P=0,0005 Por tiempo: F= 0,2270 P= 0,9227, NS	Por tratamiento: F=8,368 P =0,0004 Por tiempo: F= 1,245 P=0,2969, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

1.a.2.3 Efectos de genisteína 20 μ M perfundida previo a la isquemia:

Para evaluar si los efectos de GST en el modelo de atontamiento a 37°C se producían durante la I, la R o ambos, en otra serie de experimentos, se evaluaron los efectos del tratamiento con GST 20 μ M agregada únicamente antes del período isquémico, y permaneciendo en contacto durante éste.

En la fig. 33a se observa que GST redujo el inotropismo previo a la I, más en CRM que en CRH, pero no modificó la RCPI en ninguno de los dos géneros. Hubo una tendencia a aumentar el gasto energético durante la reperfusión en CRH (Fig. 33b), que generó una reducción de la economía muscular total (P/Ht) respecto del grupo control (Fig. 33c). Además, GST aumentó la contractura muscular en CRM durante la isquemia y en ambos sexos en los primeros minutos de la reperfusión (Fig 33d).

Al igual que ocurría cuando se trataba con GST durante todo el período de I/R, el pretratamiento con GST 20 μ M aumentó la velocidad normalizada de relajación ($-P/P$) de las contracciones durante R y redujo los tiempos de contracción y de relajación de las contracciones isovolúmicas (ver tabla 6).

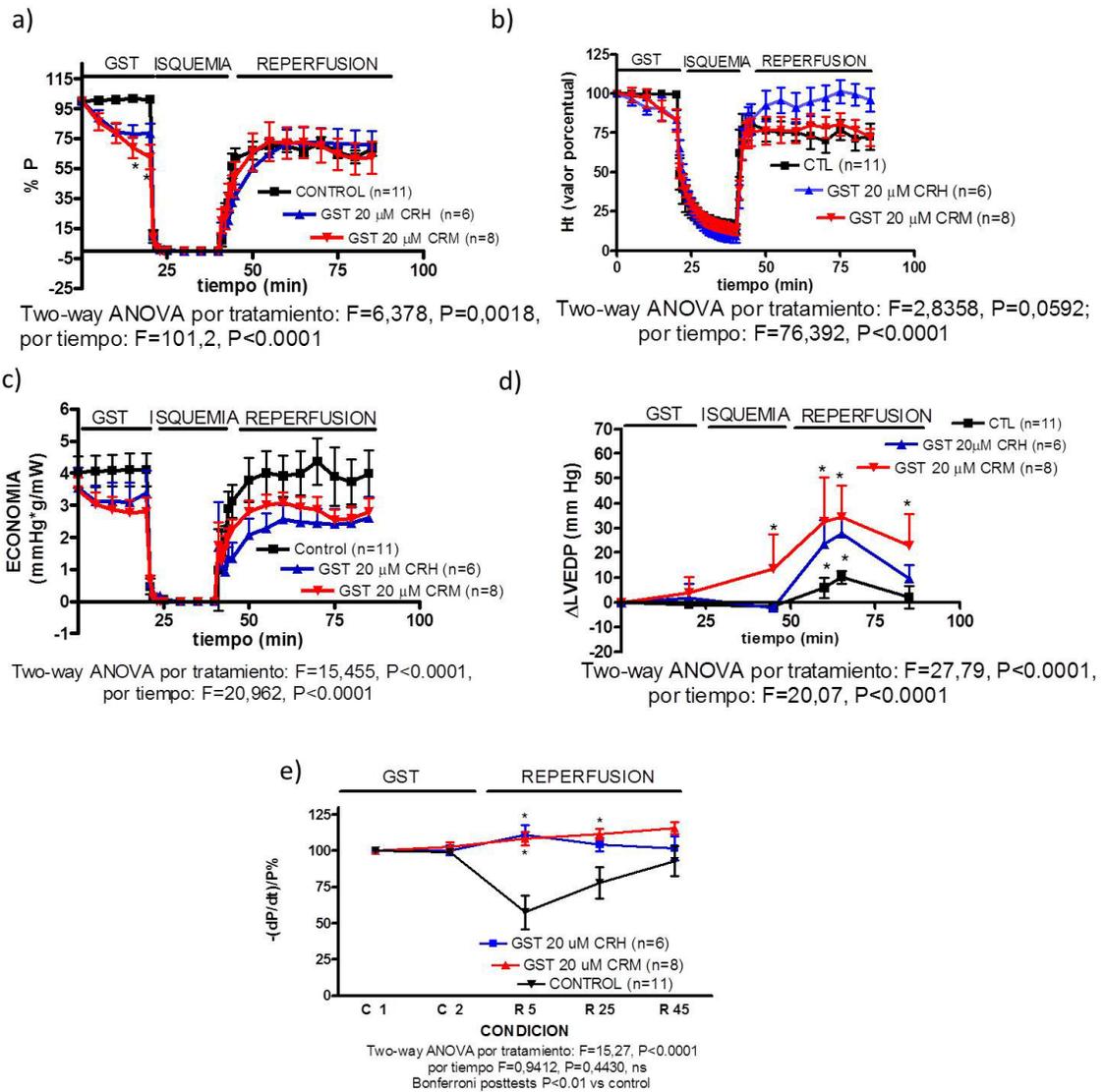


Fig. 33: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d), cambios porcentuales en la $-(dP/dt)/P$ respecto al inicio en corazones de rata hembra (CRH) y macho (CRM), tratados con GST 20 μ M previamente al período de isquemia en el modelo de atontamiento a 37°C. Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0,05$ vs control.

Tabla 6: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata controles (n=11) o pretratados con GST (CRH n=6; CRM n=8), expuestos a 20 min de isquemia a 37°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C:						
C preisquémico	16,41±2,93	0,18±0,02	16,29±1,67	-8,64±1,26	0,17±0,01	0,16±0,01
C- preisquemico	16,46±2,92	0,12±0,01	15,98±1,70	-8,56±1,25	0,17±0,01	0,16±0,01
R 5	4,10±1,01	0,10±0,02	9,91±2,20	-5,87±1,83	0,175±0,01	0,15±0,01
R 25	5,76±1,20	0,11±0,02	13,40±2,98	-6,88±1,58	0,16±0,01	0,16±0,01
R 45	6,15±1,44	0,13±0,02	15,66±3,81	-7,99±1,48	0,15±0,01	0,17±0,01
Grupo C-GST 20 µM (CRH):						
C preisquémico	14,60±0,76	0,13±0,01	14,71±0,69	-10,72±0,48	0,15±0,01	0,19±0,01
C-GST preisquemico	11,05±0,80	0,13±0,01	14,96±0,66	-10,75±0,61	0,15±0,01	0,19±0,01
R 5	4,85±1,02	0,12±0,01	14,00±0,59	-11,92±1,02*	0,16±0,02	0,16±0,01
R 25	9,51±1,50	0,12±0,01	14,40±0,81	-11,24±0,81	0,16±0,02	0,16±0,01
R 45	9,91±1,63	0,13±0,01	15,21±1,00	-10,85±0,97	0,16±0,01	0,18±0,01
Grupo C-GST 20 µM (CRM):						
C preisquémico	17,20±1,20	0,10±0,01*	16,67±1,24	-13,84±1,58	0,12±0,01	0,15±0,02
C-GST preisquemico	11,06±1,58	0,11±0,01	16,21±1,10	-14,10±1,42*	0,13±0,01	0,14±0,02
R 5	3,97±0,76	0,10±0,01	16,97±1,76	-14,71±1,28*	0,13±0,02	0,13±0,01
R 25	5,73±1,04	0,10±0,01	17,11±1,31	-15,19±1,43*	0,14±0,01	0,13±0,01
R 45	4,52±0,72	0,10±0,01	17,57±1,52	-15,81±1,57*	0,14±0,01	0,13±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,9494 P= 0,3901, NS. Por tiempo: F= 20,88 P<0.0001	Por tratamiento: F= 3,686 P= 0,0285. Por tiempo: F= 1,329 P= 0,2644	Por tratamiento: F= 2,202 P=0,1154, NS. Por tiempo: F= 0,6109 P= 0,6556, NS	Por tratamiento: F= 33,88 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,08929 P= 0,9856, NS	Por tratamiento: F= 6,051 P=0,0032 Por tiempo: F= 0,1267 P= 0,9725, NS	Por tratamiento: F= 8,808 P =0,0003 Por tiempo: F= 1,217 P= 0,3076, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

1.a.2.4 Influencia de la estimulación adrenérgica sobre los efectos de genisteína en corazones de rata hembra:

Debido a que en corazones de rata macho a 30°C, GST reducía la RCPI y este efecto no fue observado a 37°C, hipotetizamos que la temperatura cambiaría el balance de efectos de GST entre la inhibición de la corriente de Ca^{2+} L y los mecanismos sarcoreticulares. Consideramos que “in vivo” hay una importante acción adrenérgica que podría modificar ambos tipos de efectos de GST, actuando en forma opuesta en los canales de Ca^{2+} , por lo que decidimos evaluar esta interacción a 37°C. Se estudiaron las posibles influencias del género.

La Fig. 34a muestra que en CRH, el agregado de GST a adrenalina (ADRE) generó una tendencia a mejorar la RCPI respecto de los corazones tratados solamente con ADRE, recuperando hasta el $73.3 \pm 6.9 \%$ (del P inicial) al final de la R para ADRE + GST versus el $56.6 \pm 6.5 \%$ para ADRE. En simultáneo, GST redujo la liberación de calor postisquémica (Fig. 34b), por lo cual mejoró significativamente la economía muscular total (P/Ht) (Fig. 34c). Por otra parte, ADRE aumentó la contractura diastólica más que el grupo control ($+28.3 \pm 12.7$ mmHg vs $+5.8 \pm 4.1$ mmHg como máximo en la isquemia) de acuerdo a sus efectos estimulantes del influjo de Ca^{2+} . Y llamativamente, el agregado de GST aún elevó más la ΔLVEDP durante la isquemia ($+50.4 \pm 5.8$ mmHg). Ambas drogas mantuvieron una contractura en la reperfusión, pero ésta fue menor que en la isquemia en el grupo tratado con GST+ADRE (Fig. 34d).

Los resultados muestran que a 37°C y en presencia de adrenalina GST mejora la RCPI de los CRH (hasta un $80 \pm 6\%$) algo más que en ausencia de ADRE (un $69 \pm 8 \%$ en la Fig. 33), y potencia los efectos de adrenalina en el tono diastólico durante la I/R.

El agregado de ADRE a GST en CRH no modificó los valores de IPt/P , los tiempos de contracción (t_{pp}) y relajación ($t_{R1}+t_{R2}$) de las contracciones isovolúmicas, ni las velocidades normalizadas de contracción y relajación ($+P/P$ y $-P/P$). Es importante destacar que, si bien GST sola aceleró la relajación de las contracciones durante R, en el grupo de ADRE+GST este efecto se

enmascaró por la presencia previa de ADRE, sugiriendo que ambas tienen el mismo efecto sobre el RS (Tabla 7).

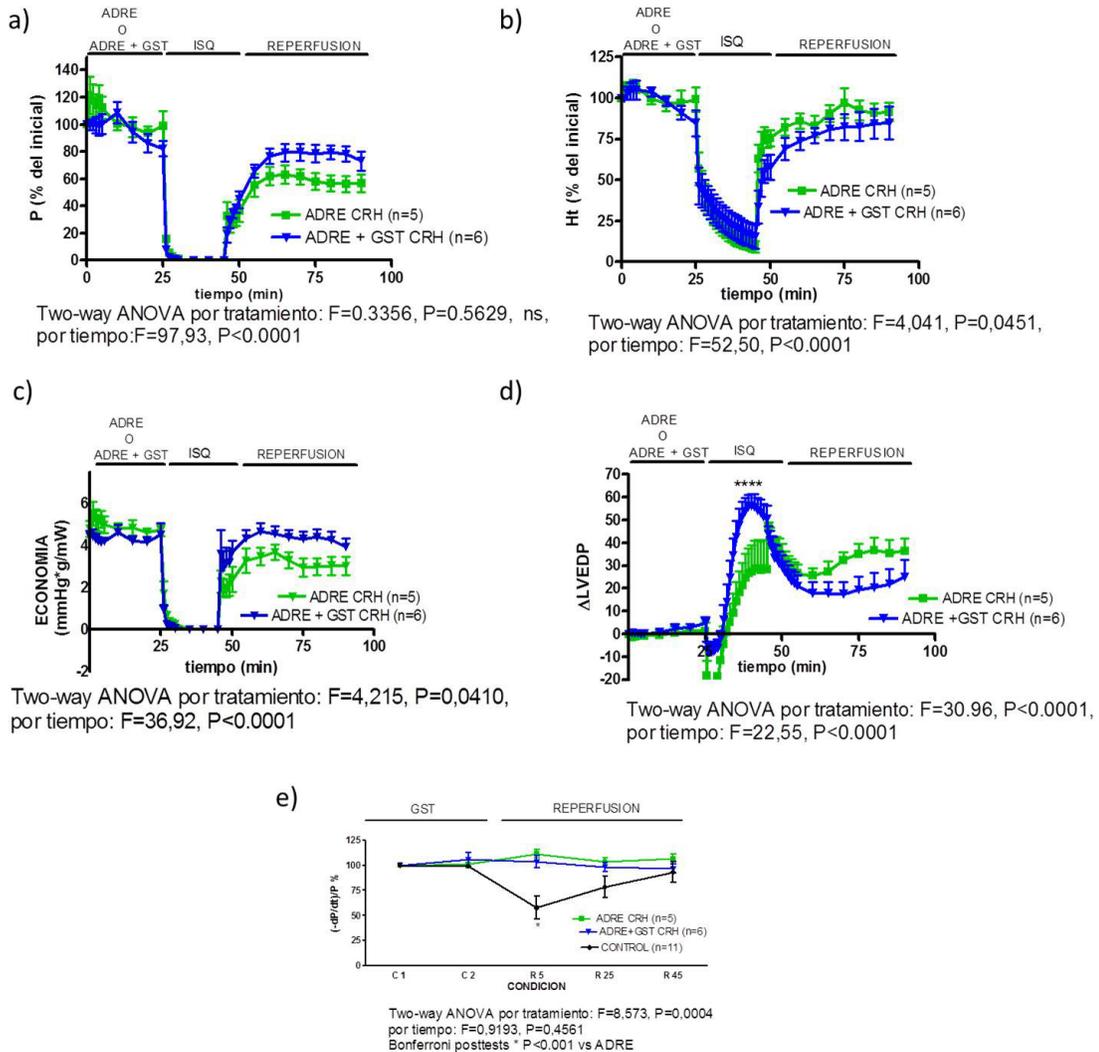


Fig. 34: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d), cambios porcentuales en la $-dP/dt/P$ respecto al inicio en corazones de rata hembra (CRH) tratados con adrenalina $0.05 \mu\text{M}$ (ADRE) o adrenalina $0.05 \mu\text{M}$ + genisteína $20 \mu\text{M}$ (ADRE + GST) previos a la exposición a isquemia global y reperfusion (I/R) a 37°C . Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$.

Tabla 7: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata hembra pretratados con adrenalina 0.05 μM ($n=5$) o adrenalina 0.05 μM + genisteína 20 μM ($n=6$), expuestos a 20 min de isquemia a 37°C.

	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	$t_{c1} + t_{c2}$	$t_{R1} + t_{R2}$
Grupo C-ADRE (CRH):						
C preisquémico	12,33±1,63	0,12±0,01	16,24±0,73	-11,09±1,09	0,15±0,01	0,17±0,01
ADRE preisquemico	12,75±2,33	0,12±0,01	16,12±0,66	-11,20±1,13	0,14±0,01	0,18±0,01
R 5	4,53±1,23	0,11±0,01	16,58±1,10	-12,37±1,38	0,14±0,02	0,14±0,02
R 25	7,78±1,34	0,12±0,01	16,18±0,54	-11,46±1,09	0,16±0,01	0,15±0,02
R 45	6,95±1,21	0,12±0,01	16,42±0,82	-11,67±0,92	0,16±0,03	0,14±0,01
Grupo C-ADRE + GST (CRH):						
C preisquémico	10,99±0,95	0,13±0,01	15,25±1,24	-10,70±0,86	0,145±0,02	0,18±0,02
ADRE + GST preisq.	8,60±1,18	0,12±0,01	15,68±1,10	-11,11±0,67	0,13±0,01	0,175±0,02
R 5	5,00±1,05	0,12±0,01	15,22±1,28	-10,99±0,90	0,16±0,02	0,17±0,02
R 25	9,01±1,25	0,13±0,01	15,25±1,27	-10,40±0,77	0,145±0,01	0,17±0,01
R 45	8,44±1,34	0,13±0,01	15,61±1,32	-10,23±0,77	0,15±0,02	0,17±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,2816 P= 0,5982, NS. Por tiempo: F=7,794 P<0.0001	Por tratamiento: F= 1,888 P= 0,1763, NS. Por tiempo: F= 0,09124 P= 0,9847, NS	Por tratamiento: F= 1,704 P= 0,1984, NS. Por tiempo: F= 0,02574 P= 0,9987, NS.	Por tratamiento: F= 1,452 P=0,2345, NS. Por tiempo: F= 0,2577 P= 0,9035, NS.	Por tratamiento: F= 0,2241 P=0,6382, NS. Por tiempo: F= 0,5327 P= 0,7123, NS.	Por tratamiento: F= 3,061 P=0,0870, NS. Por tiempo: F= 0,8552 P= 0,4981, NS.

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 2 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (* $p<0.05$).

1.a.2.5 Influencia de la estimulación adrenérgica sobre los efectos de genisteína en corazones de rata macho:

En los CRM sometidos a estimulación adrenérgica, fue más significativo que en CRH el aumento en la RCPI y en la economía muscular (P/Ht) producido por el agregado de GST a ADRE, respecto del grupo de ADRE (Fig. 35 a y c), asociados a una tendencia a reducir el costo energético de la reperfusión (Fig. 35b). Al finalizar R, GST aumentó la economía respecto de la desarrollada por ADRE (a 5.1 ± 0.75 vs. 2.0 ± 0.3 mmHg.g/mW, respectivamente, Fig. 35c) Al igual que en los CRH, GST potenció la contractura diastólica desarrollada por ADRE durante la isquemia, pero

ambas promovieron la relajación de la misma durante la reperfusión (Fig. 35d). Este último efecto fue más importante en machos que en hembras.

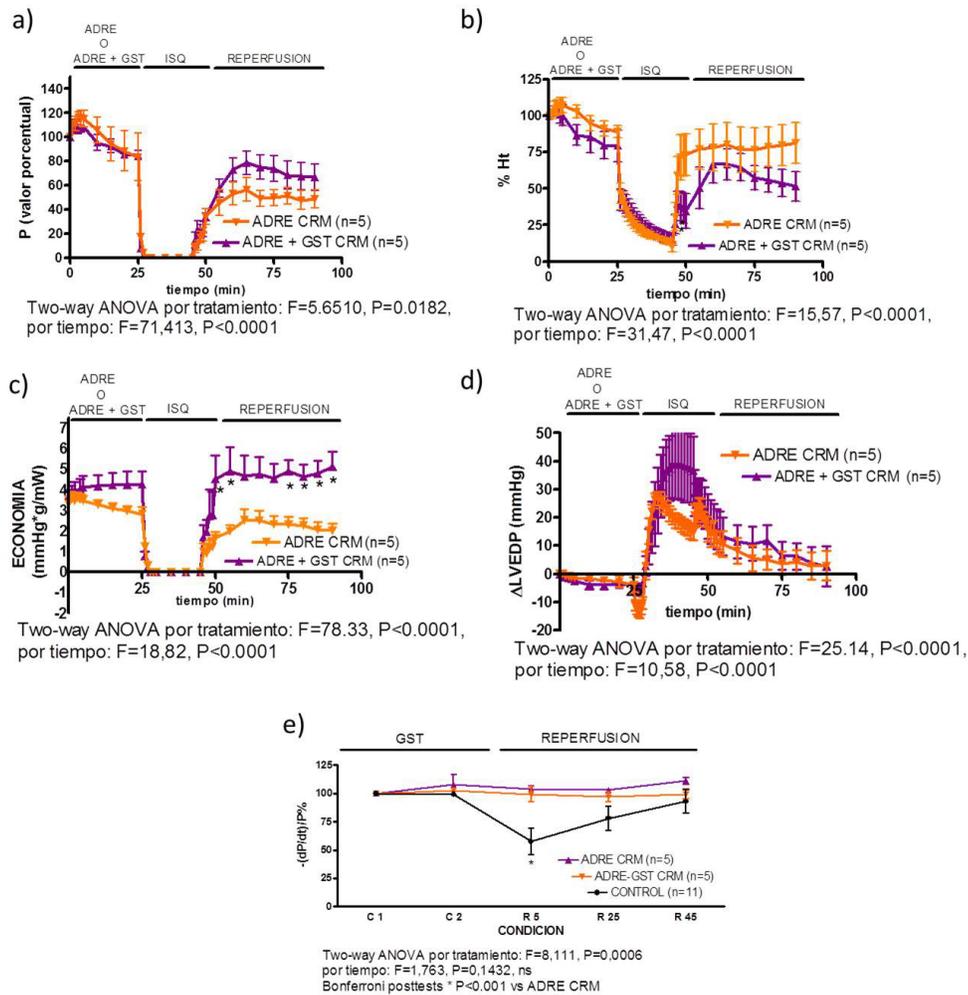


Fig. 35: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (C) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d), cambios porcentuales en la $-(dP/dt)/P$ respecto al inicio en corazones de rata macho (CRM), tratados con adrenalina $0.05 \mu\text{M}$ (ADRE) o adrenalina $0.05 \mu\text{M}$ + genisteína $20 \mu\text{M}$ (ADRE + GST) previos a la exposición a isquemia global y reperfusión (I/R) a 37°C . Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$

El agregado de ADRE a GST en CRM no modificó los tiempos de contracción ni de relajación de las contracciones isovolúmicas, ni las velocidades normalizadas de contracción y relajación (+P/P y -P/P). Al igual que en CRH, ADRE enmascaró el efecto acelerante de GST sobre la relajación de las contracciones durante R (Tabla 8).

Tabla 8: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata macho pretratados con adrenalina 0.05 μM (n=5) o adrenalina 0.05 μM + genisteína 20 μM (n=5), expuestos a 20 min de isquemia a 37°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo: C-ADRE (CRM):						
C preisquémico	8,32±1,26	0,13±0,01	14,30±0,39	-10,60±0,81	0,14±0,01	0,19±0,01
ADRE preisquemico	6,56±1,05	0,13±0,01	16,02±1,66	-11,65±1,91	0,14±0,01	0,19±0,02
R 5	2,59±0,41	0,12±0,01	14,84±0,84	-10,98±0,74	0,14±0,02	0,17±0,02
R 25	4,03±1,05	0,12±0,01	14,98±0,63	-10,93±0,94	0,13±0,02	0,18±0,01
R 45	3,86±0,98	0,12±0,01	15,28±0,87	-11,81±1,09	0,12±0,01	0,18±0,02
Grupo C-ADRE + GST (CRM):						
C preisquémico	7,17±0,26	0,12±0,01	14,37±0,45	-11,48±0,95	0,14±0,02	0,18±0,02
ADRE + GST preisq.	5,94±0,23	0,12±0,01	14,54±0,34	-11,82±1,09	0,15±0,02	0,18±0,02
R 5	2,55±0,34	0,13±0,01	14,13±0,57	-11,38±1,17	0,15±0,02	0,16±0,02
R 25	5,42±0,73	0,12±0,01	14,88±1,04	-11,00±0,57	0,14±0,01	0,20±0,005
R 45	4,82±0,85	0,12±0,01	15,13±1,04	-11,42±1,07	0,13±0,01	0,19±0,005
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,04553 P= 0,8321, NS. Por tiempo: F= 12,07 P<0.0001	Por tratamiento: F= 0,2069 P= 0,6517, NS. Por tiempo: F= 0,4219 P= 0,7919, NS	Por tratamiento: F= 0,7298 P= 0,3980, NS. Por tiempo: F= 0,4738 P= 0,7547, NS	Por tratamiento: F= 0,1079 P= 0,7442, NS. Por tiempo: F=0,2009 P= 0,9364, NS	Por tratamiento: F= 0,6136 P= 0,4380, NS Por tiempo: F= 0,6174 P= 0,6527, NS	Por tratamiento: F= 0,09202 P= 0,7632, NS. Por tiempo: F= 0,7728 P= 0,5494, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 2 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05).

La tabla 9 nos permite comparar los efectos de GST y ADRE sobre la economía muscular total al final de R, expresado como % de la economía inicial en todos los protocolos de atontamiento a 37°C. Puede verse que la recuperación de la economía del grupo control es muy alta, y que GST induce alta y similar recuperación en CRM y CRH. En cambio, ADRE redujo la economía a un 65% en ambos géneros (es significativo cuando se comparan con ANOVA de 2 vías todos los

protocolos de atontamiento a 37°C por tratamiento: F= 16.82, p<0.0001, y por tiempo: F= 81.17 p<0.0001, y se aplican los tests a posteriori de Bonferroni). La reducción de la economía por ADRE está de acuerdo con sus efectos de sobrecarga de Ca²⁺ y estimulación de la SERCA. Es importante ver que el agregado de GST a ADRE mejoró la recuperación de la economía muscular, llevándola al nivel inicial en CRH y aún mejorándola en CRM.

Tabla 9: Comparación de la economía muscular total (P/Ht) al final de la reperfusión (expresada como % del valor inicial sin tratamiento) para los varios protocolos efectuados en el modelo de atontamiento a 37°C antes de la isquemia.

Protocolo	Economía muscular al final de R (P/Ht) com % del valor inicial
Control	96,09 ± 12,22 (11)
GST en CRM	85,98 ± 13,31 (8)
GST en CRH	75,21 ± 11,00 (n=6)
ADRE en CRM	66,16 ± 15,37 (n=5)
ADRE en CRH	62,79 ± 7,88 (n=5)
ADRE+GST en CRM	135,25 ± 12,65 (n=5)*
ADRE+GST en CRH	91,70 ± 14,61 (n=6)
ANOVA	F=6,832, P<0.0001

*Se realizó el test de ANOVA de una vía para las 7 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Tukey's: * p<0.05 vs los otros protocolos.*

Los resultados obtenidos combinando ADRE + GST sugieren que en un medio con estimulación adrenérgica GST resultó cardioprotectora, lo cual fue evidenciado tanto por aumento de la RCPI, como de la economía. Esto es probablemente debido a sus efectos opuestos en los canales de Ca²⁺, con la posible reducción de una sobrecarga de Ca²⁺. Los efectos diastólicos durante I/R sugieren que ambos compuestos sumarían sus efectos en otro mecanismo movilizador de Ca²⁺ como el RS, el NXC-SL o las mitocondrias.

1.a.3 Efectos de genisteína in vivo en un modelo de atontamiento severo por I/R

a 37°C:

Para evaluar si GST es cardioprotectora *in vivo* se estudiaron sus efectos en un modelo de atontamiento severo a 37°C logrado con un período de isquemia más prolongado (30 minutos I) y 45 minutos de reperfusión. En este modelo los controles (P inicial=103,2 ± 8,0 mmHg, n=6) recuperaron hasta el 14,5 ± 2,4 % de su P inicial al finalizar la reperfusión. En este modelo de atontamiento severo se evaluó el efecto de una administración *in vivo* de GST por vía intraperitoneal (IP) de 5 mg/Kg, realizada 24 horas antes del desarrollo experimental.

1.a.3.1 Efectos de la administración intraperitoneal de genisteína 24 hs. antes de la I/R:

La administración IP de 5 mg/Kg GST mejoró significativamente la RCPI en ambos géneros. Como se observa en la fig. 36a, el grupo tratado con GST (P inicial de 92,4 ± 19,5 y 62, 6 ± 11,1 mmHg para CRH y CRM, respectivamente) recuperó la contractilidad más en CRM (hasta el 50,8 ± 4,9 %) que en CRH (34,1 ± 5,1%) y en ambos grupos más que en el control. La recuperación energética durante R no fue modificada por GST (fig. 36b). Se observa que en este modelo de atontamiento severo el grupo control recupera una economía (P/Ht) mucho menor a su propia economía inicial (19.8 ± 5% de la inicial), y GST tiende a elevarla muy poco en CRH, y la mejora sustancialmente en el grupo CRM (fig. 36c). Además, la administración *in vivo* de GST aumentó la contractura diastólica durante la isquemia en comparación con el control (ver fig. 36d), en un comportamiento similar al producido por GST cuando se la perfundía *ex vivo* (ver puntos previos).

En la Fig 36 y la tabla 10 se observa que la administración de GST *in vivo* aceleró la recuperación de la contractilidad (P, IPt y velocidades) durante los primeros minutos de reperfusión. Aún luego de transcurridos 5 minutos de reperfusión era muy baja la contractilidad de los corazones

del grupo control ($P= 3,8 \pm 2,1$ mmHg), mientras el grupo tratado con GST recuperó hasta $14,3 \pm 4,9$ y $8,0 \pm 3,5$ mmHg para CRM (n=6) y CRH (n=4) respectivamente. En el resto de R, el tratamiento no modificó significativamente los tiempos de contracción y de relajación, la velocidad normalizada de contracción (+P/P) o la IPt/P (tabla 10).

Para evaluar si este efecto cardioprotector de GST administrada in vivo 24 horas antes del experimento de I/R severa, estaba relacionado a su efecto inhibidor de las TK, se pretrataron las ratas con OVN 15 mg/Kg por vía IP 24 horas antes de la administración de GST por la misma vía. Al día siguiente se efectuó el experimento con corazones aislados. La Fig. 36a muestra que en cada género OVN no modificó los efectos de GST en la RCPI, manteniendo sus diferencias con el grupo control. La recuperación energética fue cercana al grupo control, pero menor para los CRM tratados con OVN+GST (Fig. 36b). Por ello, la economía muscular total (P/Ht) siguió principalmente el comportamiento de la P, recuperándose más en los grupos de CRM con GST+OVN y con GST (Fig. 36c). Además la economía recuperó a niveles del 50% del inicial durante los primeros 5 minutos de R en el grupo de CRM con OVN+GST. En cuanto a la contractura diastólica, en CRH el grupo con OVN+GST aumentó más la contractura al final de I y de R que el grupo de GST, mientras en CRM el tratamiento con OVN no modificó los efectos de contractura de GST que siempre son mayores que en el control (Fig. 36d). OVN no afectó los tiempos ni velocidades de contracción o relajación (Tabla 10).

Estos resultados sugieren que GST in vivo fue más cardioprotectora en machos que en hembras dentro de las ratas adultas jóvenes. Este efecto benéfico in vivo no es debido a su efecto inhibidor de tirosina-kinasas (TK).

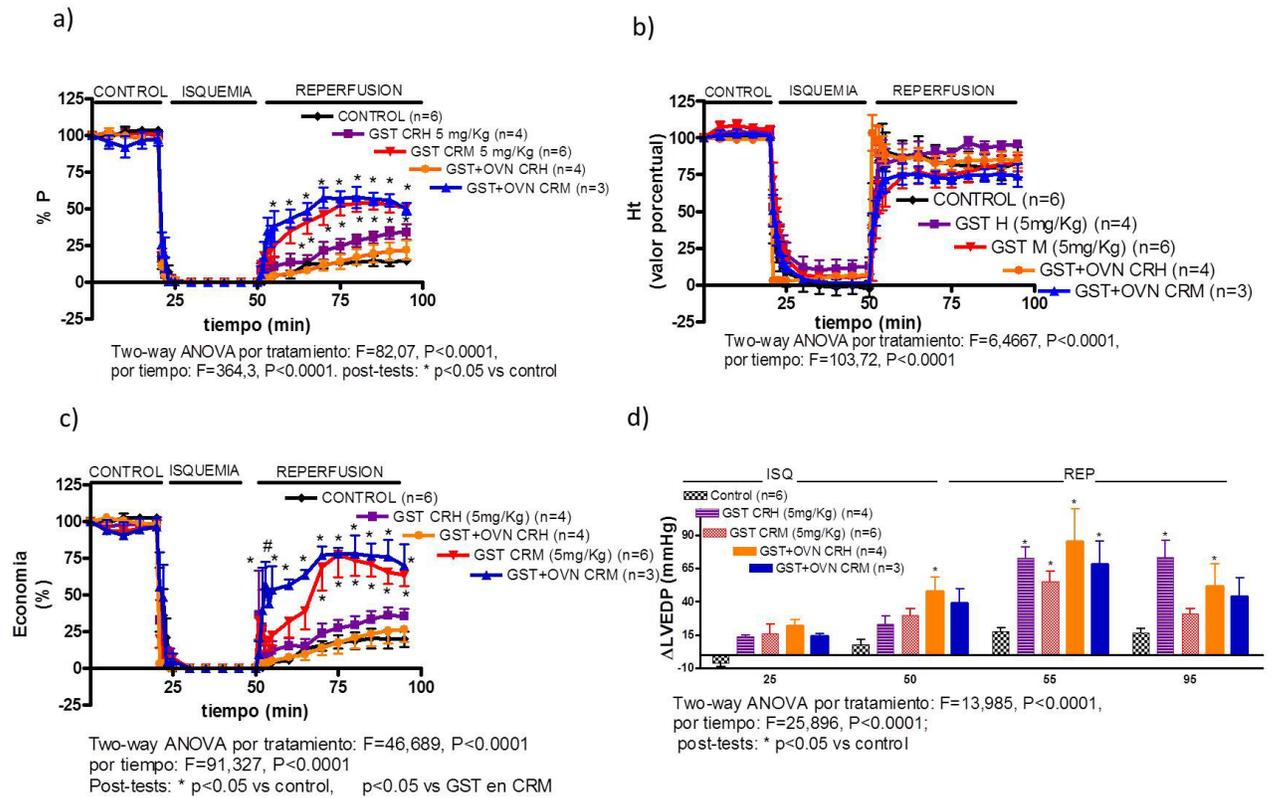


Fig. 36: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) expresada como % del valor inicial (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) a los 5 minutos y al final de la isquemia y la reperfusion, respectivamente (d) en corazones de rata, tratados con GST 5 mg/Kg IP 24 hs antes de la exposición de los corazones aislados al período de isquemia de 30 minutos a 37°C. Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$

Tabla 10: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata controles (n=6), tratados con GST 5 mg/Kg IP (CRH n=4; CRM n=6) o tratados con GST 5 mg/Kg + OVN 15 mg/Kg IP (CRH n=4; CRM n=3), expuestos a 30 min de isquemia a 37°C.

	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C:						
C preisquémico	14,67±1,12	0,15±0,01	13,22±0,86	-14,99±2,06	0,17±0,02	0,14±0,02
C- preisquemico	15,03±0,97	0,15±0,01	13,20±0,62	-14,20±2,02	0,15±0,02	0,16±0,02
R 5	0,03±0,03	0,09±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
R 25	1,85±0,73	0,13±0,03	14,39±1,57	-15,89±1,73	0,15±0,01	0,15±0,01
R 45	2,36±0,98	0,14±0,04	14,28±2,29	-15,07±2,24	0,15±0,02	0,15±0,01
GrupoC-GST 5 mg/Kg (CRH):						
C preisquémico	10,68±2,07*	0,12±0,01	15,22±1,08	-13,14±1,70	0,17±0,03	0,16±0,03
C- preisquemico	10,63±2,07*	0,12±0,01	15,48±1,16	-13,17±1,71	0,17±0,03	0,16±0,03
R 5	0,64±0,21	0,10±0,02	15,68±2,19*	-12,18±1,78*	0,15±0,03*	0,13±0,02*
R 25	2,51±0,94	0,11±0,01	15,20±1,43	-14,52±1,16	0,16±0,03	0,14±0,02
R 45	3,08±0,8	0,11±0,02	14,00±1,53	-11,25±0,99	0,17±0,02	0,17±0,02
GrupoC-GST 5 mg/Kg (CRM):						
C preisquémico	7,47±0,99*	0,12±0,01	14,14±0,42	-11,13±0,97	0,16±0,01	0,18±0,01
C- preisquemico	7,51±1,0*	0,12±0,01	14,22±0,34	-11,16±1,02	0,15±0,01	0,18±0,01
R 5	1,67±0,51	0,12±0,01	14,40±0,24*	-12,88±0,83*	0,17±0,02*	0,15±0,01*
R 25	3,53±0,31	0,12±0,01	14,25±0,31	-12,16±1,05	0,16±0,02	0,16±0,01
R 45	3,56±0,46	0,12±0,01	14,74±0,28	-12,08±0,97	0,18±0,02	0,16±0,02
GrupoC-GST 5 mg/Kg +OVN 15 mg/Kg (CRH):						
C preisquémico	12,65±2,57	0,11±0,01	14,37±0,44	-12,27±0,69	0,18±0,01	0,15±0,01
C- preisquemico	12,21±2,55	0,11±0,01	14,50±0,43	-10,69±1,69	0,18±0,01	0,15±0,01
R 5	0,52±0,12	0,12±0,02	16,83±2,1*	-12,85±0,27*	0,14±0,02*	0,14±0,01*
R 25	2,17±0,98	0,11±0,01	17,24±3,89	-14,56±0,78	0,17±0,04	0,12±0,01
R 45	3,31±1,18	0,11±0,01	13,73±0,32	-13,74±0,22	0,17±0,03	0,13±0,01
GrupoC-GST 5 mg/Kg +OVN 15 mg/Kg (CRM):						
C preisquémico	5,91±4,43*	0,10±0,01	16,06±0,30	-15,17±1,07	0,16±0,03	0,12±0,02
C- preisquemico	5,82±4,48*	0,10±0,01	14,82±0,46	-14,86±1,55	0,15±0,04	0,13±0,01
R 5	1,43±0,71	0,13±0,02	13,95±1,71*	-16,28±1,19*	0,23±0,01*	0,11±0,00*
R 25	3,02±2,27	0,09±0,01	19,57±3,49	-16,51±0,53	0,13±0,04	0,11±0,01
R 45	2,80±2,13	0,10±0,01	17,92±1,55	-17,02±1,88	0,14±0,04	0,11±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 3,405 P= 0,0122 Por tiempo: F= 49,73 P<0.0001	Por tratamiento: F= 1,912 P= 0,1155, NS Por tiempo: F= 0,2557 P= 0,9055, NS	Por tratamiento: F= 10,49 P<0.0001 Por tiempo: F= 5,431 P<0.0001	Por tratamiento: F= 6,524 P= 0,0001 Por tiempo: F= 5,879 P=0,0003	Por tratamiento: F= 3,230 P= 0,0165 Por tiempo: F= 1,234 P= 0,3031	Por tratamiento: F= 9,670 P<0.0001 Por tiempo: F= 6,283 P=0,0002

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 5 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (* $p < 0.05$ vs control).

1.a.3.2 Efectos de la administración in vivo de genisteína sobre el contenido de Ca^{2+} sarcorretilicular :

Para evaluar si la administración de 5 mg/Kg via IP de GST en CRM modifica la liberación de Ca^{2+} desde el RS, se realizaron experimentos en CRM los cuales luego del período de 30 minutos de isquemia, se reperfundieron los corazones con Sc. Krebs conteniendo 10 mM de cafeína (para liberar el Ca^{2+} desde el RS) y 36 mM de Na^+ (para evitar la salida de Ca^{2+} por el NXC-SL). De esta manera la contractura que se genera es proporcional a la cantidad de Ca^{2+} liberada del RS y que activa a los miofilamentos.

En la fig. 37, se observa que GST no modificó significativamente la contractura inducida por cafeína (ΔLVP) durante R ni la manifestación calorimétrica asociada a dicha contractura (Ht). En acuerdo a esto, GST no modificó significativamente las respectivas áreas bajo la curva de contractura ($ABC-\Delta LVP$) y gasto energético ($ABC-\Delta Ht$) durante la R entre ambos grupos.

Los resultados sugieren que la administración aguda de GST 5 mg/Kg IP en el modelo de atontamiento severo por I/R no alteró la liberación y carga de Ca^{2+} del RS durante la reperfusión.

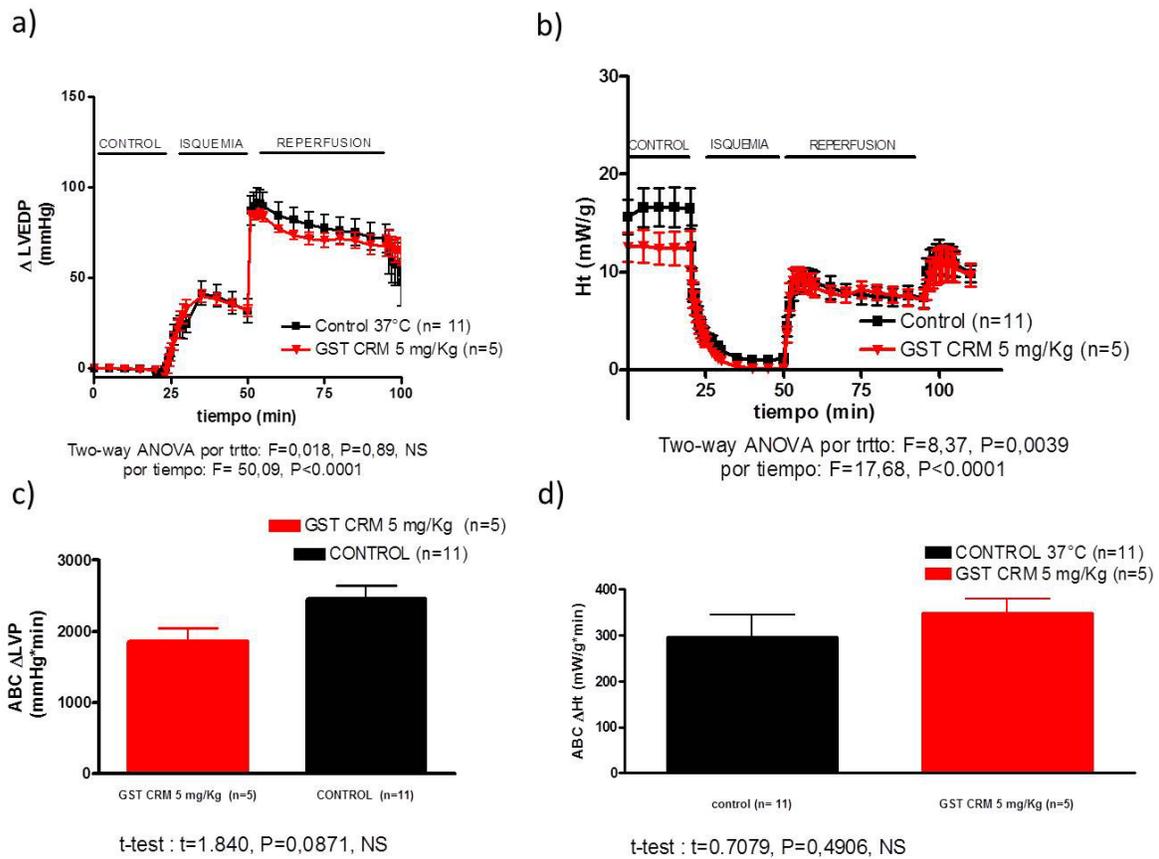


Fig. 37: Efectos de GST administrada por vía IP en CRM reperfundidos con solución Krebs conteniendo 10 mM de cafeína-36 mM de Na^+ , a) cambios en LVP medido sobre la condición preisquémica (en mmHg), b) flujo de calor total (Ht en mW/g), c) Área debajo de la curva de contractura en R (ABC- ΔLVP) y d) área bajo la curva de Ht (ABC- ΔHt). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$ y el t-test entre las áreas bajo las curvas.

1.b Corazones de cobayo:

1.b.1 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo-reperfusión

a 30°C:

El pretratamiento con 20 μ M de GST generó leve inotropismo negativo antes de la isquemia en corazones de cobayo macho (CCM) pero no lo modificó en corazones de cobayo hembra (CCH) (Fig. 38a). Similar relación se obtuvo en la recuperación contráctil post-isquémica (RCPI) ya que GST la redujo en los CCM (hasta el $30,2 \pm 6,5\%$ de la P inicial) en comparación con los corazones no tratados (control) que recuperaron hasta el $62,2 \pm 6,8 \%$, pero no la modificó en los CCH (recuperaron hasta el $60,2 \pm 11,8\%$ de la P inicial) (Fig. 38a). En CCM también se redujo el gasto energético durante la reperfusión respecto al grupo control, mientras que en CCH fue similar al control (Fig. 38b). Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas en la economía muscular (P/Ht) por la administración de GST en CCM ni en CCH respecto al control durante R (Fig. 38c). En forma opuesta a la diferencia de género encontrada en la RCPI, la contractura diastólica durante R fue reducida por GST más en CCH que en CCM (Fig. 38d). GST tendió a aumentar la velocidad normalizada de relajación ($-P/P$) y a reducir la relación IPt/P (Tabla 11).

En resumen, el comportamiento de los corazones de cobayo frente a GST en el modelo de atontamiento a 30°C tiene similar dependencia del género que los corazones de rata, excepto en la economía, que en cobayos no se altera respecto del control, mientras en rata se reduce en machos al igual que la RCPI. También en cobayos es menos notoria la contractura diastólica.

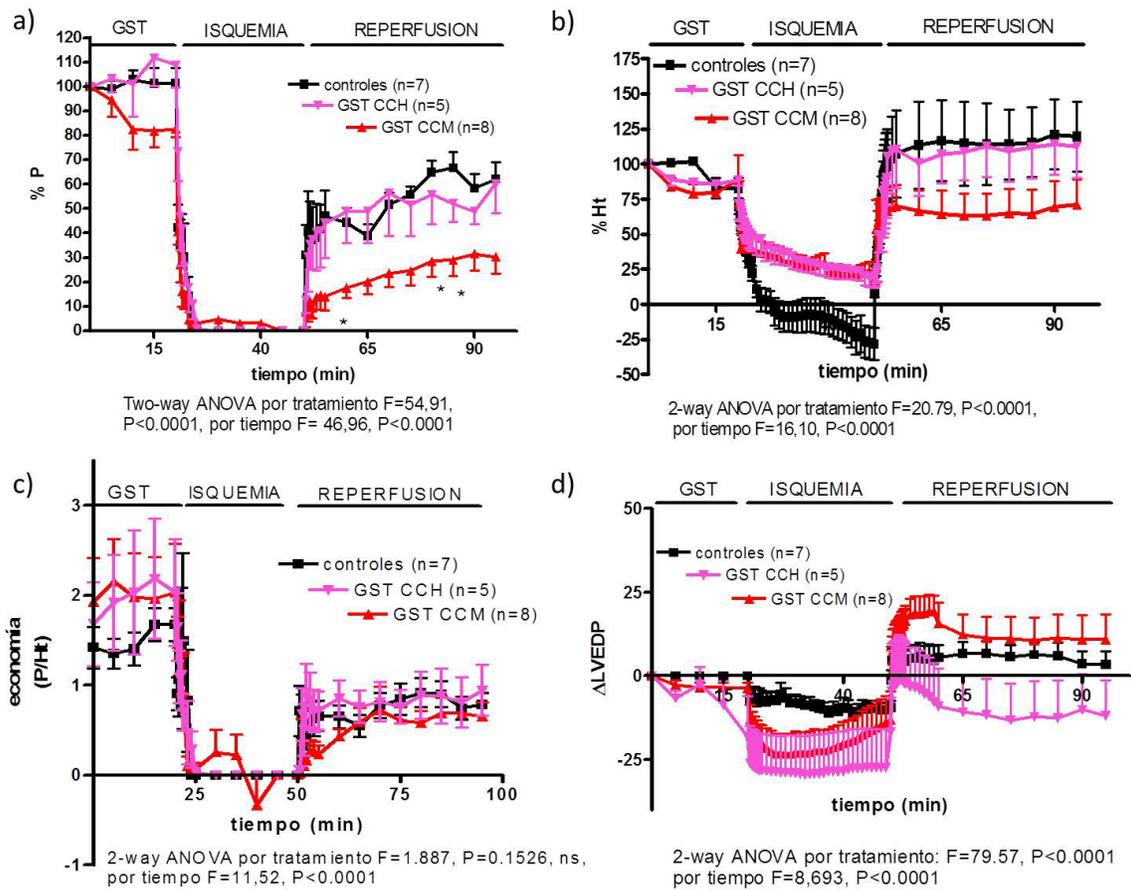


Fig. 38: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de cobayo perfundidos con GST 20 μ M y expuestos a isquemia global y reperfusión (I/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$

Tabla 11: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de cobayo controles (n=6) y pretratados con GST (CCH n=4; CCM n=4), expuestos a 30 minutos de I a 30°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C:						
C preisquémico	6,64±1,35	0,25±0,02	9,60±1,49	-5,83±0,79	0,23±0,035	0,34±0,05
R 5	3,60±1,07	0,22±0,03	13,84±1,12	-7,08±1,78	0,13±0,02	0,23±0,05
R 45	3,43±0,40	0,23±0,01	11,80±1,21	-7,57±0,85	0,15±0,02	0,23±0,01
Grupo C-GST (CCH):						
C preisquémico	6,74±2,04	0,18±0,03	10,01±1,17	-6,58±0,42	0,175±0,02	0,265±0,02
C-GST-preisquem.	7,83±2,77	0,22±0,01	10,91±1,32	-6,30±0,13	0,15±0,02	0,275±0,01
R 5	1,71±0,74	0,18±0,02	12,36±1,05	-7,44±1,25	0,145±0,02	0,22±0,03
R 45	2,22±0,79	0,18±0,01	12,29±1,49	-7,10±0,32	0,13±0,015	0,24±0,01
Grupo C-GST (CCM):						
C preisquémico	6,81±1,82	0,18±0,01	10,45±0,29	-8,34±0,45	0,17±0,01	0,20±0,015
C-GST-preisquem.	5,13±1,34	0,19±0,02	11,35±0,44	-8,95±0,31	0,18±0,02	0,215±0,04
R 5	0,66±0,31	0,17±0,02	15,72±2,56	-10,36±1,27	0,15±0,04	0,21±0,03
R 45	1,62±0,62	0,17±0,03	16,38±1,90	-9,41±0,82	0,14±0,03	0,24±0,04
ANOVA	Por tratamiento: F= 1,185 P= 0,3159, NS Por tiempo: F= 9,604 P<0.0001	Por tratamiento: F= 9,118 P= 0,0005 Por tiempo: F= 1,238 P= 0,3082, NS	Por tratamiento: F= 2,979 P=0,0622, NS. Por tiempo: F= 5,839 P= 0,0021	Por tratamiento: F= 9,714 P < 0,05 Por tiempo: F= 1,721 P= 0,1784, NS	Por tratamiento: F= 2,017 P= 0,1464, NS. Por tiempo: F= 3,006 P= 0,0415	Por tratamiento: F= 3,187 P= 0,0519, NS. Por tiempo: F= 1,312 P= 0,2840, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

1.b.2 Efectos de genisteína en un modelo de atontamiento con pre-condicionamiento

isquémico:

Para evaluar si el fitoestrógeno GST induce un efecto similar al estradiol (Babiker y col., 2012) en el preconditionamiento isquémico (PC), se usó un modelo consistente en un episodio de PC (3 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión antes de la isquemia global).

El PC mejoró la RCPI respecto al grupo control durante los primeros 5 minutos de reperfusión (Ver grupo control en fig. 38 y grupo PC en fig. 39) (ANOVA de 2 vías para P%: por tratamiento:

F= 16.08, $p < 0.0001$, por tiempo: F= 31.60, $p < 0.0001$). También mejoró la economía muscular (P/Ht) desde 0.6 ± 0.3 a 2.3 ± 0.7 mmHg.g/mW a los 5 minutos de reperfusión (two-way ANOVA: por tratamiento: F= 21.88, $p < 0.0001$, por tiempo: F= 4.416, $p < 0.0001$).

Efectos de genisteína en corazones de cobayo macho precondicionados:

Cuando se perfundió 20 μ M de GST antes del PC en los CCM se mantuvo el aumento en la RCPI propio del PC. Este efecto combinado de GST+PC fue reducido cuando se bloquearon los mKATP con 5-HD 100 μ M (Fig. 39a). El gasto energético fue aumentado por GST durante la isquemia en comparación con el grupo de PC (Fig. 39b), al igual que en los experimentos sin PC (Fig. 38b). En este grupo con PC, tampoco se modificó la economía muscular P/Ht en la R (Fig. 39c), ni el comportamiento de la presión diastólica durante la I/R entre los 3 grupos (Fig 39d).

GST redujo las velocidades normalizadas de relajación ($-P/P$) en los corazones sometidos a PC, y prolongó los tiempos de relajación de las contracciones (Tabla 12).

Efectos de genisteína en corazones de cobayo hembra precondicionados:

En CCH, hubo un inotropismo positivo debido a GST y PC antes de la isquemia, que fue reducido por 5HD, pero en la reperfusión GST y 5-HD no modificaron significativamente la RCPI (Fig. 40a). El gasto energético siguió un comportamiento similar al de RCPI (Fig. 40b). Pero comparando la P/Ht, GST+PC mejoró la economía muscular antes de la isquemia, sin cambios significativos durante R (Fig 40c). Además, GST incrementó la contractura diastólica al inicio de R (Fig 40d).

GST y el PC no modificaron los tiempos de contracción o relajación de las contracciones, la relación IPt/P ni las velocidades normalizadas de contracción y relajación ($+P/P$ y $-P/P$). (Tabla 13).

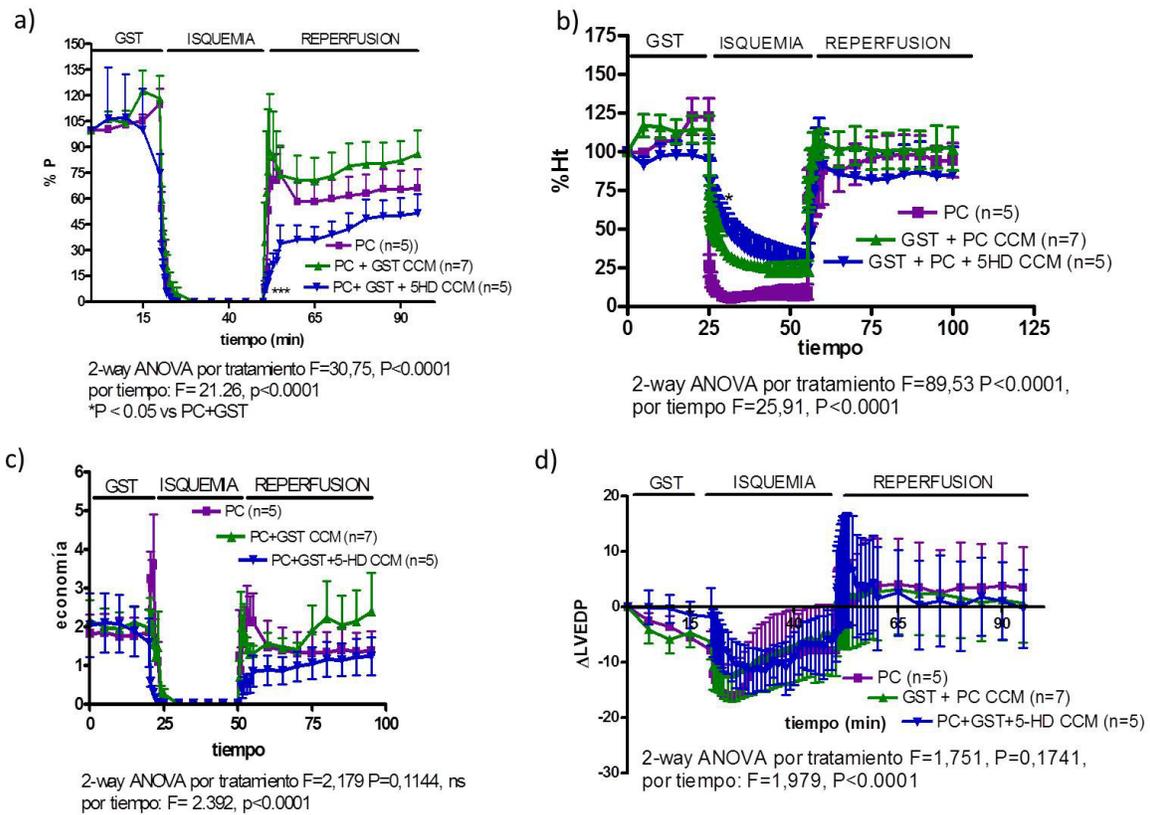
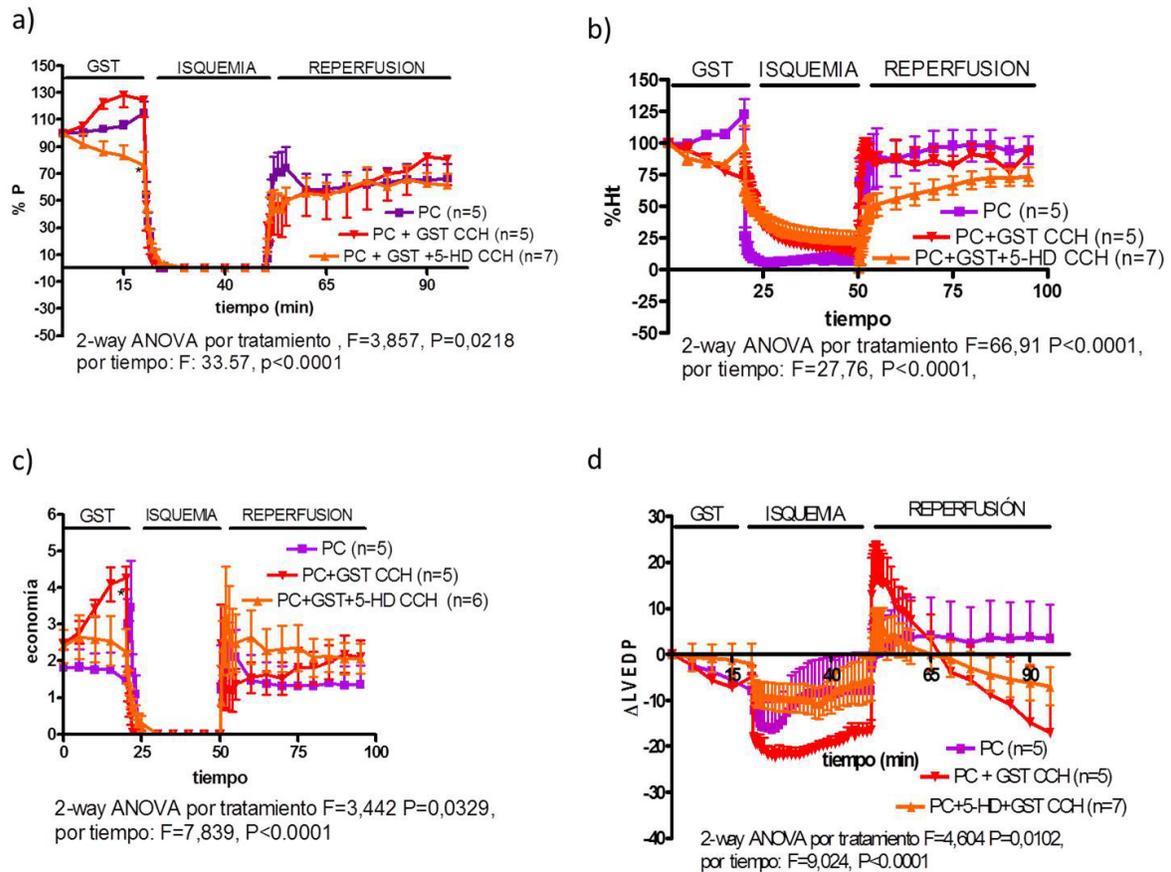


Fig. 39: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) **(a)** flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) **(b)**, economía muscular (P/Ht) **(c)** contractura diastólica (Δ LVEDP) **(d)** en corazones de cobayo macho precondicionados, perfundidos con GST 20 μ M o GST 20 μ M + 5-HD 100 μ M antes de ser expuestos a isquemia global y reperusión (I/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p < 0.05$ vs GST + PC.

Tabla 12: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de cobayo macho sometidos a preconditionamiento (n=5) y pretratados con GST 20 μ M (n=7) o con GST 20 μ M + 5-HD 100 mM (n=5) expuestos a 30 minutos de I a 30°C.

	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C-PC (CCM):						
C preisquémico	4,74±1,26	0,15±0,01	14,51±1,03	-9,60±0,70	0,13±0,01	0,17±0,01
C-PC-preisquemico	6,34±2,07	0,17±0,02	12,55±1,59	-9,07±0,96	0,14±0,03	0,19±0,02
R 5	3,65±1,49	0,16±0,02	13,22±1,88	-8,65±1,14	0,13±0,02	0,19±0,02
R 45	3,09±0,94	0,15±0,01	13,31±1,25	-9,21±0,49	0,13±0,01	0,18±0,01
Grupo PC-GST (CCM):						
C preisquémico	4,26±2,38	0,19±0,01	11,85±1,26	-7,22±0,57	0,15±0,01	0,25±0,02
PC-GST-preisq.	4,08±2,10	0,18±0,02	12,92±1,47	-7,70±0,61	0,15±0,02	0,25±0,02
R 5	1,64±0,42	0,18±0,02	12,95±1,33	-7,78±0,71	0,14±0,02	0,23±0,03
R 45	2,41±0,77	0,19±0,02	13,08±1,28	-8,17±0,73	0,14±0,02	0,25±0,02
Grupo PC-GST + 5-HD (CCM):						
C preisquémico	5,66±2,02	0,19±0,02	12,49±2,23	-9,57±0,67	0,16±0,02	0,21±0,02
PC-GST-5-HD preisq.	4,49±1,67	0,20±0,03	11,93±1,96	-7,93±1,05	0,15±0,02	0,24±0,03
R 5	2,22±1,09	0,19±0,04	14,00±2,06	-8,45±0,95	0,12±0,02	0,23±0,04
R 45	3,67±1,74	0,20±0,01	14,13±2,53	-7,26±0,87	0,14±0,02	0,26±0,02
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,7593 P= 0,4727, NS Por tiempo: F= 1,725 P= 0,1723, NS	Por tratamiento: F= 2,861 P= 0,0656, NS Por tiempo: F= 0,1006 P= 0,9594, NS	Por tratamiento: F= 0,1932 P= 0,8249, NS Por tiempo: F= 0,2409 P= 0,8675, NS	Por tratamiento: F= 3,323 P < 0.05 Por tiempo: F= 0,3624 P= 0,7804, NS	Por tratamiento: F= 0,5047 P = 0,6064, NS. Por tiempo: F= 0,4723 P= 0,7028, NS	Por tratamiento: F= 7,041 P < 0.05 Por tiempo: F= 0,5187 P= 0,6712, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs PC).



*Fig. 40: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura de reposo o diastólica (LVEDP) (d) en corazones de cobayo hembra preconditionados y perfundidos con GST 20 μ M o GST 20 μ M + 5-HD 100 μ M antes de ser expuestos a isquemia global y reperfusion (I/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$ vs GST + PC.*

Tabla 13: Parámetros contráctiles previos a la isquemia y luego de 5 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de cobayo hembra sometidos a preconditionamiento (n=5) y pretratados con GST 20 μ M (n=4) o con GST 20 μ M + 5-HD 100 mM (n=7), expuestos a 30 minutos de I a 30°C.

	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo C-PC (CCH):						
C preisquémico	4,74±1,26	0,15±0,01	14,51±1,03	-9,60±0,70	0,13±0,01	0,17±0,01
C-PC-preisquemico	6,34±2,07	0,17±0,02	12,55±1,59	-9,07±0,96	0,14±0,03	0,19±0,02
R 5	3,65±1,49	0,16±0,02	13,22±1,88	-8,65±1,14	0,13±0,02	0,19±0,02
R 45	3,09±0,94	0,15±0,01	13,31±1,25	-9,21±0,49	0,13±0,01	0,18±0,01
Grupo PC-GST (CCH):						
C preisquémico	7,66±0,32	0,17±0,01	11,13±0,23	-10,03±0,82	0,15±0,005	0,20±0,01
PC-GST-preisquemico	7,93±0,77	0,16±0,01	11,20±0,26	-9,35±0,68	0,14±0,01	0,21±0,01
R 5	1,99±0,60	0,13±0,01	13,33±0,91	-11,73±0,49	0,11±0,01	0,18±0,02
R 45	5,40±1,62	0,15±0,02	14,21±0,53	-8,97±1,37	0,09±0,03	0,19±0,02
Grupo PC-GST + 5-HD (CCH):						
C preisquémico	7,37±2,36	0,19±0,02	11,73±1,59	-8,16±0,94	0,17±0,02	0,23±0,02
PC-GST-5-HD preisquémico	6,05±1,72	0,18±0,02	12,21±1,67	-8,04±1,33	0,18±0,04	0,22±0,02
R 5	2,90±0,96	0,16±0,02	13,73±1,53	-9,98±1,57	0,15±0,02	0,20±0,02
R 45	3,79±1,24	0,17±0,02	12,88±1,60	-9,35±1,46	0,16±0,02	0,21±0,02
ANOVA	Por tratamiento: F= 0,5403 P= 0,5859, NS Por tiempo: F= 4,236 P= 0,0095	Por tratamiento: F= 1,285 P= 0,2871, NS Por tiempo: F= 0,7411 P= 0,5334, NS	Por tratamiento: F= 0,3875 P= 0,6807, NS. Por tiempo: F= 0,6536 P= 0,5844, NS	Por tratamiento: F= 0,8334 P=0,4404, NS. Por tiempo: F= 0,5962 P= 0,6204, NS	Por tratamiento: F= 3,724 P <0.05 Por tiempo: F= 0,9048 P= 0,4452, NS	Por tratamiento: F= 2,980 P = 0,0595, NS. Por tiempo: F= 0,3811 P= 0,7671, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs PC).

2. MODELO DE ATONTAMIENTO POR HIPOPERFUSIÓN-REPERFUSIÓN:

2.a. Participación de transportadores mitocondriales en un modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión en corazones aislados de rata:

En los corazones controles, durante la HIP a 37°C se redujeron la contractilidad y el flujo de calor (Ht) que representa el gasto energético del miocardio, acorde a la reducción del flujo y del consecuentemente bajo aporte de O₂ así como del reducido estiramiento de la fibra. En la R se generó contractura diastólica y se redujo la recuperación contráctil post-isquémica (RCPI) en comparación con los valores preisquémicos (Fig. 41).

Antes de evaluar los efectos de GST en el modelo de HIP/R, se caracterizó el rol de los transportadores de Ca²⁺ mitocondriales en la RCPI y la economía de los corazones de rata.

2.a.1 Rol del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (NXCm):

Para evaluar el rol del NXCm en la disfunción por HIP/R, se pretrataron los corazones con 10 µM clonazepam (CLZ), que es un inhibidor selectivo del NXCm (Cox y Matlib, 1993a; Griffiths y col., 1998) ya que en trabajos previos ha permitido caracterizar su rol en la regulación de la RCPI en la I/R (Consolini y col. 2007). Los corazones de rata de ambos sexos fueron expuestos a los períodos de 45 minutos de hipoperfusión generada mediante reducción del flujo a 1,2 ml/min (HIP) seguido de 45 minutos de reperfusión (R) con solución Krebs-C a 37°C.

El grupo control desarrolló inicialmente una P de 72,6 ± 11,8 mmHg, la cual se redujo durante la HIP hasta el 11,4 ± 5,9 % y se recuperó durante la R, hasta un 34,6 ± 7,7 % (Fig. 41a). El pretratamiento con CLZ no modificó significativamente la P antes de la HIP (96.7 ± 18.2 mmHg), pero se mantuvo en valores más altos durante la HIP y se recuperó más que el control durante la R

(Fig 41a). Al evaluar el gasto energético el grupo control inicialmente desarrolló un Ht de $15,0 \pm 2,2$ mW/g que se redujo durante la HIP hasta alcanzar $1,6 \pm 0,5$ mW/g ($10,2 \pm 2,6$ %) y se recuperó durante la R hasta $11,3 \pm 1,7$ mW/g ($79,5 \pm 6,6$ %). En el grupo tratado con CLZ, el Ht de $18,0 \pm 3,4$ mW/g se redujo algo menos que el control durante la HIP y se recuperó más durante la R (Fig. 41b). Llamativamente, la economía (P/Ht) se incrementó sólo durante la HIP en presencia de CLZ respecto del control (Fig 41c). En el tono diastólico, CLZ redujo la contractura diastólica del control durante la HIP, y después de la contractura del inicio de R aceleró la caída del Δ LVEDP durante R, hasta alcanzar la presión diastólica inicial (Fig. 41d).

El tratamiento con CLZ aumentó la relación IPt/P durante la reperfusión, pero no se observaron diferencias significativas en los tiempos de contracción y relajación entre los grupos control y CLZ. Tampoco hubo diferencias significativas en las velocidades máximas relativas de contracción $(+dP/dt)/P$ pero CLZ redujo la relajación $(-dP/dt)/P$. (TABLA 14).

Los resultados sugirieron que en la HIP/R el NXCm jugaría un rol colaborador para la disfunción o atontamiento, contribuyendo a la contractura diastólica.

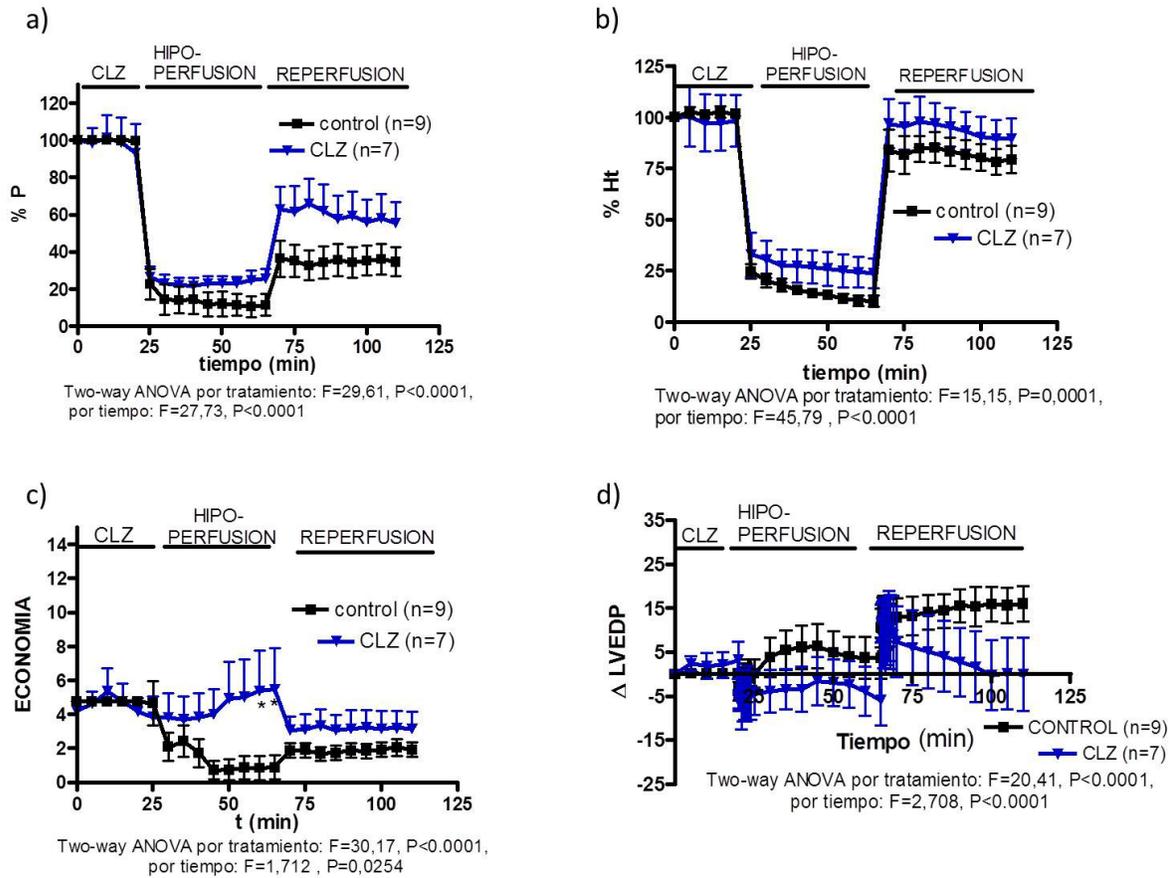


Fig. 41: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de rata, tratados con clonazepam (CLZ) $10 \mu\text{M}$ antes y durante la hipoperfusión, y luego reperfundidos con Krebs-C (HIP/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0,05$ vs CONTROL.

Tabla 14: Parámetros contráctiles previos a la hipoperfusión y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata controles (n=8) o pretratados con clonazepam 10 μ M (n=7), expuestos a 45 minutos de HIP a 37°C.

Grupo	IPt	IPt/P	+P/P	-P/P	t_{c1} + t_{c2}	t_{R1} + t_{R2}
Grupo CONTROL:						
C preisquémico	7,51±1,46	0,09±0,01	18,65±1,42	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
C preisquemico	7,46±1,46	0,09±0,01	18,62±1,43	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
R 5	2,45±0,77	0,09±0,01	16,97±1,19	-17,31±1,75	0,09±0,01	0,11±0,01
R 25	2,43±0,73	0,09±0,01	16,15±1,00	-17,96±2,15	0,09±0,01	0,11±0,01
R 45	2,31±0,62	0,09±0,01	16,16±1,23	-16,84±1,61	0,09±0,01	0,11±0,01
Grupo C-CLZ:						
C preisquémico	9,96±2,19	0,10±0,01	16,32±0,53	-13,16±0,76	0,09±0,005	0,13±0,01
C-CLZ preisquém.	8,30±2,36	0,10±0,01	17,29±0,72	-12,91±0,63	0,09±0,01	0,14±0,01
R 5	5,40±1,42	0,10±0,01	16,01±0,86	-14,05±0,61	0,09±0,005	0,12±0,01
R 25	4,61±1,29	0,09±0,01	17,76±0,33	-15,46±0,63	0,09±0,005	0,11±0,01
R 45	4,65±1,38	0,09±0,01	17,75±0,46	-15,48±0,64	0,09±0,005	0,10±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 5,842 P= 0,0185 Por tiempo: F= 6,723 P= 0,0001	Por tratamiento: F= 5,291 P= 0,0247 Por tiempo: F= 0,4098 P= 0,8010, NS	Por tratamiento: F= 0,1800 P= 0,6728, NS. Por tiempo: F= 0,5587 P= 0,6934, NS	Por tratamiento: F= 10,68 P < 0,05 Por tiempo: F= 1,054 P= 0,3865, NS	Por tratamiento: F= 1,774 P=0,1876, NS. Por tiempo: F= 0,1599 P= 0,9578, NS	Por tratamiento: F= 1,455 P = 0,2321, NS. Por tiempo: F= 1,375 P= 0,2522, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 2 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

2.a.2 Rol del canal mKATP:

Para evaluar la participación de los canales mKATP se pretrataron los corazones con 5-hidrodecanoato (5-HD) 100 μ M para inhibir selectivamente al canal mKATP (Iwai y col., 2000). Se expusieron luego al modelo de HIP/R aplicando la droga durante los 45 min de hipoperfusión a 1,2 ml/min y luego se hizo por 45 min la reperfusión con Krebs-C. El pretratamiento con 5-HD no modificó la disfunción contráctil generada por la hipoperfusión,(Fig 42a). No generó cambios significativos en el gasto energético (Fig. 42b), pero mejoró la economía muscular sólo durante la HIP (Fig. 42c). La hipoperfusión con 5-HD 100 μ M tampoco alteró los cambios en la presión diastólica propios del ciclo HIP/R (Fig. 42d). No modificó los valores de IPt/P, los tiempos de contracción y relajación al final de la reperfusión. No modificó las velocidades normalizadas de contracción y relajación (+P/P y -P/P) (Tabla 15).

Los resultados sugieren que los mKATP ejercerían muy escaso rol cardioprotector en la HIP/R. El hecho de que 5HD mejora la economía durante la HIP sugiere que altera la homeostasis de Ca^{2+} mitocondrial y el metabolismo.

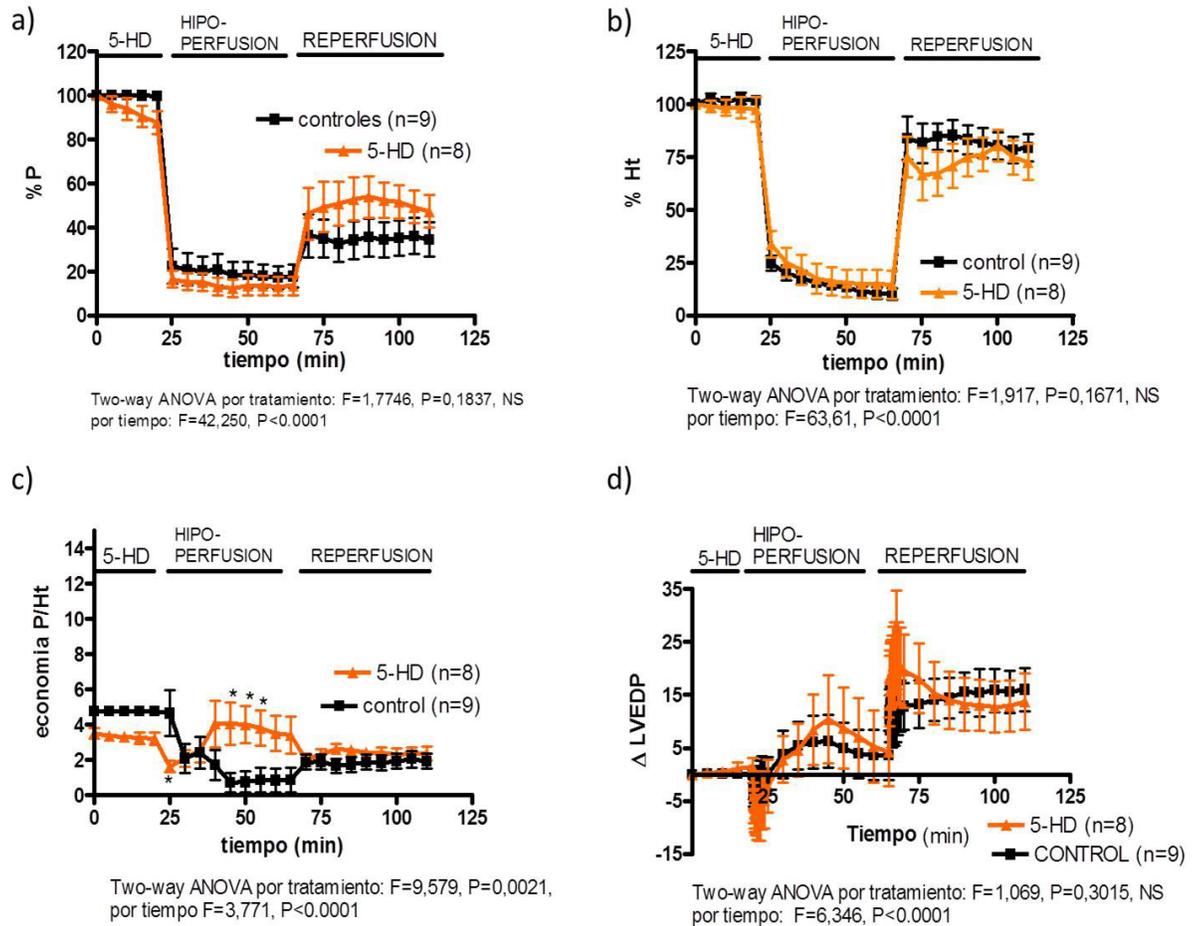


Fig. 42: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de rata, tratados con 5-hidroxidecanoato (5-HD) 100 μ M antes y durante la hipoperfusión, seguidos de reperfusión con Krebs-C (HIP/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * p <0.05 vs CONTROL.

Tabla 15: Parámetros contráctiles previos a la hipoperfusión y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de rata controles (n=8) o pretratados con 5-HD 100 μ M (n=8), expuestos a 45 minutos de HIP a 37°C.

Grupo CONTROL:	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
C preisquémico	7,51±1,46	0,09±0,01	18,65±1,42	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
C preisquemico	7,46±1,46	0,09±0,01	18,62±1,43	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
R 5	2,45±0,77	0,09±0,01	16,97±1,19	-17,31±1,75	0,09±0,01	0,11±0,01
R 25	2,43±0,73	0,09±0,01	16,15±1,00	-17,96±2,15	0,09±0,01	0,11±0,01
R 45	2,31±0,62	0,09±0,01	16,16±1,23	-16,84±1,61	0,09±0,01	0,11±0,01
Grupo C-5-HD:						
C preisquémico	6,03±0,81	0,11±0,01	15,90±1,18	-12,40±1,09	0,13±0,01	0,17±0,02
C-5-HD preisquémico	5,48±0,88	0,11±0,01	16,11±1,03	-11,84±1,23	0,12±0,01	0,19±0,03*
R 5	2,84±0,92	0,11±0,01	15,31±0,87	-12,85±1,02	0,14±0,03	0,18±0,02*
R 25	3,19±0,80	0,10±0,01	16,73±1,31	-13,43±1,28	0,12±0,01	0,16±0,02
R 45	2,81±0,69	0,10±0,01	16,47±1,20	-14,10±1,30	0,18±0,03*	0,15±0,02
ANOVA	Por tratamiento: F=0,3518 P= 0,5550, NS Por tiempo: F= 10,20 P<0.0001	Por tratamiento: F= 17,06 P= 0,0001 Por tiempo: F= 0,1442 P= 0,9649, NS.	Por tratamiento: F= 2,517 P= 0,1172, NS. Por tiempo: F= 0,4514 P= 0,7710, NS	Por tratamiento: F= 20,06 P < 0.05 Por tiempo: F= 0,5577 P= 0,6941, NS	Por tratamiento: F= 27,71 P<0.0001 Por tiempo: F= 1,505 P= 0,2101, NS	Por tratamiento: F= 25,97 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,3007 P= 0,8765, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 2 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

2.a.3 Rol del uniporter de Ca²⁺ mitocondrial (UCam):

Con el fin de evaluar si la reducción de la contractura diastólica generada en este modelo de atontamiento por hipoperfusión/reperfusión en corazones de rata depende de la captación de Ca²⁺ mitocondrial, se bloqueó el uniporter de Ca²⁺ mitocondrial (UCam). El bloqueante selectivo utilizado fue el “complejo dinuclear amino de rutenio con puente de oxígeno” o Ru-360 1 μ M (García Rivas y col., 2005). En los corazones tratados con Ru-360, la inhibición del UCam no generó cambios en la disfunción mecánico-energética inducida por HIP/R, logrando recuperar hasta el 34,6 ± 7,7% y el 42,0 ± 5,1% de la P inicial al final de la reperfusión para el grupo control y Ru360 respectivamente (Fig 43a). El gasto energético no fue modificado por el tratamiento con Ru360 (Fig 43b), y tampoco la economía P/Ht durante la R, aunque ésta mejoró durante la HIP en

presencia de Ru-360 (Fig. 43c). Ru-360 tampoco modificó los cambios diastólicos con contractura propios de la HIP/R (Fig. 43d).

Estos resultados sugieren que en la HIP/R la captación de Ca^{2+} por el UCam mitocondrial jugaría un menor rol en la captación de una sobrecarga de calcio citosólico, en comparación con la I/R.

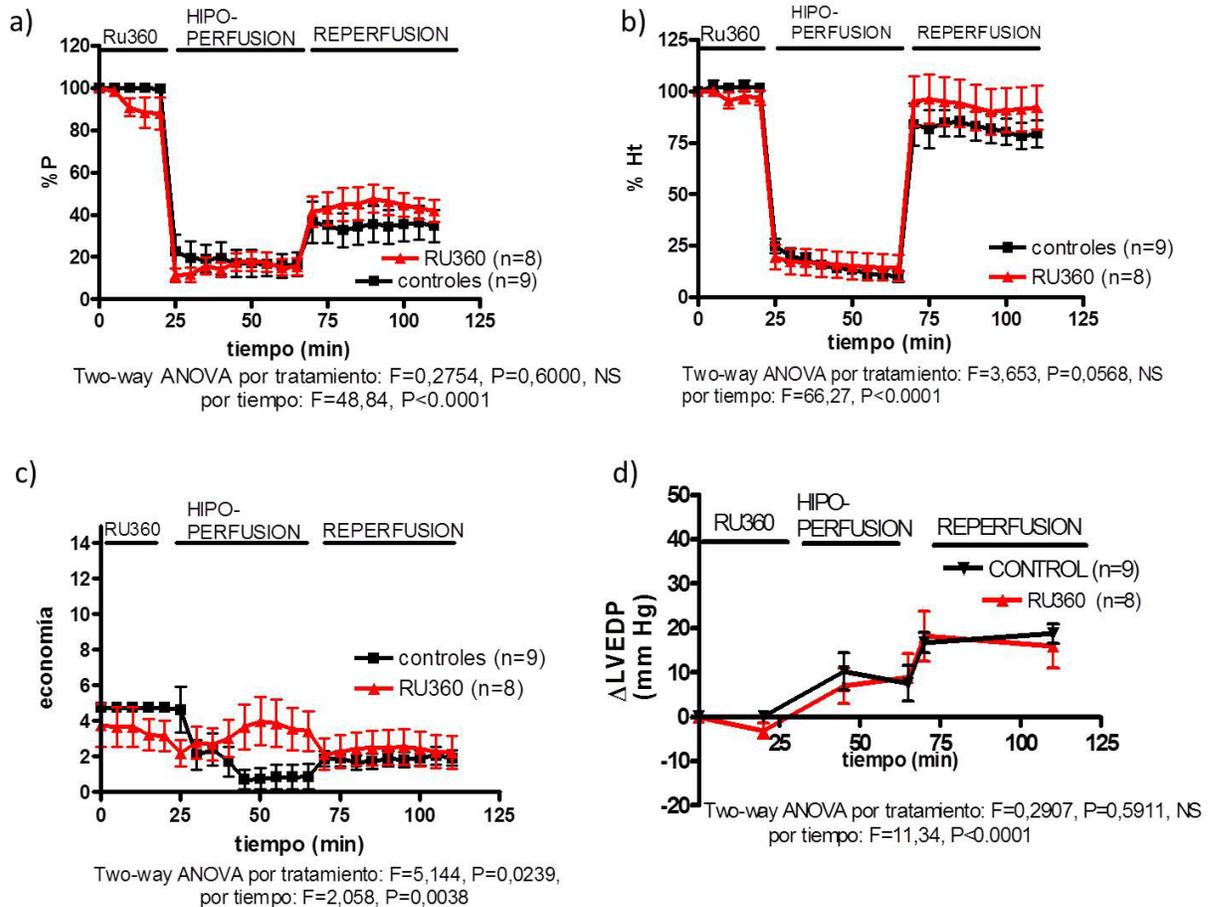


Fig. 43: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura de reposo o diastólica (LVEDP) (d) en corazones de rata, tratados con Ru360 $1 \mu M$ antes y durante la hipoperfusión, seguido de reperfusión con Krebs-C (HIP/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$ vs control.

2.b Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión:

2.b.1 Efectos de genisteína 20 μ M:

Para evaluar los efectos de GST en este modelo de atontamiento por hipoperfusión-reperfusión, un grupo de corazones de rata fueron tratados luego del período de estabilización con GST 20 μ M durante 20 minutos. El flujo de perfusión fue reducido a 1,2 ml/min durante 45 minutos (HIP) y luego restaurado a 6 ml/min con cambio a Krebs-C por 45 minutos (R). Para evaluar si existen diferencias de género los corazones fueron subdivididos en machos (CRM) y hembras (CRH).

El pretratamiento con GST (en los grupos con P inicial de $67,1 \pm 8,5$ y $82,3 \pm 17,3$ mmHg para CRM y CRH, respectivamente) redujo la RCPI en ambos sexos. Los corazones tratados con GST llegaron a recuperar hasta el $28,2 \pm 8,4$ y el $25,5 \pm 6,6$ % de la P inicial para CRM y CRH respectivamente, mientras el control recuperó el $34,6 \pm 7,7$ % al final de la R (ver fig. 44a). El pretratamiento con GST, no modificó significativamente la recuperación energética (Ht inicial de $16,9 \pm 1,8$ y $17,5 \pm 3,0$ mW/g para CRM y CRH, respectivamente) (Fig. 44b), ni la economía en el periodo HIP/R (Fig. 44c). Además, el pretratamiento con GST exacerbó la contractura diastólica del ciclo HIP/R comparado con el grupo control (Fig. 44d). Como en otras condiciones, no modificó las velocidades relativas de contracción y relajación (Tabla 16).

Así, los resultados de la perfusión de 20 μ M GST en el modelo de HIP/R son parecidos a los obtenidos en el modelo de atontamiento leve por I/R a 37°C, sin cardioprotección evidente, pero sin diferencias de género.

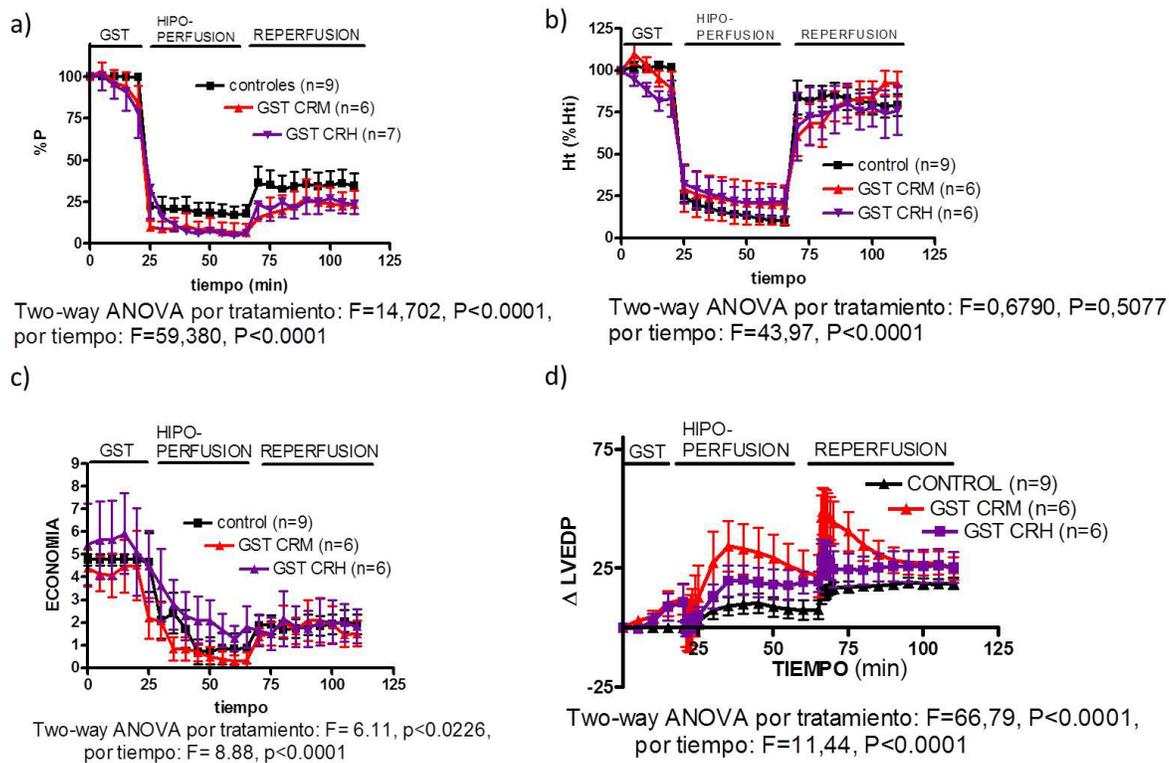


Fig. 44: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura de reposo o diastólica (LVEDP) (d) en corazones de rata, tratados con GST 20 μ M antes y durante la hipoperfusión, seguido de reperfusión con Krebs-C (HIP/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$ vs control.

Tabla 16: Parámetros contráctiles previos a la hipoperfusión y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperusión en los corazones de rata control (n=8) o pretratados con GST 20 μ M (CRM n=6; CRH n=7), expuestos a 45 minutos de HIP a 37°C.

Grupo CONTROL:	I Pt	I Pt / P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
C preisquémico	7,51±1,46	0,09±0,01	18,65±1,42	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
C preisquemico	7,46±1,46	0,09±0,01	18,62±1,43	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
R 5	2,45±0,77	0,09±0,01	16,97±1,19	-17,31±1,75	0,09±0,01	0,11±0,01
R 25	2,43±0,73	0,09±0,01	16,15±1,00	-17,96±2,15	0,09±0,01	0,11±0,01
R 45	2,31±0,62	0,09±0,01	16,16±1,23	-16,84±1,61	0,09±0,01	0,11±0,01
Grupo GST 20 μM CRM:						
C preisquémico	7,01±0,91	0,10±0,01	16,38±1,25	-13,26±0,72	0,11±0,01	0,14±0,01
C preisquémico	6,05±1,05	0,11±0,01	16,18±1,44	-12,12±0,91	0,11±0,01	0,15±0,02
R 5	0,90±0,46	0,10±0,01	13,11±3,61	-12,57±1,16	0,09±0,02	0,13±0,01
R 25	1,83±0,61	0,10±0,01	14,69±2,84	-13,68±1,73	0,12±0,01	0,12±0,01
R 45	1,80±0,43	0,10±0,01	16,30±1,75	-12,85±0,75	0,12±0,01	0,12±0,01
Grupo GST 20 μM CRH:						
C preisquémico	8,38±1,80	0,11±0,01	17,66±0,85	-14,37±1,81	0,10±0,01	0,13±0,01
C preisquémico	5,38±1,36	0,11±0,01	18,12±1,16	-15,06±1,62	0,10±0,01	0,13±0,01
R 5	1,37±0,39	0,12±0,02	18,65±1,49	-14,32±1,51	0,09±0,01	0,13±0,01
R 25	1,67±0,50	0,11±0,02	17,35±1,52	-14,08±1,77	0,09±0,01	0,12±0,01
R 45	1,43±0,38	0,10±0,01	18,54±1,39	-15,11±1,53	0,09±0,01	0,12±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 1,258 P= 0,2892, NS Por tiempo: F= 23,89 P<0,0001	Por tratamiento: F= 6,889 P= 0,0017 Por tiempo: F= 0,2106 P= 0,9319, NS	Por tratamiento: F= 3,664 P= 0,0297 Por tiempo: F= 0,6591 P= 0,6221, NS	Por tratamiento: F= 8,157 P = 0,0006 Por tiempo: F= 0,1147 P= 0,9770, NS	Por tratamiento: F= 6,381 P= 0,0026 Por tiempo: F= 0,8053 P= 0,5252, NS	Por tratamiento: F= 4,678 P= 0,0119 Por tiempo: F= 0,9076 P= 0,4634, NS

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 3 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05 vs control).

2.b.2 Efectos de ginesteína 20 μ M en corazones tratados con clonazepam 10 μ M:

Dado que CLZ mejoró la RCPI en corazones expuestos a HIP/R al modificar el rol mitocondrial, se evaluó si era capaz de mejorar el efecto de GST, la cual no generó cardioprotección en este modelo.

Para ello, en esta serie de experimentos se trataron los corazones de rata hembras con clonazepam 10 μ M (CLZ) durante 5 minutos seguido de un tratamiento durante 20 minutos de CLZ

10 μM + GST 20 μM antes y durante todo el período de hipoperfusión. Estos resultados se compararon con el grupo tratado con CLZ 10 μM antes y durante la hipoperfusión. La Fig. 45 muestra que GST invirtió el efecto cardioprotector de CLZ en este modelo de atontamiento por HIP/R. Se redujo la RCPI hasta el $19,9 \pm 2,7 \%$ que es significativamente menor que la RCPI del grupo CLZ ($55,5 \pm 11,1\%$) (Fig 45a). Simultáneamente, se mantuvo alta la recuperación energética postisquémica (Ht inicial de $18,0 \pm 3,4$ y $13,6 \pm 2,9$ mW/g para el grupo tratado con CLZ y CLZ + GST respectivamente) como el control y el grupo de CLZ (Fig 45b). Por lo tanto, el tratamiento con CLZ+GST redujo la economía muscular (P/Ht inicial de $4,2 \pm 0,6$ y $4,3 \pm 0,2$ mmHg.g/mW para CLZ y CLZ+GST respectivamente) hasta $1,0 \pm 0,1$ mmHg.g/mW que es significativamente menor al grupo tratado con CLZ ($3,2 \pm 1,00$ mmHg.g/mW) (Fig. 45c). La pérdida de recuperación contráctil provocada por el agregado de GST a CLZ se corresponde con el importante aumento de la contractura diastólica hasta llegar a $41,4 \pm 8,4$ mmHg al final de la reperfusión, respecto al grupo tratado solamente con CLZ ($-0,02 \pm 8,30$ mmHg) (Fig. 45d).

Estos resultados sugieren que entre CLZ y GST se generó una disfunción contráctil importante, aparentemente relacionada con una sobrecarga de Ca^{2+} a nivel mitocondrial y citosólico.

Con el fin de evaluar si dicha disfunción es desencadenada por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) se trataron los corazones de rata hembra con Cys-A 0.2 μM , un clásico inhibidor del mPTP (Griffiths y Halestrap, 1993), desde antes y durante el tratamiento con CLZ+GST. Esto revirtió la reducción de la RCPI generada por el agregado de GST a CLZ y aumentó la economía especialmente en la HIP, pero aumentó la contractura diastólica en R (Fig. 45).

Estos resultados principalmente sugieren que la disfunción por el tratamiento con CLZ+GST previo a la HIP/R está asociada a la apertura del mPTP.

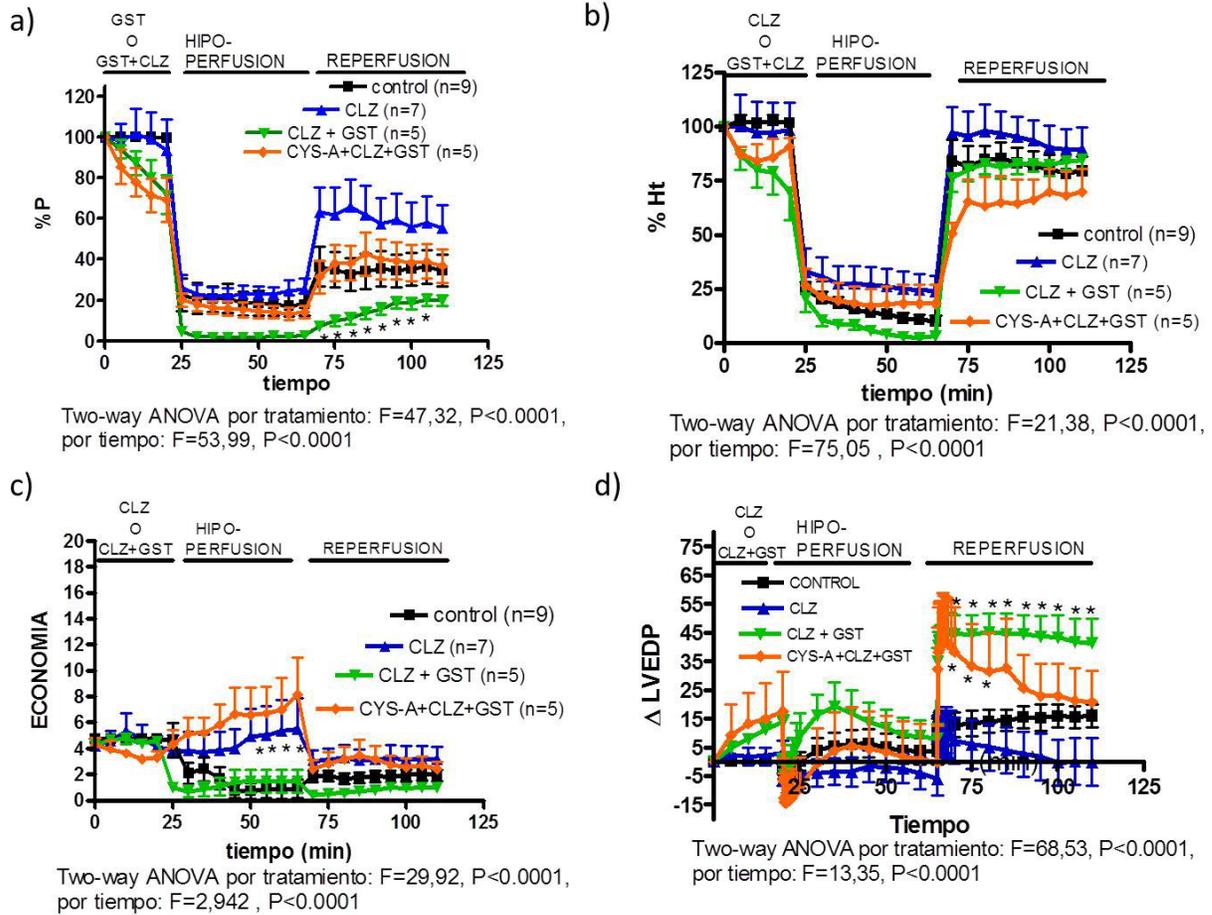


Fig. 45: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de rata hembra, (CRH) tratados con clonazepam $10 \mu\text{M}$ (CLZ) o CLZ $10 \mu\text{M}$ + GST $20 \mu\text{M}$ antes y durante la hipoperfusión (HIP) seguida de reperfusión con Krebs-C (HIP/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con $* p<0.05$ vs CLZ.

Tabla 17: Parámetros contráctiles previos a la hipoperfusión y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperusión en los corazones de ratas hembra control (n=8) o pretratados con CLZ 10 μ M (n=7) o GST 20 μ M + CLZ 10 μ M (n=5) o con GST 20 μ M + CLZ 10 μ M + Cys-A 0,2 μ M (n=5), expuestos a hipoperfusión-reperusión (HIP/R) a 37°C.

Grupo CONTROL:	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
C preisquémico	7,51±1,46	0,09±0,01	18,65±1,42	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
C preisquemico	7,46±1,46	0,09±0,01	18,62±1,43	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
R 5	2,45±0,77	0,09±0,01	16,97±1,19	-17,31±1,75	0,09±0,01	0,11±0,01
R 25	2,43±0,73	0,09±0,01	16,15±1,00	-17,96±2,15	0,09±0,01	0,11±0,01
R 45	2,31±0,62	0,09±0,01	16,16±1,23	-16,84±1,61	0,09±0,01	0,11±0,01
Grupo CLZ:						
C preisquémico	9,96±2,19	0,10±0,01	16,32±0,53	-13,16±0,76	0,09±0,005	0,13±0,01
C CLZ:	8,30±2,36	0,10±0,01	17,29±0,72	-12,91±0,63	0,09±0,01	0,14±0,01
R 5	5,40±1,42	0,10±0,01	16,01±0,86	-14,05±0,61	0,09±0,005	0,12±0,01
R 25	4,61±1,29	0,09±0,01	17,76±0,33	-15,46±0,63	0,09±0,005	0,11±0,01
R 45	4,65±1,38	0,09±0,01	17,75±0,46	-15,48±0,64	0,09±0,005	0,10±0,01
Grupo GST + CLZ:						
C preisquémico	7,69±2,06	0,12±0,01*	15,47±0,95	-12,89±0,58	0,14±0,02	0,15±0,01
C GST+CLZ	5,60±1,78	0,12±0,01*	15,74±1,03	-12,90±0,50	0,14±0,01	0,15±0,01
R 5	0,37±0,10	0,11±0,01	15,68±0,66	-16,35±1,85	0,15±0,03*	0,12±0,01
R 25	1,00±0,30	0,11±0,1	14,98±0,97	-14,53±0,68	0,19±0,04*	0,14±0,01
R 45	1,39±0,54	0,11±0,01	16,02±0,77	-13,99±0,59	0,18±0,05*	0,14±0,01
Grupo GST+CLZ+ CYS-A						
C preisquémico	10,22±1,77	0,14±0,01*	15,15±0,62	-12,56±0,82	0,12±0,01	0,14±0,01
C GST+CLZ+CYS-A	5,18±0,57	0,14±0,02*	15,15±0,59	-13,06±0,92	0,13±0,01	0,14±0,01
R 5	2,01±0,51	0,13±0,01*	16,14±0,75	-13,66±0,72	0,12±0,01	0,12±0,01
R 25	2,65±0,48	0,13±0,02*	16,14±0,74	-13,98±0,81	0,13±0,02	0,13±0,01
R 45	2,41±0,32	0,13±0,01*	16,16±0,60	-13,75±0,69	0,13±0,01	0,13±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F= 5,308 P=0,0019 Por tiempo: F= 17,92 P<0.0001	Por tratamiento: F= 27,17 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,9926 P= 0,4150, NS	Por tratamiento: F= 3,793 P= 0,0126 Por tiempo: F= 0,1579 P= 0,9590, NS.	Por tratamiento: F=8,967 P=P<0.0001 Por tiempo: F= 1,965 P= 0,1053, NS.	Por tratamiento: F= 21,60 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,7640 P= 0,5511, NS.	Por tratamiento: F= 8,806 P<0.0001 Por tiempo: F= 2,152 P= 0,0795, NS.

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 4 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (*p<0.05).

2.b.3 Efectos de la administración *in vivo* de genisteína 5 mg/Kg en HIP/R:

Para evaluar los efectos de GST en una situación más cercana a la fisiológica, y compararla con los efectos encontrados en la I/R, se administró una dosis intraperitoneal (IP) de GST (5mg/Kg) 24 horas antes del experimento en corazones de rata macho.

Como se muestra en la fig. 46, la administración de GST a los CRM (con P inicial de $72,6 \pm 11,8$ y $81,6 \pm 5,8$ mmHg respectivamente para el grupo control y GST) mejoró la RCPI ya que los corazones recuperaron hasta el $86,4 \pm 12,6$ % de la P inicial, mientras que los controles recuperaron hasta el $34,6 \pm 7,7\%$ (Fig. 46a). Sin embargo, no modificó la recuperación del Ht, cuyos valores iniciales fueron de $15,0 \pm 2,2$ mW/g para el grupo control y $16,2 \pm 1,4$ mW/g para el grupo de GST 5 mg/Kg (fig. 46b). En consecuencia, el tratamiento *in vivo* con GST 5 mg/Kg mejoró la economía muscular total (P/Ht) desde el valor inicial ($4,8 \pm 0,2$ mmHg.g/mW para el grupo control y $5,2 \pm 0,5$ mmHg.g/mW para GST). El grupo de GST, mantuvo la economía luego de la HIP/R ($5,0 \pm 0,8$ mmHg.g/mW), mientras el grupo control la redujo ($1,9 \pm 0,4$ mmHg.g/mW) (fig. 46c y 47).

Por otra parte, al igual que en los experimentos de perfusión de GST, la administración *in vivo* de GST indujo un aumento en la contractura diastólica durante la HIP de hasta $24,4 \pm 3,0$ mmHg, que es superior a la contractura observada en el grupo control ($7,5 \pm 4,0$, mmHg). Durante la reperfusión la contractura diastólica en el grupo tratado con GST IP aumenta aún más llegando a $30,1 \pm 7,4$ mmHg al final de R, que es superior al grupo control ($18,7 \pm 2,3$ mmHg) (ver fig. 46d).

La Fig. 47 compara la recuperación de la economía muscular como porcentaje del valor inicial de P/Ht, y se aprecia que en este modelo de atontamiento por HIP/R, la administración *in vivo* de GST generó la mayor recuperación de la economía muscular (un $100,6 \pm 18,0\%$ del valor inicial), que es significativamente diferente que el alcanzado por el grupo control ($39,6 \pm 7,6\%$ de la economía inicial), y por el grupo de corazones perfundidos con GST 20 μ M ($42,0 \pm 13,6$ y $37,6 \pm 7,8$ % para CRM y CRH respectivamente) (Fig. 47).

Al igual que en la I/R, estos resultados sugieren que los efectos del tratamiento agudo in vivo (IP) de GST 5 mg/Kg 24 horas antes de la HIP/R resulta más cardioprotector que su perfusión directa *ex vivo* en el mismo modelo de HIP/R.

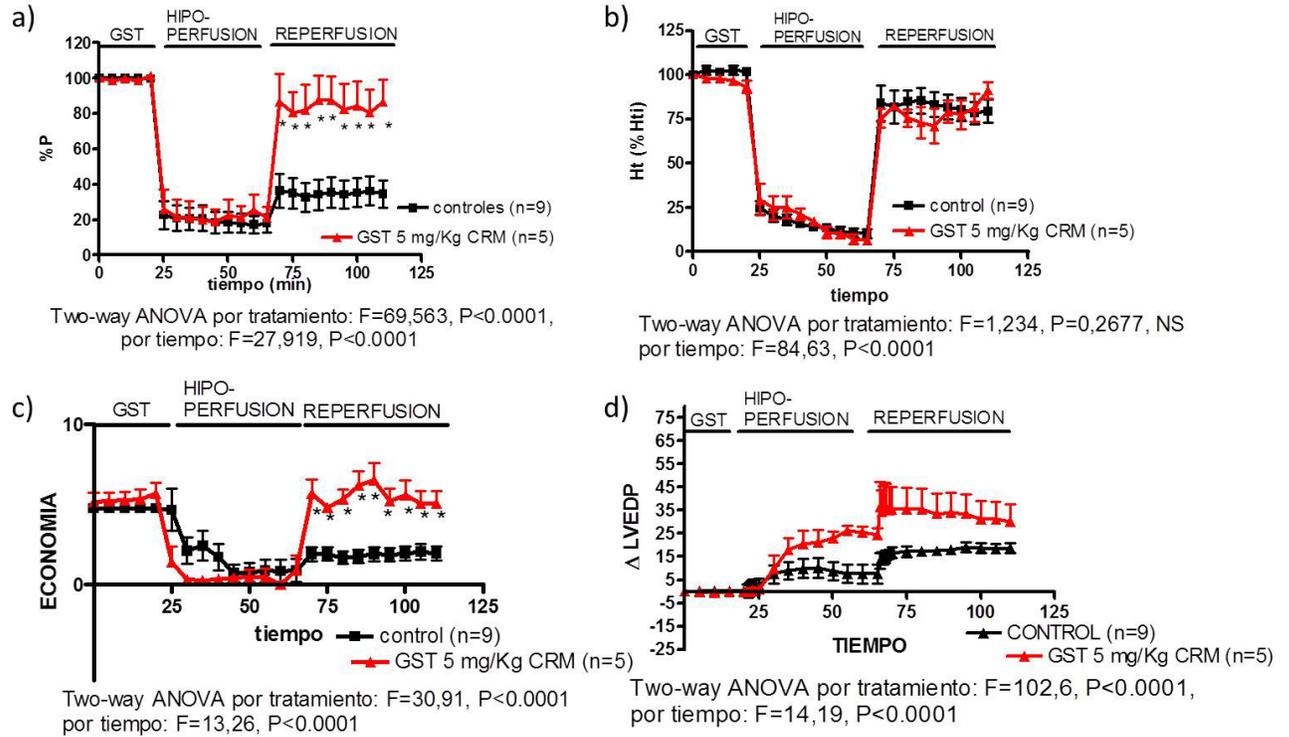


Fig. 46: Valores de: máxima presión desarrollada (% del P preisquémico) (a) flujo de calor total liberado (% del Ht preisquémico en Krebs-C) (b), economía muscular (P/Ht) (c) contractura diastólica (Δ LVEDP) (d) en corazones de rata macho (CRM) que recibieron una dosis de 5 mg/Kg de GST por vía IP 24 horas antes de exponer el corazón aislado a hipoperfusión- reperfusión (HIP/R). Se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías y de los post-tests de Bonferroni con * $p<0.05$ vs CONTROL.

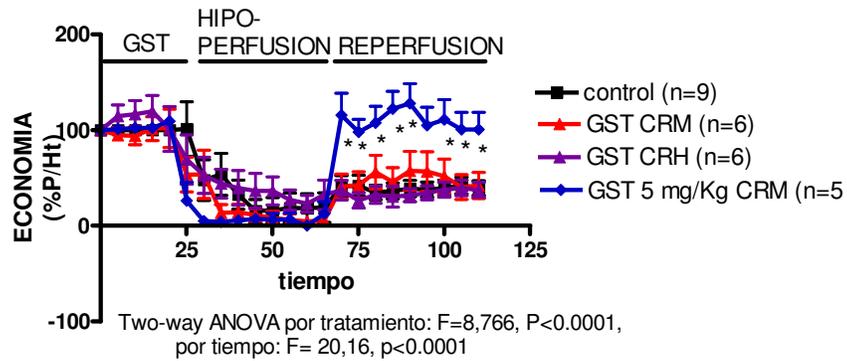


Fig 47: Comparación de la economía muscular total (P/Ht) al final de la reperfusión (expresada como % del valor inicial sin tratamiento) para los varios protocolos de genisteína (GST) efectuados en el modelo de atontamiento por HIP/R a 37°C: perfusión de GST 20 μ M en corazones de rata macho (CRM) y hembra (CRH) antes de la HIP/R, administración IP de GST 5 mg/Kg 24 horas antes del experimento de HIP/R en el corazón aislado, y control sin tratamiento de HIP/R.

Tabla 18: Parámetros contráctiles previos a la hipoperfusión y luego de 5, 25 y 45 minutos de reperfusión en los corazones de ratas control (n=8) o CRM pretratados con GST IP (5mg/Kg, n=5) expuestos a hipoperfusión- reperfusión (HIP/R) a 37°C.

Grupo	IPt	IPt /P	+P/P	-P/P	t _{c1} + t _{c2}	t _{R1} + t _{R2}
Grupo CONTROL:						
C preisquémico	7,51±1,46	0,09±0,01	18,65±1,42	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
C preisquemico	7,46±1,46	0,09±0,01	18,62±1,43	-16,16±1,06	0,08±0,01	0,11±0,01
R 5	2,45±0,77	0,09±0,01	16,97±1,19	-17,31±1,75	0,09±0,01	0,11±0,01
R 25	2,43±0,73	0,09±0,01	16,15±1,00	-17,96±2,15	0,09±0,01	0,11±0,01
R 45	2,31±0,62	0,09±0,01	16,16±1,23	-16,84±1,61	0,09±0,01	0,11±0,01
Grupo GST IP:						
C preisquémico	10,48±0,97	0,12±0,01*	14,33±1,10	-11,92±0,64	0,09±0,01	0,11±0,01
C preisquémico	10,01±0,73	0,12±0,01*	14,46±1,14	-12,09±0,73	0,09±0,01	0,11±0,01
R 5	8,04±2,17*	0,13±0,01*	13,63±0,97	-11,68±0,55	0,10±0,01	0,10±0,01
R 25	8,05±1,91*	0,12±0,01*	13,24±0,67	-12,87±1,26	0,10±0,01	0,10±0,01
R 45	7,90±1,74*	0,12±0,01*	12,91±0,36	-12,78±0,79	0,12±0,02	0,10±0,01
ANOVA	Por tratamiento: F=28,98 P<0.0001 Por tiempo: F= 4,702 P= 0,0025	Por tratamiento: F= 69,20 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,4981 P= 0,7371, NS	Por tratamiento: F= 20,65 P<0.0001 Por tiempo: F= 1,180 P= 0,3300, NS.	Por tratamiento: F= 23,46 P<0.0001 Por tiempo: F= 0,2753 P= 0,8927, NS.	Por tratamiento: F= 3,095 P= 0,0841, NS Por tiempo: F= 1,152 P= 0,3420, NS.	Por tratamiento: F= 1,706 P= 0,1969, NS Por tiempo: F= 0,2686 P= 0,8969, NS.

Se realizó el test de ANOVA de dos vías para cada parámetro en las 2 condiciones experimentales, y de los valores diferentes por el test de Bonferroni (* $p<0.05$).

3. CAMBIOS EN LA $[Ca^{2+}]$ CITOSÓLICA Y MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS AISLADOS DE RATA EXPUESTOS A GENISTEINA 20 μ M:

Con el objetivo de entender el rol mitocondrial en los efectos de GST se aislaron cardiomiocitos de rata y se cargaron con los fluoróforos Fluo-4 AM (para analizar cambios en el Ca^{2+} citosólico), o con Rhod-2 AM (para estudiar los cambios del Ca^{2+} mitocondrial), y se detectó la fluorescencia (F/Fo) mediante microscopía confocal.

En esta serie experimental, al cambiar la perfusión con HEPES-Krebs (C) a HEPES-Krebs con 10 mM cafeína-36 mM Na^+ sin cambios en $[Ca^{2+}]_i$ (2 mM) se generó un aumento transitorio en la señal de Fluo-4 seguido por una abrupta caída hasta el nivel basal (Fig 48). El mismo protocolo aumentó lentamente la señal de Rhod-2 al mismo tiempo en que cayó la señal de Fluo-4, y continuó subiendo hasta la reversión cuando se perfundió nuevamente con C (Fig. 49).

El agregado de GST no afectó el máximo de la señal de Fluo 4 ($+0.165 \pm 0.023$) o sea de la concentración de Ca^{2+} citosólico liberado por el medio con cafeína, pero demoró la caída de ese pico por unos segundos (Fig 48). En concordancia, GST redujo la señal de Rhod2 desde $+0.38 \pm 0.09$ a $+0.12 \pm 0.07$ (Fig. 49). El resultado sugiere que GST reduce el flujo del Ca^{2+} liberado por cafeína desde el citosol a las mitocondrias. Estos efectos en cardiomiocitos bien aireados y perfundidos podrían influir en la I/R o la HIP/R.

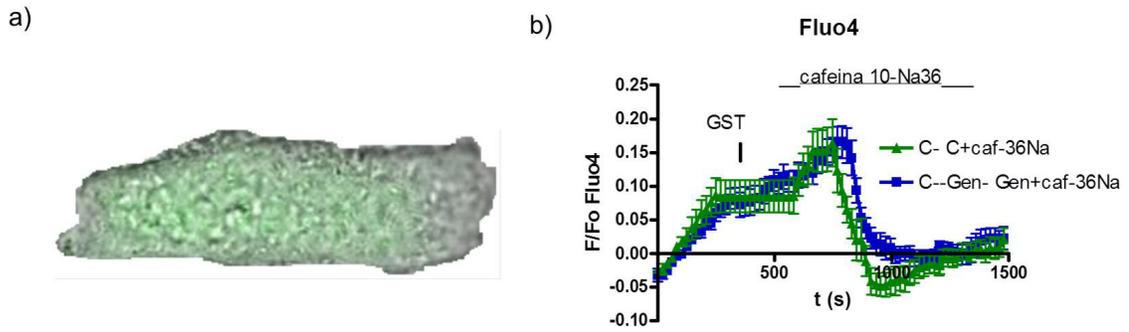


Fig. 48: Muestra la imagen de un cardiomiocito aislado de rata cargado con el fluoróforo Fluo4 a) y los efectos de GST sobre la F/Fo de Fluo-4 (Ca^{2+} libre citosólico) por perfusión de Krebs con cafeína 10 mM-Na 36 mM b) (*t*-test: $t= 1,2$, $p=0,207$).

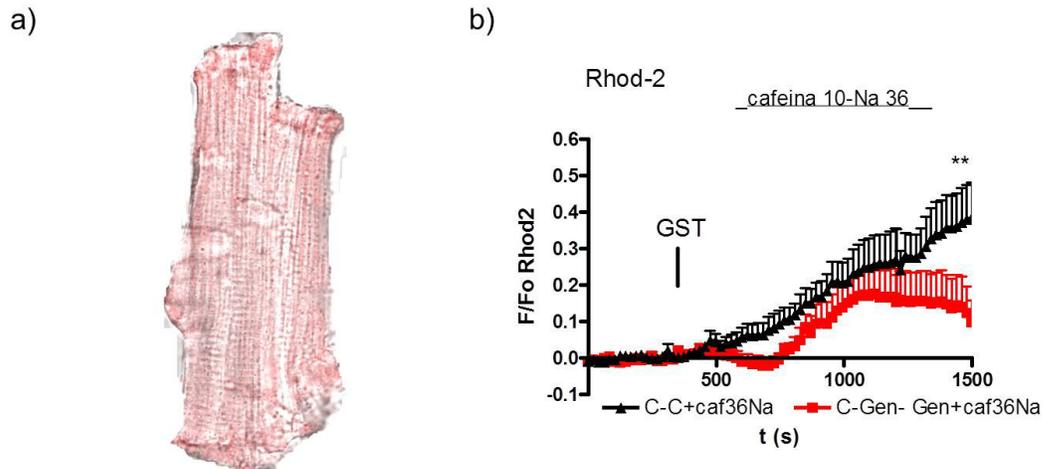


Fig. 49: Muestra la imagen de un cardiomiocito aislado de rata cargado con el fluoróforo Rhod-2 a) y los efectos de GST sobre la F/Fo de Rhod-2 (calcio libre mitocondrial) en los cardiomiocitos de rata expuestos a perfusión de Krebs con cafeína 10 mM-Na 36 mM b) (*t*-test: $t= 4,3$, $p<0.0001$).

4.MEDICIÓN DEL GRADO DE INFARTO:

En los modelos de corazones perfundidos expuestos a I/R o HIP/R, el grado de infarto (AI/VI%) resultó muy bajo en las diversas condiciones. En los modelos de atontamiento llevados a cabo a 30°C el tamaño de infarto en los corazones de rata fue de $4,57 \pm 1,83 \%$ (n=8), mientras que en cobayos se generó un $15,83 \pm 3,78 \%$ (n=8). En el modelo de atontamiento por HIP/R a 37°C, el grado de infarto fue de $3,17 \pm 0,92 \%$ (n=6). En la tabla 19 se muestra el AI/VI % en los corazones sometidos a atontamiento por 20 minutos de isquemia a 37°C seguido de reperusión. En este modelo experimental el pequeño grado de infarto del grupo control no fue modificado en los grupos tratados con GST 20 μ M previo a la I, GST 20 μ M antes de la I y durante la R, y GST 2 μ M antes de la I y durante la R. Aún en el modelo de atontamiento severo por 30 minutos de I a 37°C seguidos de reperusión no se observó un grado de infarto importante, ni fue afectado por el tratamiento con GST o GST+OVN administrados por vía intraperitoneal (tabla 20).

Tabla 19: Grado de infarto expresado como AI/VI % medido en los corazones de ratas sometidos a 20min de I y 45 min de R a 37°C, tratados con diferentes concentraciones de GST.

TRATAMIENTO:	AI/VI %
CONTROL (n=7)	5,18±0,89
GST 20 μ M (n=10)	6,89±0,96
GST/REP GST 2 μ M (n=10)	2,75±0,36
GST/REP GST 20 μ M (n=7)	4,42±0,72
ANOVA de una vía	F= 6,008, P=0.002

Tabla 20: Grado de infarto expresado como AI/VI % medido en los corazones de ratas sometidos a 30min de I y 45 min de R a 37°C, tratados con GST 5 mg/Kg o GST 5 mg/Kg + OVN 15 mg/Kg .

TRATAMIENTO:	AI/VI %
CONTROL (n=3)	2,12±0,60
GST 5 mg/Kg (n=5)	2,28±0,63
GST 5 mg/Kg + OVN 15 mg/Kg (n=5)	2,86±0,53
ANOVA de una vía	F= 1,027, P= 0,3717

DISCUSSION

Esta tesis describe los efectos de GST sobre la contractilidad miocárdica y la recuperación energética en varios modelos de atontamiento: por isquemia de no-flujo/reperusión (I/R) en corazones enteros de rata y cobayo, y por hipoperfusión/reperusión (HIP/R) en corazones enteros de rata. Puesto que la genisteína es considerada un fitoestrógeno, se evaluaron las diferencias de respuesta entre los dos sexos, tanto en I/R como en HIP/R. En los modelos de atontamiento se estudiaron los efectos de la perfusión ex vivo de GST sobre los mecanismos que regulan la energética de la homeostasis de Ca^{2+} . Para estudiar una situación más cercana a la de administración terapéutica de GST, se estudiaron los efectos producidos por la administración in vivo de 5 mg/Kg vía intraperitoneal un día antes del experimento de I/R en corazones aislados de rata expuestos a un modelo de atontamiento severo, o al modelo de atontamiento por HIP/R.

1. Modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperusión:

1.a Efectos de genisteína en corazones de rata:

El género tuvo una gran influencia en los efectos de GST, tanto en corazones de rata como de cobayo. Este fitoestrógeno produjo un aumento del atontamiento en corazones de machos (M) sin afectar a las hembras (H). Dado que en el laboratorio se había caracterizado el modelo de atontamiento a 30°C, se inició este estudio en estas condiciones, a fin de proveer elementos para entender los mecanismos de GST sobre el atontamiento miocárdico por I/R. Se empleó la concentración 20 μM de GST porque había demostrado efectos beneficiosos en algunos tejidos miocárdicos (Ji y col. 2004b; Al-Nakkash y col., 2009). A pesar de que esta concentración es más alta que la encontrada en el plasma de humanos que consumen fitoestrógenos (2 μM), se debe tener en cuenta que GST puede acumularse tanto en el corazón como en el cerebro (Setchell, 1998). Una vez caracterizados los efectos y mecanismos de GST 20 μM en corazones de rata y cobayo a 30°C,

se mimetizaron diversas situaciones más fisiológicas en corazones de rata expuestos a I/R, a saber: perfusión de GST 2 μM a 37°C, perfusión de GST 20 μM a 37°C, perfusión de GST 20 μM en presencia de adrenalina a 37°C, administración de GST 5 mg/kg vía IP 24 horas antes del experimento de atontamiento severo por I/R a 37°C, o previas al modelo de atontamiento moderado por HIP/R a 37°C.

1.a. Efectos y mecanismos de genisteína en los modelos de atontamiento a 30°C:

La GST redujo la RCPI en corazones de rata y cobayo macho (M) pero la mantuvo en corazones hembra (H). Este resultado sugirió que GST podría estar inhibiendo el influjo de Ca^{2+} por canales L, como ha sido descrito por otros autores (Katsube y col., 1998; Ji y col., 2004a). El inotropismo negativo generado por GST fue evidenciado en cardiomiocitos y en músculos papilares (Katsube y col., 1998; Ma y col., 2002). Belevych y col. (2002) demostraron que GST 20 μM generó un 50 % de inhibición de la corriente de Ca^{2+} en cardiomiocitos de cobayo. Sin embargo, fueron notorias las diferencias de género en la respuesta inotrópica de GST. Se ha demostrado que la homeostasis de Ca^{2+} y algunos de los mecanismos reguladores varían con el género. Como se describe en el punto 1-g de la Introducción de esta tesis, no se han encontrado diferencias significativas de género en la densidad de corrientes de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados en ninguna de las especies estudiadas (ratas, cobayos, ratones) (Leblanc y col., 1998; Grandy y Howlett, 2006; Brouillette y col., 2007; Yaraz y col., 2007; Farrell y col., 2010; Howlett, 2010). Sin embargo, en H se encontró mayor cantidad de la subunidad Cav1.2 del canal de Ca^{2+} tipo L (Chu y Col., 2005; Sims y col., 2008) y en la densidad de receptores de dihidropiridina en los ventrículos de ratas H (Vizgirda y col., 2002). La mayor cantidad de subunidades Cav1.2 de canal L en H y la similitud en las densidades de la corriente de Ca^{2+} entre ambos géneros sugieren que en H habría menor actividad individual de los canales L. Además, el transitorio de Ca^{2+} resultó ser más bajo en H que en M y con

menor velocidad de caída (Leblanc y col., 1998; Curl y col., 2001; Wasserstrom y col., 2008; Farrel y col., 2010). La más lenta remoción de Ca^{2+} en hembras no se correspondió con cambios en la expresión de la SERCA2a o la PLN (Chu y col., 2005; Tappia y col., 2007). En cambio, la caída del transitorio puede relacionarse con una menor liberación de Ca^{2+} desde el RS en respuesta al influjo de Ca^{2+} extracelular en H (Farrell y col., 2010), y con una mayor extrusión de calcio por el NXC-SL descrita en conejos hembras en comparación con los machos (Chen y col., 2011). Si bien podrían existir diferencias de especie, estas evidencias podrían explicar que GST afectara más la contractilidad de los corazones M, los cuales tendrían un mayor aporte de influjo de Ca^{2+} por canales respecto de la liberación del RS que las H. En esta tesis, la economía muscular total (P/Ht) acompañó los cambios en P, resultando que GST redujo la economía post-isquémica más en M que en H respecto del grupo control. Esto sugiere un aumento del costo energético para sostener una baja recuperación contráctil. El hecho que a 30°C los corazones de rata con GST exhibieron menor contractura diastólica que los controles explica parte de ese mayor consumo energético empleado en la remoción citosólica de Ca^{2+} durante la diástole.

Dado que en bibliografía hay discrepancia acerca de si los efectos inhibitorios de GST sobre el influjo de Ca^{2+} son mediados por la inhibición de la TK o no, se evaluó esta dependencia en los corazones de rata de ambos géneros por separado. El pretratamiento con OVN + GST generó un efecto inotrópico positivo previo a la isquemia y logró revertir la caída en la RCPI y en la economía generadas por GST en CRM (Fig. 26). Esto sugiere que los efectos negativos generados por GST en M son mediados por la vía de las TK, puesto que OVN bloquea las tirosinas fosfatasa (TP) y éstas contrarrestan permanentemente los efectos celulares de las TK (Ogura y col., 1999). Es conocido que las TK fosforilan residuos de tirosinas de varias proteínas, entre ellas los canales KATP en los cardiomiocitos (Kwak y col., 1996) y canales de Ca^{2+} tipo L (Katsube y col., 1998; Belevych y col., 2002). Por lo tanto, la reducción en la RCPI encontrada en corazones de rata M sugiere que en estos CRM la inhibición de la vía de las TK sería de gran importancia en el efecto de GST (Fig. 50). Esta

vía conduce indirectamente a la inhibición de la corriente ($I_{Ca,L}$) por GST como fue descrita en cardiomiocitos de cobayo (Ji y col., 2004a). Estos autores, también demostraron reversión de la inhibición generada por GST en la $I_{Ca,L}$ al inhibir la TP con OVN (Ji y col., 2004a). Pero nadie había evaluado esta acción durante la isquemia/reperfusión, como fue demostrado en esta tesis.

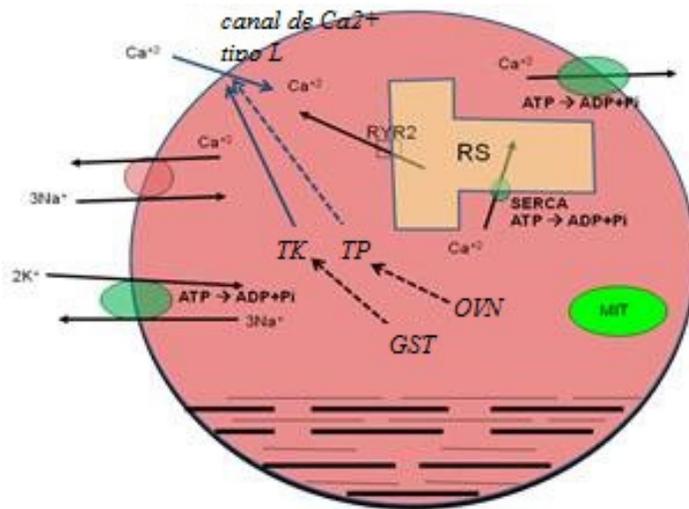


Fig. 50: Esquema de los transportadores que regulan la homeostasis de Ca^{2+} durante el ciclo cardíaco. Se señala la regulación de la $I_{Ca^{2+}-L}$ por GST mediante inhibición de la vía de las tirosina-kinasas (TK), y los efectos opuestos de OVN al inhibir a las tirosina-fosfatasa (TP).

Por el contrario, en CRH la inhibición de la corriente de Ca^{2+} tipo L por GST jugaría un rol menor, o podría estar neutralizada por un mecanismo positivo también dependiente de la inhibición de la TK. Aunque se esperaba que el mecanismo negativo vía TK estuviera presente también en CRH, el pretratamiento con OVN no generó cambios significativos en la RCPI ni en la economía post-isquémica (Fig. 25). Esto sugirió que en CRH GST podría accionar otro mecanismo positivo también mediado por inhibición de las TK. Entre los posibles mecanismos mediados por la vía de las TK se encuentra el aumento en el contenido de Ca^{2+} del RS y/o retoma y la reducción del eflujo a través del NXC-SL (Liew y col., 2003).

Para evaluar si la falta de efecto de GST en CRH era debido al lavado en la reperfusión se estudió un grupo con el tratamiento de GST durante la R. Los resultados de RCPI, economía y tono

diastólico fueron similares a los obtenidos en el pretratamiento de GST (Fig. 25). Esto sugirió que los efectos balanceados de GST en CRH ocurrirían en el inicio de la R, cuando se deja de administrar GST en los corazones pretratados o se comienza a agregar GST en los corazones tratados en R. En la búsqueda de otros mecanismos positivos de GST que compensen en CRH los efectos negativos vistos en CRM, también se pensó que podría interactuar con el receptor estrogénico y liberar NO, generando cardioprotección del mismo modo que el 17- β estradiol (Fukumoto y col., 2013). Si bien el bloqueo de la NO-sintasa con L-NAME antes y después de perfundir GST en los CRH no mejoró la RCPI al final de R (Fig. 27), inhibió el inotropismo negativo producido por GST antes de la isquemia, y aceleró la RCPI. Por lo tanto, en esta condición *ex vivo* no habría efectos cardioprotectores de GST mediados por el óxido nítrico (NO), pero GST parece estimular la producción de NO antes de la isquemia, que al menos en parte participaría en el leve inotropismo negativo previo a la I/R. En este sentido, se ha descrito que el NO producido por la eNOS reduce la corriente de Ca^{2+} (Sumii y Sperelakis, 1995) y la sensibilidad al Ca^{2+} por fosforilación de troponina I ambos mediante la PKG (Kaye y col., 1999).

Para evaluar los efectos en los mecanismos sarcoplasmáticos y mitocondriales efectuamos un protocolo en los corazones de rata en el cual luego de la isquemia se reperfunde con Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+ . Esto genera una liberación masiva y sostenida de Ca^{2+} desde el RS. La relajación depende únicamente de la recaptación de Ca^{2+} hacia las mitocondrias ya que el NXC-SL se encuentra inhibido por el bajo contenido de Na^+ en la sc. Krebs. Además, la recaptación de Ca^{2+} hacia el RS se mantiene compensada por la liberación sostenida dependiente de cafeína, como lo refleja el aumento en el flujo de calor liberado que es proporcional a los flujos de Ca^{2+} por la SERCA (Bassani y col., 1994; Consolini y col., 2007; Guo y col., 2012; Ragone y col., 2013). En este protocolo GST no modificó el ABC- ΔLVP ni el ABC- ΔHt en corazones de rata H o M a 30°C (Figs. 29 y 30), lo cual sugiere que GST no afectó el contenido de Ca^{2+} del RS liberable por cafeína ni el consumo energético para el ciclaje. Sin embargo, GST redujo el pico inicial de la contractura

en CRM, lo cual es acorde con una reducción de la liberación inicial de Ca^{2+} que podría depender de la reducción de la actividad del RyR. Si GST inhibió canales de Ca^{2+} es de esperar que la interacción con los RyR para la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} esté disminuida. Además, se evidenció una lentificación en la fase de relajación de dicha contractura, lo cual sugiere que GST reduciría la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias considerando que son las únicas organelas que pueden remover importantes cantidades de Ca^{2+} del citosol en estas condiciones de cafeína y mínimo eflujo sarcolemal de Ca^{2+} . Entonces se concluye que GST afectó las velocidades de ciclaje de Ca^{2+} entre el RS, el citosol y las mitocondrias, pero no el contenido neto del RS, ya que no afectó el ABC- ΔLVP . Esto está de acuerdo con un reporte que describe similar contenido de Ca^{2+} sarcoreticular en cardiomiocitos de rata hembra y macho estimado por aplicación de 10 mM cafeína (Farrell y col., 2010). El flujo de calor Ht durante la reperfusión con cafeína y baja $[\text{Na}^+]$ está relacionado a la hidrólisis del ATP usado en el ciclo fútil de la SERCA provocado por la continua estimulación de la liberación de Ca^{2+} del RS inducida por cafeína, y al aumento del metabolismo mitocondrial en respuesta a la disipación del $\Delta\Psi_m$ producido por el flujo del UCam. El ciclo fútil de Ca^{2+} a través de la SERCA liberaría al menos 1.25 mW/g, correspondientes al movimiento de 31 nmol Ca^{2+} /g/s estimados mediante cafeína en corazones de cobayos (Bers, 2001) (la SERCA disipa 40 kJ/mol Ca^{2+} , moviendo 2 Ca^{2+} por cada ATP hidrolizado). El flujo de la SERCA es aún mayor en ratas, que tienen mayor participación del RS. Las mitocondrias consumen 477 kJ/mol O_2 (Curtin y Woledge, 1978) y la cadena electrónica mueve 12 H^+ por O_2 y 2 H^+ por Ca^{2+} . Entonces, los flujos del UCam de 32 a 350 nmol Ca^{2+} .g⁻¹.s⁻¹, estimados respectivamente bajo condiciones fisiológica y de sobrecarga en mitocondrias aisladas (Arieli y col., 2004), podrían disipar entre 3 y 31 mW/g. De hecho, durante la reperfusión con Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+ , Ht alcanzó 4.5 y 6.5 mW/g para los grupos control y GST, respectivamente, y 16 mW/g para el grupo OVN+GST en CRM sugiriendo que OVN además podría activar el metabolismo mitocondrial (Fig. 29). En los CRH tratados con GST, el mismo tipo de reperfusión aumentó el Ht a 9.5 mW/g, mientras que el

agregado de piruvato de Na^+ (PIR) a la solución de GST aumentó Ht a 11.3 mW/g (Fig. 30). Este efecto es compatible con el aumento del flujo de Ca^{2+} a través del UCam reportado para PIR (Babiker y col., 2012; Bonazzola y col., 2014). El agregado de Pyr también redujo la contractura diastólica durante la isquemia en CRH, y revirtió la reducción de la constante de relajación provocada por GST, efectos que también son compatibles con el aumento de la captación mitocondrial de Ca^{2+} .

Además, en cardiomiocitos aislados cargados con Fluo-4 (para medir cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico) o con Rhod-2 (para medir cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial) cuando se perfundieron con Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+ se desarrolló un aumento en el Ca^{2+} citosólico seguido de una disminución. Interesantemente, como se observa en las figs. 48 y 49, la caída en el Ca^{2+} citosólico coincide temporalmente con un aumento en el Ca^{2+} mitocondrial. El tratamiento con GST demoró la caída en el Ca^{2+} citosólico y redujo la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Estos resultados sugieren que GST inhibe la captación de Ca^{2+} mitocondrial a través del UCam, en coincidencia con los resultados de corazones enteros tratados con la solución de 10 mM cafeína-baja $[\text{Na}^+]$. La menor retoma de Ca^{2+} hacia las mitocondrias podría contribuir a la acumulación de Ca^{2+} en citosol, el cual induce la contractura diastólica en CRH (Fig. 30).

1.a.2 Efectos y mecanismos de genisteína en los modelos de atontamiento a 37°C:

En el modelo de atontamiento a 37°C (20 minutos de isquemia) la perfusión de GST 20 μM previo a la isquemia redujo el inotropismo, pero en la R no modificó la RCPI en CRM ni en CRH. Sin embargo, redujo la economía muscular estimada como cociente P/Ht (Fig 33). Este resultado sugiere que en CRM la temperatura modificó el balance de efectos negativos y positivos de GST, si lo comparamos con la situación de igual grado de atontamiento a 30°C. El aumento de la temperatura mejora las velocidades de los mecanismos de transporte facilitado (transportes activos

primarios y secundarios) en comparación con la cinética de los canales iónicos. Por lo tanto, los efectos positivos de GST por los cuales se aumenta la disponibilidad de Ca^{2+} para los miofilamentos (mayor captación del RS y menor captación mitocondrial) deberían haber aumentado más que los negativos de inhibición de los canales de Ca^{2+} , explicando que ahora los CRM no reduzcan su RCPI. En efecto, GST aceleró la velocidad normalizada de relajación ($-P/P$) de las contracciones durante R a 37°C (tabla 6) pero no a 30°C (tabla 1), lo que sugiere que GST aumentaría la retoma de Ca^{2+} hacia el RS mediante la SERCA o el eflujo de Ca^{2+} hacia el medio extracelular a través del NXC-SL. Como se describió en el punto 4 de la Introducción, en músculos papilares (sin isquemia) genisteína aumentó el contenido de Ca^{2+} del RS y la recaptación, pero en cambio redujo el eflujo de Ca^{2+} a través del NXC-SL (Liew y col., 2003). Sin embargo, una reducción del eflujo podría ser causa de que aumentara el contenido de Ca^{2+} del RS. En corazones de cobayo se describió que el inotropismo positivo de GST está ligado a la inhibición de la vía de las TK, con modulación de PI3K, y producción de AMPc, lo cual facilita la movilización de Ca^{2+} del RS (Li y col., 2008). Entonces, la acelerada relajación de la contracción cardíaca por GST podría estar vinculada a la captación del RS, aunque la I/R produce cambios transitorios *per se* en la función del RS, como se discute en el próximo punto.

Cuando GST $20\ \mu\text{M}$ se perfundió desde antes de la isquemia hasta el final de la reperfusión en CRH generó una leve pero significativa reducción de la RCPI, pero mejoró considerablemente la economía (P/Ht) por reducción del gasto energético (Fig. 31), a pesar de mantener la contractura diastólica durante toda la reperfusión. Esto refleja que GST está ejerciendo efecto inotrópico negativo y efectos metabólicos al actuar en el miocardio durante la reperfusión. La caída en la RCPI podría reflejar la inhibición de canales de Ca^{2+} L, mientras la mejora en la economía indica que el miocardio se encuentra con mejor reserva de energía química y menor desacoplamiento mitocondrial, lo cual podría deberse a que se alcanzó la condición de temperatura óptima a la que funcionan las enzimas del metabolismo mitocondrial y la fosforilación oxidativa. La mejor

disponibilidad energética favorecería la recaptación sarcorreticular por la SERCA, lo cual se evidencia en el aumento de la $-P/P$ de las contracciones durante R (tabla 4).

Considerando que la concentración plasmática de GST podría ser menor en el consumo dietético de soja o derivados, evaluamos los efectos de GST perfundiéndola a esa menor concentración de 2 μM previo a la I y durante R en el modelo de atontamiento por I/R a 37°C en ambos géneros. Si bien no se observó mejora en la RCPI ni en la economía (Fig. 32) se siguió manifestando el aumento en la contractura diastólica pero sólo al inicio de R (Fig. 32d) y en la velocidad normalizada de relajación ($-P/P$) de las contracciones durante R (tabla 5). La menor concentración atenúa los efectos en el inotropismo y en la contractura diastólica al final de R.

Considerando que “in vivo” hay una importante acción adrenérgica que podría modificar los efectos negativos de GST y oponerse a sus efectos sobre los canales de Ca^{2+} , se evaluó esta interacción perfundiendo los corazones de rata a 37°C con adrenalina 0.05 μM (ADRE) previo al agregado de GST 20 μM . Tanto en corazones de rata hembra como macho, la adición de GST a ADRE mejoró la RCPI y la economía muscular (P/Ht) con respecto a los corazones tratados sólo con ADRE (Fig. 34 y 35). Comparando los resultados obtenidos para la combinación de ambas drogas con aquellos obtenidos en el grupo tratado con GST antes de la isquemia (Fig. 33) adrenalina mantuvo la RCPI y mejoró la economía. Adrenalina es un agonista β -adrenérgico que activa la adenilatociclasa (AC) y canales de K^+ . Como resultado se activa la PKA y ésta fosforila canales de Ca^{2+} L aumentando el influjo de Ca^{2+} . La perfusión de ADRE + GST podría producir efectos opuestos en los canales de Ca^{2+} , y entonces GST estaría atenuando la sobrecarga de Ca^{2+} inducida por ADRE. Esta interacción sobre los canales de Ca^{2+} explica que, en presencia de ADRE, GST haya mejorado la RCPI y la economía de los CRM (Fig. 35 y tabla 9) y este efecto sea menos significativo en los CRH (Fig 34a) dado que tienen menor incidencia del efecto de GST en los canales de Ca^{2+} . Por otro lado, a nivel de la SERCA ambas drogas sumarían sus efectos, dado que

fue descrito una activación de GST en este transportador (Liew y col. 2003; Li y col. 2008). De hecho, la combinación ADRE+GST (tablas 7 y 8) enmascaró el aumento que producía GST sola en la -P/P a 37°C (tablas 4, 5 y 6), sugiriendo que ambas drogas actúan en el mismo mecanismo. Por lo tanto, en la situación más fisiológica de presencia de ADRE, GST resultó cardioprotectora a diferencia de lo encontrado en el modelo sin ADRE.

1.a.3 Efectos de genisteína y adrenalina en el tono diastólico durante la I/R:

Un punto importante es que a 37°C GST 20 µM aumentó la contractura diastólica respecto del grupo control, ya sea durante la isquemia como en la reperfusión especialmente en los experimentos en que también estuvo presente durante la R (Figs. 31 y 33). Esto sugiere que la presencia de GST mantiene un mayor nivel de Ca²⁺ citosólico. En principio, podrían contribuir a esto la reducción del eflujo de Ca²⁺ a través del NXC-SL descrito para genisteína (Liew y col., 2003), y/o la ya discutida reducción de la captación de Ca²⁺ mitocondrial.

El hecho de que el tratamiento de ADRE eleve la contractura diastólica en la isquemia y al inicio de R, y la mantenga durante toda la R en CRH, mientras en el grupo control se revierte, sugiere que la elevada carga de Ca²⁺ del RS sería la responsable de este efecto. Es interesante la diferencia de género, ya que ADRE no mantuvo la contractura diastólica después de 5 minutos de R en los CRM. Esta dependencia del género podría relacionarse a diferencias en la actividad sarcorreticular, puesto que Mason y Macleod (2009) encontraron que los cardiomiocitos de cobayo H liberan mayor cantidad de Ca²⁺ desde el RS por agregado de 10 mM de cafeína y tienen un mayor contenido de Ca²⁺ en el RS que los de M. Además, en H se ha encontrado una mayor expresión del receptor de RyR2 y aumento en los niveles de su ARNm que en M (Chu y col., 2005; Yaras y col., 2007). Entonces, el contenido de Ca²⁺ del RS parece ser responsable de la contractura diastólica en la

I y el inicio de R. Esto concuerda con un reciente trabajo que describe que en la isquemia se genera un *leak* del RS al citosol que se acentúa especialmente al inicio de R (Mattiazzi y col., 2015).

ADRE acentuó los cambios de tono diastólico propios del ciclo I/R, que dependen del aumento de la $[Ca^{2+}]$ citosólico durante la isquemia y al inicio de la reperfusión. Durante la isquemia la contractura fue atribuida a la acidosis, y carga de Na^+ y Ca^{2+} por atenuación de los niveles de ATP para el funcionamiento de la SERCA y de otros mecanismos de eflujo. En la reperfusión, los diversos estudios describieron que el lavado de H^+ acentúa la carga citosólica de Na^+ y Ca^{2+} (ver punto 2.a de la Introducción). En corazón entero de ratón expuesto a I/R, se han medido los contenidos de Ca^{2+} diastólico y transitorio, en citosol y RS, describiendo los cambios en la I y en los primeros minutos de la reperfusión. En cuanto al origen de la contractura diastólica al inicio de R, se liberó Ca^{2+} del RS, se redujo el contenido del RS y consecuentemente la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en la reperfusión, lo cual condujo al atontamiento (Valverde y col., 2010). Nuestros resultados concuerdan con este ciclo de Ca^{2+} en la I/R al comparar la mayor contractura diastólica en el grupo de ADRE que en el control, ya que ADRE aumenta la captación, contenido y liberación de Ca^{2+} del RS, por lo que aumentará la $[Ca^{2+}]$ citosólico en la isquemia. En la reperfusión, a pesar de que ADRE ha sido removida del medio, es duradera la activación de la vía de PKA, por lo cual contribuye a la relajación de la contractura diastólica cuando se recupera el ATP para la SERCA. La dependencia del género se evidenció en el hecho que la contractura continuó en CRH pero cayó en CRM, de acuerdo al mayor contenido de Ca^{2+} del RS en hembras que en machos (Mason y Macleod, 2009). Tanto la aumentada contractura como su relajación conllevan un alto gasto energético (ATP para los miofilamentos y la SERCA), que contribuye a la caída en la economía muscular (P/Ht) en los grupos tratados con ADRE en comparación con el grupo control (Tabla 9).

Los resultados también evidencian una interacción de ADRE+GST en el RS, ya que durante la isquemia ambas drogas potencian la contractura, y en el transcurso de la reperfusión GST no altera

la relajación de la contractura diastólica inducida por ADRE, que fue diferente en hembras y machos (Figs. 34d y 35d). Esto sugiere que ADRE y GST suman sus efectos para aumentar la carga del RS, que se congelará en la isquemia por reducción de la actividad de la SERCA y se deplecionará por liberación de Ca^{2+} proporcional a la carga, durante los primeros 5 minutos de R. Además, ambas drogas mantuvieron dependencia del género en la actividad de la SERCA que conduce a la relajación de la contractura diastólica durante el resto de la R. Todo esto sugiere que ambas drogas estimularían a la SERCA, aunque por distintas vías. Los resultados están de acuerdo con el trabajo de Li y col. (2008) que en corazones de cobayo describió que mediante inhibición de la vía de las TK, GST modula los niveles de PI3K y estimula la producción de AMPc, facilitando la movilización de Ca^{2+} del RS.

Es importante notar que el tratamiento con GST sola produjo gran contractura diastólica durante toda la reperfusión en los protocolos a 37°C, especialmente cuando estuvo presente en la R (Figs. 31 a 33). Pero la contractura diastólica fue más baja que el control, y reversible a 30°C (Fig. 24). Esta diferencia de comportamiento podría deberse a que en el corazón de rata el RS se encontraría más cargado a mayor temperatura por la mayor velocidad de recaptación de la SERCA, y eso contribuiría a una mayor pérdida de Ca^{2+} en los primeros minutos de la R en los corazones tratados con GST, comparado con el control. Además, la reducción de la recaptación mitocondrial por el UCam, que se evidenció para GST (en los experimentos de la Fig. 30) podría contribuir a la elevación del Ca^{2+} citosólico basal durante R.

1.a.4 Cambios en la economía muscular:

Otro punto interesante es que la economía muscular total (P/Ht) se recuperó en la reperfusión a valores casi normales en los experimentos de atontamiento a 37°C tanto en la condición control, como en los grupos tratados con GST en CRM y CRH. En cambio ADRE redujo la economía, de

acuerdo con sus efectos de sobrecarga de Ca^{2+} , potenciación de la contractura diastólica y estimulación de la SERCA. Es importante ver que el agregado de GST a ADRE mejoró la recuperación de la economía muscular, llevándola al nivel inicial en CRH y aún mejorándola en CRM (tabla 9). Este efecto protector podría deberse a la reducción del influjo de Ca^{2+} inducida por GST, que atenuaría la sobrecarga de Ca^{2+} propia de ADRE.

En el atontamiento a 30°C , los controles también recuperan la economía muscular totalmente al final de R en rata (un 95%), pero menos en cobayo (alrededor del 60%). GST no alteró la recuperación de la economía en cobayos (51 y 67 % para CCM y CCH respectivamente) ni en CRH (52 %), pero la redujo en CRM (23%) (Fig 23). De acuerdo a lo discutido anteriormente, en CRM a 30°C predominaría la inhibición de GST sobre el influjo de Ca^{2+} desde antes de la isquemia y durante la R. Como resultado se reduce el transitorio de Ca^{2+} y la contractilidad, lo cual consumiría menos energía. Pero GST también activa la SERCA aumentando la carga del RS antes de la isquemia, lo cual potencia la ya discutida pérdida de Ca^{2+} al citosol y la inhibición de la captación mitocondrial de Ca^{2+} . Sin embargo, la reducción de la contractura diastólica respecto del grupo control a 30°C sugieren que los mecanismos activos de remoción (SERCA, NXC-SL) funcionan más que en el control para reducir la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica basal, y ello consume energía. Aunque tanto CRH como CRM tratados con GST manifestaron alto y similar consumo energético (evidenciado por el Ht) en la post-isquemia, sólo en CRM que recuperaron baja contractilidad se manifestó la reducción de la economía muscular total (P/Ht).

1.b Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento de corazones de cobayo:

En los corazones de cobayo hembra (CCH) perfundidos a 30°C GST indujo inotropismo positivo antes de la isquemia. Esto está de acuerdo con los resultados de contractilidad descriptos en músculos papilares de cobayo, en los cuales se registró un aumento del contenido de Ca^{2+}

sarcoreticular (Liew y col., 2004; Li y col., 2008) y de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos (Liew y col. 2003). Sin embargo, en corazones de cobayo macho (CCM) se observó inotropismo negativo, tal como fuera descrito en otro trabajo en el que genisteína redujo la liberación del RS (Ji y col. 2004b). Como se describe en el punto 4 de la Introducción la discrepancia de resultados ha sido atribuida a que algunos son mediados por inhibición de las TK (Li y col., 2008) y otros serían directos, y a las concentraciones empleadas. Se encontraron los efectos negativos en 40 μM (Ji y col., 2004b) y los positivos por encima de 1 μM (Li y col., 2008) de GST. A 20 μM habría entonces una combinación de efectos que evidentemente es afectada por el género como fue discutido para los corazones de rata.

Durante la I/R en el modelo de atontamiento GST redujo la RCPI en M sin afectar a las H. Es decir que el género tuvo la misma influencia en el efecto de GST que en corazones de rata, con la excepción de que en cobayos GST no alteró la economía (P/Ht). El efecto benéfico de GST fue reportado en modelos de severa isquemia, en los cuales GST redujo el tamaño del infarto en conejos y cobayos (Tissier y col., 2007). Sin embargo, no encontramos trabajos sobre efectos de GST en modelos de atontamiento por isquemia transitoria en cobayos. Es importante evaluar si GST puede prevenir esta situación, ya que el corazón de cobayo tiene una regulación de la homeostasis de Ca^{2+} más parecida al del corazón humano que el de rata, y el atontamiento sería un modelo de un episodio de primer evento de enfermedad cardíaca en un paciente. En un trabajo previo del laboratorio se había caracterizado mediante estudio mecánico-energético de los corazones de cobayo y la medición de señales de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados, que las mitocondrias tienen un rol predominante de “captadoras de Ca^{2+} ” en la I/R y así evitan la sobrecarga citosólica y reducen la disfunción contráctil. Esto surgió del efecto cardioprotector de intervenciones que favorecen la captación de Ca^{2+} mitocondrial, especialmente si se exponían a cardioplejia de alta $[\text{K}^+]$ antes de la I/R, pero también en los corazones no cardiopléjicos (Ragone y col., 2013).

Considerando que GST es un fitoestrógeno se hipotetizó que podría ejercer un efecto similar al estradiol en el preconditionamiento isquémico (PC) (Babiker y col., 2012). Se usó un modelo consistente en un episodio de PC (3 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión antes de la isquemia global). Si bien el PC más frecuente implica 3 episodios breves de isquemia seguido de 5 o 10 minutos de R previo a la isquemia prolongada, hay evidencias de que aún un único episodio isquémico de 3 a 5 minutos seguido de un mínimo de 5 minutos de reperfusión es cardioprotector (Maulik y col., 1996; Baines y col., 1998). La cardioprotección implica la activación de PKC y los canales de K_{ATP} tanto mitocondriales como sarcolemales, así como también las vías intracelulares de MAPK y TK (Baines y col. 1998; Eisen y col., 2004; Das y Das, 2008). En un modelo de PC en miocardio de rata con recuperación funcional contráctil 100 μ M de genisteína impidió la cardioprotección por lo que se pensó en la participación de las TK en el PC (Maulik y col., 1996). En otro modelo de PC en corazones de conejo con infarto como punto final, genisteína inhibió el efecto benéfico del PC cuando estaba perfundido durante la isquemia prolongada, pero la mantuvo cuando se aplicó durante el episodio de PC breve previo a la isquemia (Baines y col. 1998). Ese trabajo, que empleó otros varios inhibidores selectivos de TK y PC aplicados en las diversas etapas, contribuyó a explicar que la activación de las TK sería una etapa en el proceso de PC distal o paralelo al de la vía de la PKC (que a su vez es activada por la acción de TK sobre la PLC), y que las TK participantes serían las activadoras de la p38-MAPK (Baines y col., 1998). La dependencia temporal de la cardioprotección de genisteína en esos modelos de PC en rata (Maulik y col. 1996) y conejo (Baines y col., 1998) fue atribuida también en parte a que genisteína es un inhibidor no selectivo de la TK (Ping y col., 1999; Eisen y col., 2004), de acuerdo a sus varios efectos ya discutidos. Nuestros resultados demostraron que GST no interfiere con el PC, sino que mantuvo sus efectos benéficos (Fig. 39 y 40). Es posible que haya contribuido la perfusión de GST desde antes del período de PC breve, y el hecho de que GST 20 μ M produjo solamente un bloqueo

parcial de las TK (Geissler y col., 1990), pero lo suficiente como para reducir el transitorio de Ca^{2+} lo cual se evidencia por la caída de la contractilidad en corazones de cobayo M (Fig. 39).

Está bien establecido que el PC está mediado por activación de los canales mK_{ATP} (Eisen y col., 2004). Por lo tanto, se evaluó el agregado de 5-HD 100 μM (bloqueante de los mK_{ATP}) previo a la perfusión de GST y al PC. Este redujo la RCPI en CCM precondicionados tratados con GST, por lo que se concluye que estos canales participan en la cardioprotección generada por PC+GST. Como se describió en el punto 1f de la Introducción, bajo condiciones energéticamente poco fisiológicas la apertura del mK_{ATP} acelera la respiración mitocondrial (Riess y col., 2008) y aumenta moderadamente la producción de ROS mitocondrial (Garlid, 2000; Forbes y col., 2001). Los ROS actúan como segundos mensajeros en la cardioprotección y en el precondicionamiento (Das y col., 1999). Hay muchas evidencias de que los canales K_{ATP} participan en la protección impuesta por el precondicionamiento cardíaco. Esta protección ha sido abolida por la adición de glibenclamida y 5-HD (Zhu y col., 2003).

2 Modelo de atontamiento por hipoperfusión –reperfusión en corazones aislados de rata:

2.a Participación de transportadores mitocondriales:

La I/R cardíaca genera una disfunción contráctil y energética con diverso grado según el modelo en estudio. Por otra parte, la reducción severa del flujo de perfusión mimetiza más cercanamente la condición de obstrucción parcial coronaria por la placa ateromatosa en el angor. Se ha descrito que la HIP reduce la oxigenación del músculo pero induce una adaptación a la hipoxemia (Merati y col., 1996). Además afecta la actividad mitocondrial de recuperación metabólica menos que la isquemia (Consolini y col., 2001) y mantiene la remoción de metabolitos

evitando su acumulación extracelular. Por lo tanto, los resultados de esta tesis son importantes para caracterizar los mecanismos participantes en la disfunción por HIP/R, a fin de encontrar estrategias farmacológicas para prevenirla.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que en la I/R del corazón de rata expuesto a una solución cardiopléjica despolarizante a 30°C, las mitocondrias aportan Ca^{2+} para regular la RCPI mediante la interacción funcional con el RS, especialmente por extrusión vía el NXCm y captación por el UCam (sus respectivos bloqueos redujeron la RCPI) (Consolini y col., 2007; Ragone y Consolini, 2009). Sin embargo, en corazones de rata sin pretratamiento y expuestos a I/R a 37°C, las mitocondrias también participan en la disfunción al ceder Ca^{2+} al citosol mediante el mNXC, ya que su bloqueo mejoró la RCPI (Ragone y col., 2015). En el modelo de atontamiento por HIP/R no había sido caracterizada la participación de los transportadores mitocondriales, por lo que este punto se abordó en esta tesis además de analizar los efectos de GST. En este modelo, el inhibidor del NXCm clonazepam (CLZ) se comportó como cardioprotector, aumentando la RCPI y la economía durante la HIP de los corazones de ratas, y reduciendo la contractura diastólica durante la HIP y la R, todo en comparación con el grupo control (Fig. 41). Este resultado es cualitativamente similar al obtenido con CLZ en corazones de rata sólo expuestos a atontamiento por I/R a 37°C (Ragone y col., 2015). Por lo tanto, en la HIP/R el NXCm jugaría un rol comparable al del atontamiento por I/R, que es el de contribuir a la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico que lleva a disfunción. La mejora en la RCPI ante la inhibición del NXCm por CLZ estaría relacionada a una menor pérdida de Ca^{2+} al citosol y un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, la cual debe aumentar la actividad de las enzimas del metabolismo y consecuentemente la fosforilación oxidativa. De esta manera, con más ATP la célula estaría compensando la deficiencia producida por la HIP en el manejo energético de la función contráctil. La SERCA tendría mayor disponibilidad energética para recaptar el Ca^{2+} diastólico, lo cual explica que se reduzca la

y col., 2010) y la excesiva carga de Ca^{2+} de la mitocondria debido a que disminuye el $\Delta\Psi_m$. Esta disipación reduce la fuerza impulsora para el influjo de Ca^{2+} a través del UCam, y es uno de los mecanismos responsables de la protección miocárdica ejercida por los abridores de los canales mK_{ATP} (Ishida y col., 2001; Murata y col., 2001; Carreira y col., 2005). Sorprendentemente, la inhibición de los mK_{ATP} por 5HD en este modelo experimental, mejoró la economía durante la HIP (Fig. 42). Esto podría deberse a que el bloqueo de los mK_{ATP} estimula la captación de Ca^{2+} mitocondrial, con lo que se incrementa el metabolismo mitocondrial mejorando la condición energética de la célula durante HIP, y por tanto la contractilidad y la homeostasis de Ca^{2+} . Pero el hecho de que 5HD no redujo la RCPI ni aumentó la contractura diastólica sugiere que los mK_{ATP} ejercerían un escaso rol cardioprotector en la R posterior a la HIP.

Por otra parte, para evaluar si en el atontamiento con contractura diastólica por HIP/R en corazones de rata participa la captación de Ca^{2+} mitocondrial, se bloqueó el uniporter de Ca^{2+} (UCam). El bloqueante selectivo utilizado fue el “complejo dinuclear amino de rutenio con puente de oxígeno” o Ru-360 que a 1 μM resulta selectivo por el UCam (García Rivas y col., 2005). Los resultados mostraron que en los corazones tratados con Ru-360, no se modificó la RCPI ni la contractura diastólica propia del ciclo de HIP/R (Fig. 43). Por lo tanto, en la HIP/R la captación de Ca^{2+} por el UCam mitocondrial jugaría un menor rol, no sería responsable de la sobrecarga de calcio citosólico. Este comportamiento de Ru360 fue muy diferente al encontrado en el atontamiento por I/R de corazones de rata pretratados con cardioplejia de alta $[\text{K}^+]$ -baja $[\text{Ca}^{2+}]$, en el cual la droga redujo mucho la RCPI y aumentó Ht en la reperfusión (Ragone y Consolini, 2009). Estos resultados marcan diferencias en el rol del UCam en la homeostasis de Ca^{2+} entre los dos modelos de atontamiento, por I/R y por HIP/R. En un trabajo calorimétrico previo también se había encontrado diferencia en el patrón energético de contracciones aisladas entre la hipoperfusión y la isquemia: en la primera se mantenían los componentes de calor asociados a la unión de Ca^{2+} a troponina C y a la remoción activa del Ca^{2+} , mientras ambos componentes se reducían

abruptamente en la isquemia de no-flujo (Consolini y col., 2001). Por lo tanto, la hipoperfusión mantendría la homeostasis de Ca^{2+} citosólico, pero afecta la contractilidad (en parte debido a la caída de la tensión parietal miocárdica dada por el flujo coronario) y el metabolismo (por la reducción en el flujo de oxígeno que llega al miocardio). Esta caída del metabolismo aeróbico debería aumentar la concentración de lactato y protones en el citosol, conduciendo a cierta acidosis, seguramente menor que en la isquemia de no-flujo. Como se describió para la isquemia, la acidosis debe estimular al intercambiador Na^+/H^+ (NHE) para remover H^+ , y esto aumenta la carga intracelular de Na^+ , que a su vez podría estimular la extrusión de Ca^{2+} mitocondrial a través del NXCm y la reducción del eflujo de Ca^{2+} por el NXC-SL. Esto es compatible con los resultados obtenidos acerca del rol importante del NXCm en el atontamiento inducido por HIP/R, cediendo Ca^{2+} al citosol (evidenciable por la contractura diastólica en R) y su reversión parcial al administrar el bloqueante del NXCm CLZ.

2.b Efectos de genisteína en el modelo de atontamiento por hipoperfusión y reperusión

Los efectos generados por GST 20 μM en el modelo de HIP/R son parecidos a los obtenidos en el modelo de atontamiento leve por I/R a 37°C, sin cardioprotección evidente pues hay una caída de la RCPI y un aumento de la contractura diastólica, y sin diferencias de género (Fig. 44). Llamativamente el tratamiento con CLZ (que era cardioprotector) previo y durante el tratamiento con GST de los corazones antes de la HIP/R generó una disfunción contráctil importante, con caída de la RCPI y economía, y gran aumento de la contractura diastólica (Fig. 45). Este resultado podría interpretarse a partir de una sobrecarga de Ca^{2+} a nivel mitocondrial y citosólico, provocada por la simultánea inhibición de la extrusión mitocondrial de Ca^{2+} por el NXCm (efecto del CLZ) y de la captación de Ca^{2+} por el UCam (efecto de GST), a lo que podría sumarse el aumento de la carga de Ca^{2+} del RS atribuida a GST, según lo discutido antes en I/R.

Para evaluar si tal disfunción involucra la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) se realizó un protocolo con las dos drogas pero en presencia del inhibidor del mPTP ciclosporina A (Cys-A) perfundida desde antes de las drogas hasta el final de la reperfusión. La Fig. 45 también muestra que Cys-A revirtió la caída de la RCPI y la economía que había producido la combinación de CLZ+GST. Estos resultados confirman que la combinación de CLZ + GST induce una sobrecarga de Ca^{2+} en la HIP/R que activa la apertura del mPTP durante la R.

En cuanto al tono diastólico, Cys-A tendió a reducir la contractura durante la HIP y el final de R, pero no la redujo en el inicio de la R. Esto sugiere que el aumento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica en esta etapa de la HIP/R sería el disparador de la apertura del mPTP. Como se discutió para la I/R, en la HIP/R este Ca^{2+} también podría provenir de una liberación brusca de Ca^{2+} del RS, ante la reactivación del flujo y suministro normal de oxígeno. Otros autores encontraron un aumento de LVEDP durante R, lo cual se relacionó a los efectos inespecíficos de Cys-A (Griffiths y Halestrap, 1993). Se describió que 1 μ M Cys-A inhibió al UCam en células cromafines (Montero y col., 2001) y que Cys-A se une a otras proteínas como calmodulina, receptores de membrana y glicoproteínas (Sigal y Dumont, 1992), Si al menos parte de esto ocurriera en nuestros corazones a 0.2 μ mol/L Cys-A, explicaría parte de la contractura diastólica, como la existente al final de R cuando la contractilidad y la economía han sido mejoradas por Cys-A.

3. Efectos de genisteína in vivo 24 horas antes de la I/R o la HIP/R:

En una condición más cercana a la fisiológica se realizó la administración aguda de GST 5 mg/Kg IP previo a exponer al corazón aislado de rata al modelo de atontamiento severo por I/R a 37°C. La dosis de 5 mg/Kg de genisteína es comparable a la administrada en humanos terapéuticamente (70 mg/día de isoflavonas de soja). Apareció una mejoría en la RCPI y en la economía muscular, que fue mucho mayor en CRM que en CRH (Fig. 36). En este modelo

experimental, GST no modificó significativamente la contractura inducida por reperfusión de 10 mM cafeína en el Krebs de 36 mM Na⁺ (Δ LVP) (Fig. 37), lo cual sugiere que el RS no modificó su contenido de Ca²⁺.

Dado que el tratamiento previo *in vivo* con OVN 15 mg/Kg no modificó la respuesta de los corazones a la GST 5 mg/Kg, manteniendo las diferencias de género, indica que los efectos benéficos de GST *in vivo* no son mediados por la inhibición de TK.

A pesar de la cardioprotección, la administración de 5 mg/Kg GST *in vivo* también aumentó la contractura diastólica durante la R respecto del grupo control (Fig. 36), aún más que en el modelo de atontamiento a 37°C con perfusión de GST 20 μ M (Fig. 33), como es de esperar por la severidad de la isquemia. Pero los CRM tratados con GST redujeron la contractura diastólica durante la R hasta alcanzar el valor control, lo cual es acorde con que este grupo manifiesta mayor cardioprotección. La contractura diastólica sugiere acumulación citosólica de Ca²⁺, que en parte se relaciona con la carga de Ca²⁺ del RS, que genera un *leak* del RS al citosol especialmente al inicio de R (Mattiazzi y col., 2015). En menor medida podría deberse al efecto inhibitorio de GST sobre el eflujo a través del NXC-SL (Liew y col., 2003) y/o a la inhibición de la captación mitocondrial de Ca²⁺ detectada para GST a 30°C. La caída de la LVEDP en CRM sugiere que con el tiempo se reactivan los mecanismos de eflujo afectados por GST. Si bien energéticamente (Ht) no hubo gran diferencia entre los grupos de I/R a 37°C, la economía muscular total (P/Ht) recuperó mucho más en los grupos de CRM tratados con GST (con o sin OVN) que en los grupos de CRH o control. La recuperación de la economía al final de R en el grupo control es lógicamente menor en la I/R severa (Fig. 36c) que en la I/R de atontamiento moderado (Fig. 33c y tabla 9). La mayor recuperación de la economía en los CRM tratados con GST y expuestos a I/R severa sugiere que éstos tendrían mejor reserva energética después de recibir GST que los CRH. Entonces los CRM emplean su energía en una mayor contractilidad durante los latidos con un menor tono diastólico que los CRH (Fig. 36),

indicando que se redujo el leak del RS o lograron extruir mejor el Ca^{2+} citosólico mediante la SERCA o el NXC-SL.

Al igual que sucedió en el modelo de atontamiento severo por I/R, en el modelo de atontamiento moderado por HIP/R el tratamiento *in vivo* de GST 5 mg/Kg resultó muy cardioprotector mejorando la RCPI y la economía muscular, a pesar del incremento en la contractura diastólica. Este efecto de GST fue muy diferente al encontrado cuando GST se perfundió *ex vivo* a 20 μM , en el cual GST redujo la RCPI y elevó la contractura diastólica, con total falta de cardioprotección (comparar la Fig 46 con la Fig. 44).

Comparando esta potenciación del efecto de GST en CRM por la administración *in vivo* 24 horas antes del modelo de I/R o HIP/R con la perfusión *ex vivo*, se observó:

- a) que el efecto bloqueante del influjo de Ca^{2+} de GST, que es dependiente de la inhibición de TK, fue más importante en la perfusión de GST 20 μM en el modelo de I/R con atontamiento suave que en la administración *in vivo* de GST 5 mg/Kg sobre el modelo de I/R severo.
- b) La contractura diastólica sugiere acumulación citosólica de Ca^{2+} , que en parte se relaciona con la carga de Ca^{2+} del RS, que fue elevada por GST. Recientemente se demostró que en I/R se genera un *leak* del RS al citosol especialmente al inicio de R (Valverde y col., 2010; Mattiazzi y col. 2015). Este efecto de GST es compatible con el aumento de la actividad de la SERCA ya discutido.
- c) que en ambos modelos, GST 5 mg/Kg mejoró la RCPI y la recuperación de la economía muscular total (P/Ht) mas en CRM que en CRH, lo cual sugiere que los CRM manejan mejor la homeostasis de Ca^{2+} después de GST que los CRH.
- d) que en el mecanismo benéfico de 5 mg/Kg GST intervendría un proceso que se desarrolla *in vivo* durante las 24 horas previas al experimento de I/R o HIP/R en los corazones

aislados. En este sentido, podrían participar mecanismos de síntesis de proteínas. Este mecanismo protector no es dependiente de la inhibición de TK y supera a los efectos de GST predominantes en la perfusión *ex vivo*.

En principio podría pensarse en mecanismos asociados a los receptores estrogénicos que estimulan la síntesis de ciertas proteínas. Pero el efecto cardioprotector *in vivo* se vio más en CRM que en CRH. Además, la vía de las TK no resultó importante en estos efectos cardioprotectores *in vivo*. Si bien no hay evidencias previas de mecanismos de GST en la I/R de corazones de rata, la relación con los receptores estrogénicos se ha explorado en algunos preparados cardíacos.

En preparados sin I/R, Liew y col. (2003) encontraron que en cardiomiocitos de cobayo macho el agregado de 17 β -estradiol reducía el acortamiento celular, efecto opuesto al que generaba una concentración equimolar de GST en las mismas condiciones experimentales, por lo que sugerían que el inotropismo positivo de GST no estaba mediado por el receptor estrogénico. Y en músculos papilares de ventrículo de cobayo, el efecto inotrópico positivo de GST (a concentración mayor de 1 μ M) no fue reducido por ICI 182780, un antagonista específico del receptor estrogénico α y β (Li y col., 2008). Ambas evidencias sugieren que GST sería más benéfica en el inotropismo de cobayos machos, que en hembras. Por otra parte, en un trabajo en corazones aislados de rata GST resultó inotrópica negativa, excepto en ratas ovariectomizadas (OVX) en las que la aplicación de GST 10 a 50 μ M aumentó la contractilidad (Al-Nakkash y col., 2009). Esto muestra la complejidad de efectos y cierta interacción con el estado hormonal.

En el otro extremo, hay estudios de cardioprotección de GST en el infarto, pero allí la acción benéfica de GST fue comparable a la del estradiol. Tissier y col. (2007) encontraron que la administración intravenosa de GST (100 y 1000 μ g/Kg) como postcondicionamiento redujo el tamaño de infarto debido a oclusión de la arteria coronaria en corazones de conejo, al igual que la administración IV de 100 μ g/Kg de 17- β estradiol. Este efecto cardioprotector de GST fue bloqueado por el antagonista no selectivo del receptor estrogénico fulvestran, y por wortmanina (un

inhibidor de PI3K), sugiriendo que el efecto cardioprotector en el infarto se debía a la activación del receptor estrogénico y la vía de PI3K. Estos autores demostraron además que los corazones tratados con GST tenían un aumento significativo en la fosforilación de la quinasa cardioprotectora Akt (Tissier y col., 2007). En corazones de rata expuestos a 30 minutos de isquemia y reperfusión, la ovariectomía aumentó el daño (medido como pérdida de LDH y CrK, o como daño mitocondrial y estructural) mientras el tratamiento con 17- β estradiol revirtió ese efecto (Wu y col., 2009, Zhai y col., 2000). Por otra parte, se ha descrito que el 17- β estradiol regula la expresión de la proteína cardioprotectora HSP72 tanto en cardiomiocitos de rata H como en M (Knowlton y Sun, 2001; Voss y col., 2003; Hamilton y col., 2004). En nuestros resultados de GST 5 mg/Kg previo a la I/R severa sin infarto y previo al atontamiento por HIP/R los CRH tuvieron menor cardioprotección que los CRM, cuando se los aplicó *in vivo*. Dado que los machos tienen un bajo nivel circulante de estrógenos, podría ocurrir que en el CRM los receptores estrogénicos se encuentren en un grado de activación más bajo que en los CRH. Podría entonces GST comportarse como un agonista parcial (Kenakin, 2014) frente al estradiol circulante, de modo que cuando los niveles de éste son bajos potencia su efecto uniéndose a los receptores libres (en machos), y cuando los niveles circulantes son altos competiría con el agonista endógeno. Dado que el fitoestrógeno tiene menor actividad intrínseca que el estrógeno endógeno, reduciría el efecto estrogénico global (en hembras). En concordancia con esta posible interacción entre la GST y el estradiol se ha reportado que ambos compiten por la unión al receptor estrogénico en otro tejido como son las células cancerígenas mamarias humanas MCF-7 (Pugazhendhi y col., 2008).

En conclusión, esta tesis valida el efecto benéfico de la administración *in vivo* de GST en un individuo, como preventivo del atontamiento miocárdico disparado por la reducción del flujo coronario, y establece algunos de los mecanismos determinantes de tal protección a nivel de la homeostasis de Ca^{2+} y la energética miocárdica.

CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que GST induce cambios en el manejo de Ca^{2+} miocárdico que son dependientes del género y la temperatura. El comportamiento mecánico-energético en presencia de GST en modelos a 30°C evidenció una combinación de efectos como la reducción en el influjo de Ca^{2+} , un aumento de la captación sarcoplásmica de Ca^{2+} y la inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial en corazones de rata y cobayo. Los dos primeros mecanismos están asociados con la inhibición de tirosina-kinasas y el tercer mecanismo redujo el riesgo de sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} durante la isquemia/reperfusion. También, GST mantuvo el efecto cardioprotector del preconditionamiento, efectos relacionados a la activación de los canales mK_{ATP} . Finalmente, la cardioprotección fue mayor por administración *in vivo* de GST 5 mg/Kg a ratas un día previo a aplicar el modelo de isquemia/reperfusion con atontamiento severo o el modelo de atontamiento moderado por hipoperfusión/reperfusion, siendo más importante en machos que en hembras. Se puede concluir que los efectos benéficos de GST en el atontamiento están relacionados con la preservación energética mitocondrial, y con un aumento en la tasa de remoción y liberación de Ca^{2+} , existiendo una interacción con el estrógeno endógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Abdallah Y., Kasseckert S. A., Iraqi W., Said M., Shahzad T., Erdogan A., Neuhof C., Gündüz D., Schlüter K. D., Tillmanns H., Piper H. M., Reusch H. P., Ladilov Y. *J Cell Mol. Med.* 15: 2478–2485, 2011.
- ✓ Abdelmeguid A.E., Feher J.J. Effect of low perfusate $[Ca^{2+}]$ and diltiazem on cardiac sarcoplasmic reticulum in myocardial stunning. *Am. J. Physiol.* 266: H406-H414, 1994.
- ✓ Ahlquist R. P. A study of the adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586-600, 1948.
- ✓ Akiyama T, Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. Genistein, a special inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262: 5592-95, 1987.
- ✓ Alavian K. N., Beutner G., Lazrove E., Sacchetti S., Park H-A, Licznerski P., y col. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 10580–5, 2014.
- ✓ Allen D.G., Blinks J.R. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature.* 273:509-513, 1978.
- ✓ Allen D.G., Kurikara S. Calcium transients in mammalian ventricular muscle. *Eur. Heart J.* 1:5-15, 1980. Citado por: Chapman RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 387: 1-15, 1982.
- ✓ Allen D.G., Orchard C.H. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Research.* 60:53-168, 1987.
- ✓ Al-Nakkash, L., Markus, B., Bowden, K., Batia, L. M., Prozialeck, W.C., Broderick, T.L. Effects of acute and 2-day genistein treatment on cardiac function and ischemic tolerance in ovariectomized rats. *Gend. Med.* 6: 488-97, 2009.
- ✓ Altamirano J., Bers D. M. Effect of intracellular Ca^{2+} and action potential duration on L-type Ca^{2+} channel inactivation and recovery from inactivation in rabbit cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: H563-73, 2007.
- ✓ Altamirano F., Oyarce C., Silva P., Toyos M., Wilson C., Lavandero S., Uhlen P., Estrada M. Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *Journal of Endocrinology.* 202: 299–307, 2009.
- ✓ Anderson J. W, Johnstone B. M, Cook-Newell M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 333: 276-82, 1995.
- ✓ Andrukiv A., Costa A.D., West I.C., Garlid K.D. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H2067–H2074, 2006.

- ✓ Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.*68:1390S-1393S, 1998.
- ✓ Arieli Y., Gursahani H., Eaton M. M., Hernandez L. A., Schaefer S. Gender modulation of Ca²⁺ uptake in cardiac mitochondria. *J. Mol. Cell Cardiol.* 37: 507–513, 2004.
- ✓ Babiker F. A., Hoteit L. J., Joseph S., Mustafa A. S., Juggi J. S. The role of 17-beta estradiol in ischemic preconditioning protection of the heart. *Exp. Clin. Cardiol.* 17: 95–100, 2012.
- ✓ Baines C.P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemi-reperfusion injury. *Basic. Res. Cardiol.* 104:181-188, 2009.
- ✓ Baines C.P., Song C.X., Zheng Y.T., Wang G.W., Zhang J., Wang O.L., Guo Y., Bolli R., Cardwell E.M., Ping P. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ. Res.* 92:873-80, 2003.
- ✓ Baines, C.P., Wang, L., Cohen, M.V., Downey, J.M. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J. Mol Cell. Cardiol.* 30, 383-392., 1998.
- ✓ Barth E., Stammler G., Speiser B., Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24:669-681, 1992.
- ✓ Bassani R.A., Bassani J.W.M., Bers D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Unusual interplay among calcium transport systems. *J. Physiol.* 476:295-308, 1994.
- ✓ Belevych, A. E., Warriar, A. S., Harvey, R. D. Genistein inhibits cardiac L-type Ca²⁺ channel activity by a tyrosine kinase-independent mechanism. *Molecular Pharmacology.* 62: 554-565, 2002.
- ✓ Bell J. R., Bernasochi G. B., Varma U., Raaijmakers A. J.A, Delbridge L. M.D. Sex and sex hormones in cardiac stress—Mechanistic insights. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 137: 124–135, 2013.
- ✓ Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79:1127-1155, 1999.
- ✓ Bers D.M. Ryanodine and Ca²⁺ content of cardiac SR assessed by caffeine and rapid cooling contractures. *Am. J. Physiol.* 253:C408-C415, 1987.
- ✓ Bers D.M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* Dordrecht, Neth.: Kluwer Acad. 2nd ed. 2001.

- ✓ Bers D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415: 198-205, 2002.
- ✓ Bers D. M., Bassani J. W. Bassani R. A. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 779: 430-42, 1996.
- ✓ Bers D.M., Bridge J.H.B. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na⁺-Ca²⁺ exchange and sarcoplasmic reticulum Ca-pump: Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ. Res.* 65:334-342, 1989.
- ✓ Bers D. M., Langer G.A. Uncoupling cation effects on cardiac contractility and sarcolemmal Ca²⁺ binding. *Am. J. Physiol.* 237:H332-341, 1979.
- ✓ Beutner G., Sharma V.K., Giovannucci D.R., Yule D.I., Sheu S.S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:21482-21488, 2001.
- ✓ Beutner G., Sharma V.K., Lin L., Ryu S-Y., Dirksen R., Sheu S.S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1717:1-10, 2005.
- ✓ Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation.* 82:723-738, 1990.
- ✓ Bolli R., Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 79:609-634, 1999.
- ✓ Bonazzola P., M.I Ragone, A.E. Consolini. Effects of pyruvate on the energetics of adult rat hearts exposed to ischemia/reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92: 386–398, 2014.
- ✓ Braunwald E. y Kloner R. A. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 66: 1146-9, 1982.
- ✓ Bridge J. H., Cabeen W. R. Jr, Langer G. A. , Reeder S. Sodium efflux in rabbit myocardium: relationship to sodium-calcium exchange. *J Physiol.* 316: 555-74, 1981.
- ✓ Brouillette J., Lupien M. A., St-Michel C., Fiset C. Characterization of ventricular repolarization in male and female guinea pigs. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42: 357–366, 2007.
- ✓ Burton A.C. The importance of the shape and size of the heart. *Am. Heart J.* 54:801-810, 1957.
- ✓ Carafoli E. The homeostasis of calcium in heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17:203-212, 1985.
- ✓ Caroni P., Carafoli E. An ATP-dependent Ca²⁺ pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature London.* 283:765-767, 1980.
- ✓ Carreira R.S., Facundo H.T.S., Kowaltowski A.J. Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz. J. Med. Res.* 38:345-352, 2005.

- ✓ Chen G., Yang X., Alber S., Shusterman V., Salama G. Regional genomic regulation of cardiac sodium-calcium exchanger by oestrogen. *J. Physiol.* 589: 1061–1080, 2011.
- ✓ Chen J., Petranka J., Yamamura K., London R. E., Steenbergen C., Murphy E. Gender differences in sarcoplasmic reticulum calcium loading after isoproterenol. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H2657–H2662, 2003.
- ✓ Chu S. H., Sutherland K., Beck J., Kowalski J., Goldspink P., Schwertz D. Sex differences in expression of calcium handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle. *Life Sci.* 76: 2735–2749, 2005.
- ✓ Cole W.C., Pherson C.D., Sontag D. ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ. Res.* 69: 571-581, 1991.
- ✓ Collins A., Somlyo A. V., Hilgemann D. W. The giant cardiac membrane patch method: stimulation of outward Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange current by MgATP. *J. Physiol.* 454:27-57, 1992.
- ✓ Consolini A. E., Baldini O. A., Amat A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J. Ethnopharmacol.* 66: 33-9, 1999.
- ✓ Consolini A. E., Bonazzola P. Energetics of Ca²⁺ homeostasis during ischemia-reperfusion on neonatal rat hearts under high-[K⁺] cardioplegia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86: 866-79, 2008.
- ✓ Consolini A.E., Márquez M.T., Ponce-Hornos J.E. Energetics of heart muscle contraction contraction under high K⁺ perfusion: verapamil and Ca²⁺ effects. *Am. J. Physiol.* 273: H2343-H2350, 1997.
- ✓ Consolini A.E., Márquez M.T., Ponce-Hornos J.E. A comparison no-flow and low-flow ischemia in the rat heart: an energetic study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79: 551-558, 2001.
- ✓ Consolini A.E., Quiroga P., Yuln G., Volonté M.G. Participation of Na⁺/Ca²⁺-exchanger and sarcoplasmic reticulum in the high [K⁺]-protection against ischaemia-reperfusion dysfunction in rat hearts. *Acta Physiol. Scand.* 182:121-32, 2004.
- ✓ Consolini A. E., Ragone M. I., Bonazzola P. Mitochondrial and cytosolic calcium in rat hearts under high-K⁽⁺⁾ cardioplegia and pyruvate: mechano-energetic performance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89: 485-96, 2011.
- ✓ Consolini A.E., Ragone M.I., Conforti P., Volonté M.G. Mitochondrial role in ischemia-reperfusion of rat hearts exposed to high-K⁺ carioplegia and clonazepam: energetic and contractile consequences. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85:483-496, 2007.
- ✓ Copello J. A., Barg S., Onoue H., Fleischer S. Heterogeneity of Ca²⁺ gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys. J.* 73: 141-56, 1997.

- ✓ Coraboeuf E. Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues. *Am. J. Physiol.* 234:H101-H116, 1978.
- ✓ Costa Alexandre D. T., Quinlan C. L., Andrukhiv A., West I. C., Jaburek M., Garlid K.D. The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 209: H406-H415, 2006.
- ✓ Cox D. A., Conforti L., Sperelakis N., Matlib M.A. Selectivity of inhibition of Na⁺-Ca²⁺ exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP-27157. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21:595-599, 1993.
- ✓ Cox D.A., Matlib M.A. A role for the mitochondria Na⁺ - Ca²⁺ - exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 268, 938-947, 1993a.
- ✓ Cox D.A., Matlib M.A. Modulation of intramitochondrial free Ca²⁺ concentration by antagonists of Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS).* 14: 408-413, 1993b.
- ✓ Crisostomo P.R., Wang M., Wairiuko G.M., Morrell E.D., Meldrum D.R., Brief exposure to exogenous testosterone increases death signaling and adversely affects myocardial function after ischemia. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 290: R1168–R1174, 2006.
- ✓ Crompton M. The role of Ca²⁺ in the function and dysfunction of heart mitochondria. En *Calcium and the heart.* Editado por G.A. Langer. Raven Press Ltd. New York. pp167-198, 1990.
- ✓ Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 342:233-249, 1999.
- ✓ Cross H. R., Kranias E. G., Murphy E., Steenbergen C. Ablation of PLB exacerbates ischemic injury to a lesser extent in female than male mice: protective role of NO. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H683–H690, 2003.
- ✓ Cross H.R., Lu L., Steenbergen C., Philipson K.D., Murphy E. Overexpression of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in male, but not female, transgenic mice. *Circulation Research.* 83: 1215–1223, 1998.
- ✓ Csordás G., Golenár T., Seifert E. L., Kamer K. J., Sancak Y., Perocchi F., y col. MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metab.* 17: 976–87, 2013.
- ✓ Curl C.L., Delbridge L.M., Canny B.J., Wendt I.R. Testosterone modulates cardiomyocyte Ca²⁺ handling and contractile function, *Physiological Research.* 58: 293–297, 2009.
- ✓ Curl C.L., Wendt I.R., Canny B.J., Kotsanas G. Effects of ovariectomy and 17β-estradiol replacement on [Ca²⁺]_i in female rat cardiac myocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 30: 489–494, 2003.

- ✓ Curl C. L., Wendt I. R., Kotsanas G. Effects of gender on intracellular calcium in rat cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* 441: 709–716, 2001.
- ✓ Curtin N.A., Woledge R.A. Energy changes and muscular contraction. *Physiol. Rev.* 58:690-761, 1978.
- ✓ Das M., Das D. K. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life.* 60: 199–203, 2008.
- ✓ Das D.K., Maulik N., Sato M., Ray P.S. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol. Cell. Biochem.* 196: 59–67, 1999.
- ✓ Davidson A. M., Halestrap A. P. Inhibition of mitochondrial-matrix inorganic pyrophosphatase by physiological $[Ca^{2+}]$, and its role in the hormonal regulation of mitochondrial matrix volume. *Biochem. J.* 258:817–21, 1989.
- ✓ Davidson G. A., Varhol R. J. Kinetics of thapsigargin- Ca^{2+} -ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition. *J. Biol. Chem.* 270: 11731-4, 1995.
- ✓ Davis M. J., Wu X., Nurkiewicz T. R., Kawasaki J., Gui P., Hill M. A., y Wilson E. Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H1835-62, 2001.
- ✓ Denton R. M., Richards D. A., Chin J. G. Calcium ions and the regulation of NAD^{+} -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem. J.* 176: 899-906, 1978.
- ✓ Deodato, B., Altavilla, D., Squadrito, G., Campo, M. A., Minutoli, L., Saitta, A., Cucinotta, D., Calapai, G., Caputi, A. P., Miano, M., Squadrito, F. Cardioprotection by the phytoestrogen genistein in experimental myocardial ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology.* 128: 1683-1690, 1999.
- ✓ Deschamps, A. M., y Murphy, E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297: H1806–H1813, 2009.
- ✓ Deschamps, A. M., Murphy, E., y Sun, J. Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med.* 20: 73–78, 2010.
- ✓ Dhein S. The Langendorff Heart. In: *Practical Methods in Cardiovascular Research.* Dhein S., Mohr F. W., Delmar M. (eds). Springer, Heidelberg Berlin. Germany. 155-72, 2005.
- ✓ Di Lisa F., Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovascular Research.* 70:191-199, 2006.
- ✓ Di Lisa F., Bernardi P. A CaPful of mechanism regulating the mitochondrial permeability transition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46:775-780, 2009.

- ✓ Di Lisa F., Canton M., Menabò R., Kaludercic N., Bernardi P. Mitochondria y cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* 12:249-60, 2007.
- ✓ Di Salvo, J., Semenchuk, L. A., Lauer, J. Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys.* . 304, 386-91, 1993.
- ✓ Dohlman H. G., Thorner J., Caron M. G., Lefkowitz R. J. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 653-88, 1991.
- ✓ Domínguez-Mon M., Ponce-Hornos J.E., Gómez R., Cannata M., Taquini A.C. Energetic, metabolic and contractile effects of vasopressin in mammalian heart. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 6:373-378, 1984.
- ✓ Dos Santos P., Kowaltowski A.J., Laclau M.N., Seetharaman S., Paucek P., Boudina S., Thambo J.B., Tariosse L., Garlid K.D. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 283: H284–H295, 2002.
- ✓ Eisen A., Fisman E. Z., Rubenfire M. y col. Ischemic preconditioning: Nearly two decades of research A comprehensive review. *Atherosclerosis*; 172: 201–10, 2004.
- ✓ Elrod J. W., Molkenin J. D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ. J.* 77: 1111–22, 2013.
- ✓ Fabiato A. Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J. Gen. Physiol.* 78:457-497, 1981.
- ✓ Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245: C1-C14, 1983.
- ✓ Fabiato A., Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann. NY Acad. Sci.* 307:491-522, 1978.
- ✓ Farrell S. R., Ross J. L., Howlett S. E. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299: H36–H45, 2010.
- ✓ Fatehi-Hassanabad Z. L., Parratt J. R. Genistein, an inhibitor of tyrosine kinase, prevents the antiarrhythmic effects of preconditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 338: 67-70, 1997.

- ✓ Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G.F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning. *Pharmacological Reviews*. 59:418-458, 2007.
- ✓ Figtree G. A., Griffiths H., Lu Y. Q., Webb C. M. , MacLeod K., Collins P. Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J. Am. Coll Cardiol*. 35:1977-85, 2000.
- ✓ Filardo E. J., Thomas P. GPR30: a seven-transmembranespanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*. 16: 362-367, 2005.
- ✓ Fill M., Copello J. A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev*. 82:893-922, 2002.
- ✓ Forbes R.A., Steenbergen C., Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ. Res*. 88: 802-809, 2001.
- ✓ Foskett K. J., Madesh M. Regulation of the mitochondrial Ca(2+) uniporter by MICU1 and MICU2. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 449: 377–83, 2014.
- ✓ Frank K., Kranias E. G. Phospholamban and cardiac contractility. *Ann. Med*. 32: 572-8, 2000.
- ✓ Fukumoto T., Tawa M., Yamashita N., Ohkita M., Matsumura Y. Protective effects of 17beta-estradiol on post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow through the non-genomic estrogen receptor/nitric oxide-mediated pathway in the rat heart. *European Journal of Pharmacology*. 699: 74–80, 2013.
- ✓ Gao W. D., Atar D., Backx P. H., Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ sensitivity and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ. Res*. 76: 1036–1048, 1995.
- ✓ Gao W.D., Liu Y., Marban E.. Mechanism of decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness in stunned rat ventricular myocardium: relative roles of soluble cytosolic factors versus structural alterations. *Circ. Res*. 78: 455–465, 1996.
- ✓ García-Rivas G.J., Carvajal K., Correa F., Zazueta C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 149:829-837, 2006.
- ✓ García-Rivas G.J., Guerrero-Hernández A., Guerrero-Serna G., Rodríguez-Zavala J.S., Zazueta C. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru 360) prevents from irreversible injury in postischemic rat heart. *FEBS Journal*. 272: 3477-3488, 2005.

- ✓ Garcarena C.D., Caldiz C.I., Correa M.V., Schinella G.R., Mosca S.M., Chiappe de Cingolani G.E., Cingolani H.E., Ennis I.L. Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action. *J. Appl. Physiol.* 105:1706-1713, 2008.
- ✓ Garlid K.D. Opening mitochondrial KATP in the heart – what happens, and what does not happen. *Basic. Res. Cardiol.* 95: 275-279, 2000.
- ✓ Garlid K.D., Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1606: 23-41, 2003.
- ✓ Garlid K.D., Paucek P. Yarov-Yarovoy V., Murray H.N., Darbenzio R.B., D'Alonzo A.J., Lodge H.J., Smith M.A., Grover G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 81: 1072-1082, 1997.
- ✓ Gassanov F. Er, N., Brandt M.C., Madershahian N., Hoppe U.C., Impact of dihydrotestosterone on l-type calcium channels in human ventricular car-diomyocytes. *Endocrine Research.* 34: 59–67, 2009.
- ✓ Gatto C., Milanick M. A. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *Am. J. Physiol.* 264: C1577-86, 1993.
- ✓ Geissler J. F., Traxler P., Regenass U., Murray B. J., Roesel J. L., Meyer T., Mcglynn E., Storni A., Lydon N. B. Thiazolidine-diones: biochemical and biological activity of a novel class of tyrosine protein kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 265: 22255–22261, 1990.
- ✓ Ghafourifar P., Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418: 291-6, 1997.
- ✓ Gibbs C.L. Cardiac energetics and the Fenn effect. *Basic. Res. Cardiol.* 82 Suppl 2:61-68, 1987.
- ✓ Gibbs C.L. Cardiac energetics: sense and nonsense. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30:598-603, 2003.
- ✓ Gibbs C.L., Chapman J.B. Cardiac heat production. *Annu. Rev. Physiol.* 41:507-519, 1979.
- ✓ Gibbs C.L., Loiselle D.L. The energy output of tetanized cardiac muscle: species differences. *Pflugers Arch.* 373:31-38, 1978.
- ✓ Gibbs C.L., Loiselle D.S. Cardiac Basal Metabolism. *Japanese Journal of Physiology.* 51:399-426. 2001.
- ✓ Gibbs C.L., Loiselle D.L., Wendt I.R. Activation heat in rabbit cardiac muscle. *J. Physiol. London.* 395:115-130, 1988.
- ✓ Gibbs C.L., Mommaerts W.F., Ricchiuti N.V. Energetics of cardiac contractions. *J. Physiol.* 191:25-46, 1967.

- ✓ Ginks W. R., Sybers H. D., Maroko P. R., Covell J. W., Sobel B. E., Ross J. Jr. Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J. Clin. Invest.* 51: 2717-23, 1972.
- ✓ Glancy B., Willis W. T., Chess D. J., Balaban R. S. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry.* 52: 2793–809, 2013.
- ✓ Golden K.L., Marsh J.D., Jiang Y. Castration reduces mrna levels for calcium regulatory proteins in rat heart. *Endocrine.* 19: 339–344, 2002.
- ✓ Golden K.L., Marsh J.D., Jiang Y., Brown T., Moulden J. Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism.* 285: E449–E453, 2003.
- ✓ González Arbeláez L. F., Pérez Núñez I. A., Mosca S. M. Gsk-3 β inhibitors mimic the cardioprotection mediated by ischemic pre- and postconditioning in hypertensive rats. *Biomed. Res. Int.* 317456, 2013.
- ✓ Graier W. F., Frieden M., Malli R. Mitochondria and Ca²⁺ signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 455:375-396, 2007.
- ✓ Grandy S. A., Howlett S. E. Cardiac excitation-contraction coupling is altered in myocytes from aged male mice but not in cells from aged female mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H2362–H2370, 2006.
- ✓ Griffiths E. Reversal of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ Exchange during metabolic inhibition in rat cardiomyocytes. *FEBS Letters.* 453:400-404, 1999a.
- ✓ Griffiths E. Species dependence of mitochondrial calcium transients during excitation-contraction coupling in isolated cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 263: 554-559, 1999b.
- ✓ Griffiths E. Mitochondrial calcium transport in the heart: Physiological and pathological roles. *J. Mol Cell. Cardiol.* 46:789-803. 2009.
- ✓ Griffiths E.J. Mitochondria and heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942: 249-67, 2012.
- ✓ Griffiths E.J., Halestrap A.P. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25:1461-1469, 1993.
- ✓ Griffiths E. J., Halestrap A. P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 307:93-98, 1995.
- ✓ Griffiths E.J., Ocampo C.J., Savage J.S., Rutter G.A., Hansford R.G., Stern M.D., Silverman H.S. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research.* 39:423-433, 1998.

- ✓ Griffiths E.J., Stern M.D., Silverman H.S. Measurement of mitochondrial calcium in single living cardiomyocytes by selective removal of cytosolic indo 1. *Am. J. Physiol.* 273: C37-44, 1997.
- ✓ Grohé C., Kahlert S Löbbert K Stimpel M Karas R. H., Vetter H., Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. 416: 107-12, 1997.
- ✓ Grover G.J. Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (KATP) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:309-15, 1997.
- ✓ Gunter T.E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell. Calcium.* 28:285-296, 2000.
- ✓ Gunter T.E., Gunter K.K. Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life.* 52:197-204, 2001.
- ✓ Gunter, T.E., Gunter, K.K., Sheu, S.S., Gavin, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* 267: C313-C339, 1994.
- ✓ Gunter T.E., Yule D.I., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.D. Calcium and mitochondria. *FEBS Lettes.* 567:96-102, 2004.
- ✓ Guo, L., Qian J. Y., Abrams R., Tang H. M., Weiser T., Sanders M. J., Kolaja K. L. The electrophysiological effects of cardiac glycosides in human iPSC-derived cardiomyocytes and in guinea pig isolated hearts. *Cell Physiol. Biochem.* 27: 453-462, 2011.
- ✓ Guo T., Zhang T., Ginsburg K.S., Mishra S., Brown J.H., Bers D.M.. CaMKII δ C slows [Ca]_i decline in cardiac myocytes by promoting Ca sparks. *Biophys J.* 102, 2461-70, 2012.
- ✓ Gurkan Yazici M. D., Ozlem Erdem M. D., Burak Cimen M. D., Murat Arslan M. D., Bahar Tasdelen Ph. D., e Ismail Cinel M. D. Genistein attenuates postischemic ovarian injury in a rat adnexal torsion-detorsion model. *Fertility and Sterility.* 87: 391-96, 2007.
- ✓ Haines C. D, Harvey P. A., Luczak E. D, Barthel K. K. B., Konhilas J. P., Wtson P. A., Stauffer B. L., Leinwand L. A. Estrogenic compounds are not always cardioprotective and can be lethal in males with genetic heart disease. *Endocrinology.* 153: 4470-4479, 2012.
- ✓ Halestrap A.P. What is the mitochondrial permeability transition pore?. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46:821-831, 2009.
- ✓ Halestrap A.P., Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr. Med. Chem.* 10:1507-25, 2003.

- ✓ Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61:372-85, 2004.
- ✓ Halestrap A.P., Clarke S.J., Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta.* 1767:1007-1031, 2007.
- ✓ Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S., Woodfield K.Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366:79-94, 1998.
- ✓ Halestrap A.P., Mc Stay G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimic.* 84:153-166, 2002.
- ✓ Hamilton, K. L., Mbai, F. N., Gupta, S., y Knowlton, A. A. Estrogen, heat shock proteins, and NF{kappa}B in human vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1628–1633, 2004.
- ✓ Han J. C., Goo S., Barrett C. J., Mellor K. M., Taberner A. J., Loiselle D. S. The afterload-dependent peak efficiency of the isolated working rat heart is unaffected by streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 13: 4, 2014a.
- ✓ Han J. C. , Taberner A. J., Tran K., Goo S., Nickerson D. P., Nash M. P., Nielsen P. M., Crampin E. J., Loiselle D. S.. Comparison of the Gibbs and Suga formulations of cardiac energetics: the demise of "isoefficiency". *J. Appl. Physiol.* (1985). 113: 996-1003, 2012.
- ✓ Han J. C., Tran K., Nielsen P. M., Taberner A. J., Loiselle D. S. Streptozotocin-induced diabetes prolongs twitch duration without affecting the energetics of isolated ventricular trabeculae. *Cardiovasc. Diabetol.* 13: 79, 2014b.
- ✓ Hanley P., Daut J. KATP channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial KATP channels and an overview of alternative mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39:17-50, 2005.
- ✓ Hanley P.J., Gopalan K.V., Lareau R.A., Srivastava D.K., von Meltzer M., Daut J. Beta-oxidation of 5-hydroxydecanoate, a putative blocker of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.* 547:387-93, 2003.
- ✓ Hanley P.J, Mickel M., Löffler M, Brandt U., Daut J. KATP channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J. Physiol.* 542,3:735-741, 2002.
- ✓ Harris D. A., Das A. M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* 280: 561–73, 1991.

- ✓ Harvey P. A., Leinwand L. A. Dietary phytoestrogens present in soy dramatically increase cardiotoxicity in male mice receiving a chemotherapeutic tyrosine kinase inhibitor. *Mol. and Cel. Endoc.* 399: 330–335, 2015.
- ✓ Hasegawa Y., Hamada J., Morioka M., Yano S., Kawano T., Kai Y., Fukunaga K. y Ushio Y. Neuroprotective Effect of Postischemic Administration of Sodium Orthovanadate in Rats with Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow y Metabolism.* 23: 1040–1051, 2003.
- ✓ Hasinoff B. B., Patel D., O'Hara K. A. Mechanisms of myocyte cytotoxicity induced by the multiple receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Mol. Pharmacol.* 74:1722-8, 2008.
- ✓ Hausenloy D.J, Yellon D.M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell during ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35:339-341, 2003.
- ✓ Hénaff M., Antoine S., Mercadier J. J., Coulombe A., Hatem S. N. The voltage-independent B-type Ca²⁺ channel modulates apoptosis of cardiac myocytes. 16: 99-101, 2002.
- ✓ Hermann R., Vélez D. E., Prendes M. G. M, Varela A. El infarto agudo de miocárdio. *Ciencia Hoy.* 22: 31-35, 2013
- ✓ Heyndrickx G. R., Millard R. W., McRitchie R. J., Maroko P. R., Vatner S. F. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 56: 978-85, 1975.
- ✓ Hilgemann D. W., Collins A. Mechanism of cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange current stimulation by MgATP: possible involvement of aminophospholipid translocase. *J Physiol.* 454:59-82, 1992a.
- ✓ Hilgemann D. W, Collins A., Matsuoka S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J. Gen. Physiol.* 100: 933-61, 1992b.
- ✓ Hilgemann D. W., Matsuoka S., Nagel G. A., Collins A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J. Gen. Physiol.* 100: 905-32, 1992a.
- ✓ Hill A.V. *Trials and trials in Physiology.* Edward Arnold Publishers Ltd, 1965.
- ✓ Hill J.R., Rahimtulla K.A. Heat balance and the metabolic rate of new-born babies in relation to environmental temperature; and the effect of age and of weight on basal metabolic rate. *J. Physiol.* 180:239-65, 1965.
- ✓ Hoffman N. E., Chandramoorthy H. C., Shamugapriya S., Zhang X., Rajan S., Mallilankaraman K., y col. MICU1 motifs define mitochondrial calcium uniporter binding and activity. *Cell Rep.* 5: 1576–88, 2013.

- ✓ Hoffman N. E., Chandramoorthy H. C., Shanmughapriya S., Zhang X. Q., Vallem S., Doonan P. J., y col. SLC25A23 augments mitochondrial Ca²⁺ uptake, interacts with MCU, and induces oxidative stress-mediated cell death. *Mol. Biol. Cell.* 25: 936–47, 2014.
- ✓ Hofmann P.A., Miller W.P., Moss R.L. Altered calcium sensitivity of isometric tension in myocyte-sized preparations of porcine postischemic stunned myocardium. *Circ. Res.* 72:50-6, 1993.
- ✓ Hollenberg, M. D. Tyrosine Kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 108-114, 1994.
- ✓ Holmuhamedov E.L., Wang L., Terzic A. ATP-sensitive K⁺channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J. Physiol.* 519.2: 347-360, 1999.
- ✓ Hosey M. M., Borsotto M., Lazdunski M. Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridine-sensitive voltaje-dependent Ca²⁺ cannell in skeletal muscle membranes by cAMP and Ca²⁺dependent processes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83: 3733-37, 1986.
- ✓ Howlett S. E. Age-associated changes in excitationcontraction coupling are more prominent in ventricular myocytes from male rats than in myocytes from female rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298: H659–H670, 2010.
- ✓ Huang C., Gu H., Zhang W., Herrmann J.L., Wang M. Testosterone-down-regulated akt pathway during cardiac ischemia/reperfusion: a mechanisminvolving bad, bcl-2 and foxo3a. *Journal of Surgical Research.* 164: e1–e11, 2010.
- ✓ Inerte J., Garcia-Dorado D.,*, Ruiz-Meana M., Padilla F., Barrabe´s J., Pina P., Agulló L., Piper H., Soler-Soler J. Effect of inhibition of Na /Ca exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiov. Res.* 55: 739–748, 2002.
- ✓ Isenberg g., Han S., Schiefer A., Wendt-Gallitelli M.F. Changes in mitochondrial calcium concentration during the cardiac contraction cycle. *Cardiovasc. Res.* 27:1800-1809. 1993.
- ✓ Ishida H., Hirota Y., Genka C., Nakazawa H., Nakaya H., Sato T. Opening of mitochondrial KATP Channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circulation Research.* 89:856-858. 2001.
- ✓ Iwai T., Tanonaka K., Koshimizu M., Takeo S. Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br. J. Pharmacol.* 129:1219-27, 2000.
- ✓ Jaleel N., Nakayama H., Chen X., Kubo H., MacDonnell S., Zhang H., Berretta R., Robbins J., Cribbs L., Molkentin J.D., Houser S.R. Ca²⁺ influx through T- and L-type Ca²⁺ channels have different effects on myocyte contractility and induce unique cardiac phenotypes. *Circ Res.* 103:1109-19, 2008.

- ✓ Jansen, L. J., Lu-Chao, H., y Netherton, S. Excitation-Contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280: L666-L674, 2001.
- ✓ Jefferson W. N., Padilla-Banks E., Newbold R. R. Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reproductive Toxicology.* 23: 308–316, 2007.
- ✓ Ji E., Yin J., Ma H., He R. Effect of genistein on L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Physiologica Sinica.* 56: 466-470, 2004a.
- ✓ Ji E., Wang C., He R.. Effects of genistein on intracellular free-calcium concentration in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Physiologica Sinica.* 56: 204-9, 2004b.
- ✓ Kadambi V. J., Ponniah S., Harrer J. M., Hoit B. D., Dorn G. W. 2nd, Walsh R. A., Kranias E. G. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* Jan 97: 533-9, 1996.
- ✓ Kamer K. J., Sancak Y., Mootha V. K. The uniporter: from newly identified parts to function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449: 370–2, 2014.
- ✓ Kaplan P., Babusikova E., Lehotsky J., Dobrota D. Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* 248: 41–47, 2003.
- ✓ Karmazyn M. The role of the myocardial sodium-hydrogen exchanger in mediating ischemic and reperfusion injury. From amiloride to cariporide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874:326–334, 1999.
- ✓ Katsube Y., Yokoshiki H., Nguyen L., Yamamoto M., Sperelakis N. Inhibition of Ca²⁺ current in neonatal and adult rat ventricular myocytes by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. *Eur. J. Pharmacol.* 345: 309-14, 1998.
- ✓ Kawai M., Hussain M., Orchard C. H. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am. J. Physiol.* 277: H603-9, 1999.
- ✓ Kaye D.M., Wiviott S.D., Kelly R.A. Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a Ca²⁺ independent manner in cardiac myocytes: role of troponin I phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 398-403, 1999.
- ✓ Keef, K. D., Hume, J. R., y Zhong, J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca²⁺ channels (Ca V1.2a,b) by protein kinases. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* 281: C1743-C1756, 2001.
- ✓ Kenakin, T. A. *A Pharmacology Primer Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery.* 4th edition. Elsevier, 2014.

- ✓ Kerrick W.G., Hoar P.E., Cassidy P.S. Calcium-activated tension: the role of myosin light chain phosphorylation. *Fed. Proc.* 39: 1558-1563, 1980.
- ✓ Kicinska A., Szewczyk A. Large-Conductance Potassium Cation Channel Opener NS1619 Inhibits Cardiac Mitochondria Respiratory Chain. *Toxicol. Mech. Methods.* 14:59-61, 2004.
- ✓ Kim J., Ghosh S., Nunziato D. A., Pitt G. S. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuron.* 41: 745-54, 2004.
- ✓ Kiriazis H. y Gibbs C. L. Effects of aging on the work output and efficiency of rat papillary muscle. *Cardiovasc. Res.* 48: 111-9, 2000.
- ✓ Klee C.B., Vanaman T.C. Calmodulin. In: *Advances in protein chemistry*, vol 35. New York: Academic Press. 213-321. 1982.
- ✓ Kloner R.A., Jennings R.B. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning and their clinical implications: part I. *Circulation.* 104:2981-2989, 2001.
- ✓ Knowlton, A. A., y Sun, L. Heat shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat shock protein expression in the heart. *Am. J. Physiol.* 280: H455–H464, 2001.
- ✓ Kohlaas M., Maack C. Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation.* 122: 2273-2280, 2010.
- ✓ Kokoszka J. E., Waymire K. G., Levy S. E., Sligh J. E., Cai J., Jones D. P., y col. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427: 461–5, 2004.
- ✓ Korge P., Honda H.M., Weiss J.N. Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 3312–3317, 2002.
- ✓ Korzick D. H., Lancaster T. S. Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: Effects of estrogen deficiency. *Pflugers Arch.* 465: 669–85, 2013.
- ✓ Kovács-Bogdán E., Sancak Y., Kamer K. J., Plovanich M., Jambhekar A., Huber R. J., y col. Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 8985–90, 2014.
- ✓ Kowaltowski A.J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K.D. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K⁺ channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H649-H657, 2001.
- ✓ Kravtsov G.M., Kam K.W., Liu J., Wu S., Wong T.M., Altered ca(2+) handling by ryanodine receptor and na(+)-ca(2+) exchange in the heart from ovariec-tomized rats: role of protein kinase A, *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 292: C1625–C1635, 2007.

- ✓ Krieg M., Smith K., Bartsch W. Demonstration of a specific androgen receptor in rat heart muscle: relationship between binding, metabolism, and tissue levels of androgens. *Endocrinology*. 103: 1686–1694, 1978.
- ✓ Krulwich T. A. Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochim. Biophys. Acta*. 726: 245–64, 1983.
- ✓ Kusuoka H., Porterfield J. K., Weisman H. F., Weisfeldt M. L., Marban E.. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J. Clin. Invest.* 79: 950–961, 1987.
- ✓ Kwak Y. G., Park S. K., Cho K. P., Chae S. W. Reciprocal modulation of ATP-sensitive K⁺ channel activity in rat ventricular myocytes by phosphorylation of tyrosine and serine/threonine residues. *Life Sci.* 58: 897–904, 1996.
- ✓ Lagranha C. J., Deschamps A., Aponte A., Steenbergen C., Murphy E. () Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ. Res.* 106: 1681–1691, 2010.
- ✓ Lawlis V. B., Roche T. E. Inhibition of bovine kidney alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by reduced nicotinamide adenine dinucleotide in the presence or absence of calcium ion and effect of adenosine 5'-diphosphate on reduced nicotinamide adenine dinucleotide inhibition. *Biochemistry*. 20: 2519-24, 1981.
- ✓ Leavis P.C., Kraft E.L. Calcium binding to cardiac troponin C. *Ach. Biochem. Biophys.* 186:411-415, 1978.
- ✓ Leblanc N., Chartier D., Gosselin H., Rouleau J. L. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J. Physiol.* 511: 533–548, 1998.
- ✓ Lee H.C., Mohabir R., Smith N,m Franz M.R., Clusin W.T. Effect of ischemia on calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts containing Indo 1. *Circulation*. 78:1047-1059, 1988.
- ✓ Leisey J. R., Grotyohann L. W., Scott D. A., Scaduto R. C. Regulation of cardiac mitochondrial calcium by average extramitochondrial calcium. *Am. J. Physiol.* 265: H1203-H1208, 1993.
- ✓ Lemasters J. J., Nieminen A. L., Qian T., Trost L. C., Elmore S. P., Nishimura Y., y col. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1366: 177–96, 1998.
- ✓ Levraut J., Iwase H., Shao ZH., Vanden Hoek T.L., Schumacker P.T. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284:H549-58, 2003.

- ✓ Li H. F., Wang L. D., Qu S. Y. Phytoestrogen genistein decreases contractile response of aortic artery in vitro and arterial blood pressure in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 313-318, 2004.
- ✓ Li, H., Zhang, Y., Tian, Z., Qiu, X., Gu, J., Wu, J. Genistein stimulates myocardial contractility in guinea pigs by different subcellular mechanisms. *European Journal of Pharmacology.* 597, 70-74, 2008.
- ✓ Li L., De Santiago J., Chu G., Kranias E. G., Bers D. M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol.* 278: H769-79, 2000.
- ✓ Liew R., MacLeod K. T., Collins P. Novel stimulatory actions of the phytoestrogen genistein: effects on the gain of cardiac excitation-contraction coupling. *FASEB J.* 17: 1307-9, 2003.
- ✓ Liew R., Stagg M. A., Chan J., Collins P., MacLeod K. T. Gender determines the acute actions of genistein on intracellular calcium regulation in the guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.* 61: 66-76, 2004.
- ✓ Linn T. C., Pettit F. H., Reed L. J. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 62: 234-41, 1969a.
- ✓ Linn T. C., Pettit F. H., Hucho F., Reed L. J. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. XI. Comparative studies of regulatory properties of the pyruvate dehydrogenase complexes from kidney, heart, and liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64: 227-34, 1969b.
- ✓ Liu T., Brown D.A., O'Rourke B. Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49:728-736, 2010.
- ✓ Liu T., O'Rourke B. Enhancing mitochondrial Ca^{2+} uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circ. Res.* 103:279-288, 2008.
- ✓ Liu Y., Sato T., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?. *Circulation.* 97:2463-2469, 1998.
- ✓ Lizotte E., Grandy S.A., Tremblay A., Allen B.G., Fiset C., Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 23: 75-86, 2009.
- ✓ Logan C. V., Szabadkai G., Sharpe J. A., Parry D. A., Torelli S., Childs A-M, y col. Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat. Genet.* 46: 188-93, 2014.
- ✓ Loiselle D.S. Cardiac basal and activation metabolism. *Basic. Res. Cardiol.* 82:37-50, 1987.

- ✓ Luo W., Grupp I. L., Harrer J., Ponniah S., Grupp G., Duffy J. J., Doetschman T., Kranias E. G. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ. Res.* 75: 401-9, 1994.
- ✓ Ma T., Fan Z. Z., He R. R., Electrophysiological effects of phytoestrogen genistein on guinea pig papillary muscle. *Acta Physiologica Sin.* 54: 83-87, 2002.
- ✓ Maack C., Cortassa S., Aon M.A., Ganesan A.N., Liu T., O'Rourke B. Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 99:172-182, 2006.
- ✓ MacLennan D. H., Abu-Abed M., Kang C. "Structure-Function relationships in Ca²⁺ cycling proteins". *J. Mol. Cell Cardiol.* 34: 897-918, 2002.
- ✓ Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp. Biol. Med.* 230: 435-43, 2005.
- ✓ Mallilankaraman K., Cárdenas C., Doonan P. J., Chandramoorthy H. C., Irrinki K. M., Golenár T., y col. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* 14: 1336-43, 2012.
- ✓ Matlib M.A., Doane J.D., Sperelakis N., Riccippo-Neto F. Clonazepam and diltiazem both inhibit sodium-calcium exchange of mitochondria, but only diltiazem inhibits the slow action potentials of cardiac muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:290-296, 1985.
- ✓ Marban E. Myocardial stunning and hibernation. The physiology behind the colloquialisms. *Circulation.* 83: 681-8, 1991.
- ✓ Maroko P. R., Kjekshus J. K., Sobel B. E., Watanabe T., Covell J. W., Ross J. Jr, Braunwald E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation.* 43: 67-82, 1971.
- ✓ Maroko P. R., Libby P., Ginks W. R., Bloor C. M., Shell W. E., Sobel B. E., Ross J. Jr. Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.* 51: 2710-6, 1972.
- ✓ Marquez M. T., Consolini A., Bonazzola P., Ponce-Hornos J. E. The energetics of the quiescent heart muscle: high potassium cardioplegic solution and the influence of calcium and hypoxia on the rat heart. *Acta Physiol. Scand.* 160: 229-33, 1997.
- ✓ Mason S. A., MacLeod K. T. Cardiac action potential duration and calcium regulation in males and females. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 565-70, 2009.

- ✓ Matlib M.A., Doane J.D., Sperelakis N., Riccippo-Neto F. Clonazepam and diltiazem both inhibit sodium-calcium exchange of mitochondria, but only diltiazem inhibits the slow action potentials of cardiac muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:290-296, 1985.
- ✓ Matlib M.A., Lee S.W., Depover A., Schwartz A. A specific inhibitory action of certain benzothiazepines and benzodiazepines on the sodium-calcium exchange process of heart and brain mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.* 89:327-328, 1993.
- ✓ Matsuiko S., Nicoll D.A., Reilly R.F., Hilgemann D.W., Phillipson K.D. Identification of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3870-3874, 1991.
- ✓ Matsuoka S., Hilgemann D. W. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Ion and voltage dependencies of the transport cycle. *J. Gen. Physiol.* 100: 963-1001, 1992.
- ✓ Matsuzaki M., Gallagher K. P., Kemper W. S., White F., Ross J. Jr. Sustained regional dysfunction produced by prolonged coronary stenosis: gradual recovery after reperfusion. *Circulation.* 68: 170-82, 1983.
- ✓ Mattiazzi A., Argenziano M., Aguilar-Sanchez Y., Mazzocchi G., Escobar A. L. Ca²⁺ Sparks and Ca²⁺ waves are the subcellular events underlying Ca²⁺ overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 79: 69-78, 2015.
- ✓ Maulik N., Watanabe M., Zu Y. L., Huang C. K., Cordis G.A., Schley J.A., Das D. K. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett.* 396: 233–237, 1996.
- ✓ Maulik S. K., Prabhakar P., Dinda A. K., Sethc S. Genistein prevents isoproterenol induced cardiac hypertrophy in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 90: 1117-1125, 2012.
- ✓ McClain R. M., Wolz E., Davidovich A., Pfannkuch F., Edwards J. A., Bausch J. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 44: 56–80, 2006.
- ✓ McCord J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312:159-63, 1985.
- ✓ McGill H.C., Anselmo V.C. Jr., Buchanan J.M., Sheridan P.J. The heart is a target organ for androgen. *Science.* 207: 775–777, 1980.
- ✓ McIvor M. E., Orchard C. H., Lakatta E. G. Dissociation of changes in apparent myofibrillar Ca²⁺ sensitivity and twitch relaxation induced by adrenergic and cholinergic stimulation in isolated ferret cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 92: 509-29, 1988.

- ✓ Meldrum D.R., Wang M., Tsai B.M., Kher A., Pitcher J.M., Brown J.W., Meldrum K.K., Intracellular signaling mechanisms of sex hormones in acutemyocardial inflammation and injury. *Frontiers in Bioscience*. 10: 1835–1867, 2005.
- ✓ Mendelsohn, M. E., y Karas, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 340: 1801–1811, 1999.
- ✓ Merati G., Allibardi S., Monti L. D., de Jong J. W., Samaja M. Dynamics of myocardial adaptation to low-flow ischemia and hypoxemia. *Am. J. Physiol.* 271: H2300-5, 1996.
- ✓ Meyer R., Linz K.W., Surges R., Meinardus S., Veas J., Hoffmann A., Wind-holz O., Grohe C. Rapid modulation of I-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat, *Experimental Physiology* 83: 305–321, 1998.
- ✓ Michels F. Er, G., Brandt M.C., Khan I., Haase H., Eicks M., Lindner M., Hoppe U.C., Impact of testosterone on cardiac I-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium*. 41: 467–477, 2007.
- ✓ Misra M.K., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med. Sci. Monit.* 15:RA209-219. 2009.
- ✓ Mitchell P., Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*. 213: 137–9, 1967.
- ✓ Miura Y., Kimura J. Sodium-calcium Exchange current. *J. Gen. Physiol.* 93: 1129-45, 1989.
- ✓ Miyata H., Silverman H.S., Sollott S.J., Lakatta E.C., Stern M.D., Hansford R.G. Measurement of mitochondrial free Ca²⁺ concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 262: H1123-34, 1991.
- ✓ Montero M., Alonso M. T., Albillos A., García-Sancho J., Alvarez J. Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediated by the Ca²⁺ uniporter. *Mol. Biol. Cell.* 12: 63-71, 2001.
- ✓ Montero M., Lobatón C.D., Gutierrez-Fernandez S., Moreno A., Alvarez J. Calcineurin-independent inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake by ciclosporina A. *British Journal of Pharmacology*. 141: 263-268, 2004.
- ✓ Motegi K., Tanonaka K., Takenaga Y., Takagi N., Takeo S. Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts. *Br. J. Pharmacol.* 151: 963-978, 2007.
- ✓ Mulieri L. A., Alpert N. R. Activation heat and latency relaxation in relation to calcium movement in skeletal and cardiac muscle. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 60: 529-541, 1982.

- ✓ Mulieri L.A., Luhr G., Trefry J., Alpert N.R. Metal-film thermopiles for use with rabbit right ventricular papillary muscles. *Am. J. Physiol.* 233: C146-156, 1977.
- ✓ Mundiña-Weilenmann C., Vittone L., Ortale M., de Cingolani G. C., Mattiazzi A. Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *J. Biol. Chem.* 271: 33561-7, 1996.
- ✓ Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marbán E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research.* 89:891-898, 2001.
- ✓ Murgia M., Giorgi C., Pinton P., Rizzuto R. Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46: 781-788, 2009.
- ✓ Murphy A. N., Kelleher J. K., Fiskum G. Submicromolar Ca²⁺ regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 265: 10527–34, 1990.
- ✓ Murphy A.M., Kögler H., Georgakopoulos D, McDonough J.L., Kass D.A., Van Eyk J.E., Marbán E. Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science.* 287:488-491, 2000.
- ✓ Murphy E., Lagranha C., Deschamps A., Kohr M., Nguyen T., Wong R., Sun J., Steenbergen C. Mechanism of Cardioprotection: What Can We Learn from Females?. *Pediatr. Cardiol.* 32: 354–359, 2011.
- ✓ Murphy E., Perlman M., London R.E., Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ. Res.* 68:1250-1258, 1991.
- ✓ Murphy E., Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 88: 581–609, 2008.
- ✓ Myers M.L., Farhangkhoue P., Karmazyn M. Hydrogen peroxide induced impairment of post-ischemic ventricular function is prevented by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *Cardiovasc. Res.* 40:290-6, 1998.
- ✓ Nguyen, B. T., Kararigas, G., Jarry, H. Dose-dependent effects of a genistein enriched-diet in the heart of ovariectomized mice. *Genes Nutr.* 8: 383-90, 2012.
- ✓ Nidorf S. M., Eikelboom J. W., Budgeon C. A., Thompson P. L. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61: 404–410, 2013.

- ✓ Node K., Kitakaze M., Kosaka H., Minamino T., Funaya H., Hori M., Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17 β -estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels, *Circulation*. 96: 1953–1963, 1997.
- ✓ Noma A., Shiova T., Payer L.F.C., Twist V.W., Powell T. Cytosolic free Ca²⁺ release channel. The role of Na⁺ current and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Science*. 256:850-853, 1992.
- ✓ Nuedling S., Karas R. H., Mendelsohn M. E., Katzenellenbogen J. A., Katzenellenbogen B. S., Meyer R., Vetter H., Grohe C. Activation of estrogen receptor-beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett*. 502: 103–108, 2001.
- ✓ O'Callahan C. M., Ptasienski J., Hosey M. M. Phosphorylation of the 165-KDa dihydropyridine/phenylalkylamine receptor from skeletal muscle by protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 263: 1742-49, 1988.
- ✓ Ogura T., Shuba L. M., McDonald T. F. L-type Ca²⁺ current in guinea pig ventricular myocytes treated with modulators of tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol*. 276: H1724–33, 1999.
- ✓ Ohya S., Kuwata Y., Sakamoto K., Muraki K., Imaizumi Y. Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in cardiac mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 289:H1635-642, 2005.
- ✓ O'Rourke B., Blatter LA. Mitochondrial Ca²⁺ uptake: tortoise or hare? *J. Mol. Cell. Cardiol*. 46: 767-774, 2009.
- ✓ Pacher P., Csordás P., Schneider T., Hajnóczky G. Quantification of calcium signal transmission from sarcoplasmic reticulum to the mitochondria. *J Physiol*. 529: 553-64, 2000.
- ✓ Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, y col. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca(2+) uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol. Cell* 53: 726–37, 2014.
- ✓ Paucek P., Mironova G., Mahdi F., Beavis A.D., Woldegiorgis G., Garlid K.D. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 267:26062-26069, 1992.
- ✓ Perocchi F., Gohil V. M., Girgis H. S., Bao X. R., McCombs J. E., Palmer A. E., y col. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature*. 467: 291–6, 2010.
- ✓ Philipson K. D. Interaction of charged amphiphiles with Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem*. 259: 13999-4002, 1984.

- ✓ Philipson K.D. Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicles. *Annu. Rev. Physiol.* 47:561-571. 1985.
- ✓ Pierce G.N., Czubyrt M.P. The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:53-63, 1995.
- ✓ Pike M.M., Kitakaze M., Marban E. ²³Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* 259:H1767–H1773, 1990.
- ✓ Ping, P., Zhang, J., Zheng, Y. T., Li, R. C., Dawn, B., Tang, X. L., Takano, H., Balafanova, Z., Bolli, R.. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ. Res.* 85, 542-50, 1999.
- ✓ Piper H.M., García-Dorado D., Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research.* 38:291-300, 1998.
- ✓ Plovanich M., Bogorad R. L., Sancak Y., Kamer K. J., Strittmatter L., Li A. A., y col. MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS One.* 8: e55785, 2013.
- ✓ Ponce-Hornos J.E. Energetics of calcium movements. En: *Calcium and the heart*. Editado por G.A. Langer, New York: Raven Press Ltd. Capítulo 8, p.269-298, 1990.
- ✓ Ponce-Hornos J.E., Bonazzola P., Marengo F.D., Consolini A.E., Márquez M.T. Tension-dependent and tension-independent energy components of heart contraction. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 429:841-851, 1995.
- ✓ Ponce-Hornos J.E., Bonazzola P., Taquini A.C. The role of extracellular sodium on heart muscle energetics. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 409:163-168, 1987.
- ✓ Ponce-Hornos J.E., Philipson K.D., Bonazzola P., Langer G.A. Energetics of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in resting cardiac muscle. *Biophys J.* 77:3319-3327, 1999.
- ✓ Ponce-Hornos J.E., Ricchiuti N.V., Langer, G.A. Online calorimetry in arterially perfused rabbit interventricular septum. *Am. J. Physiol.* 243:H289-H295, 1982.
- ✓ Ponce-Hornos J.E., Taquini A.C. Calcium effects on contractility and heat production in mammalian myocardium. *Am. J. Physiol.* 251:H127:H132.1986.
- ✓ Potter J.D., Gergely J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 250:4628-4633, 1975.

- ✓ Pugazhendhi D., Watson K. A, Mills S., Botting N., Pope1 G. S. y Darbre P. D. Effect of sulphation on the oestrogen agonist activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Endocrinol.* 197: 503-15, 2008.
- ✓ Raddino R., Manca C., Poli E., Bolognesi R., Visioli O. Effects of 17 beta-estradiol on the isolated rabbit heart. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie.* 281: 57–65, 1986.
- ✓ Ragone M. I., Bonazzola P., Colareda G. A., Consolini A. E. Cardioprotective effect of hyperthyroidism on the stunned rat heart during ischaemia-reperfusion: energetics and role of mitochondria. *Exp. Physiol.* 100: 680-97, 2015.
- ✓ Ragone, M.I., y Consolini, A.E. CARDIAC role of the mitochondrial Ca²⁺ transporters in the high-[K⁺]_o cardioprotection of rat hearts under ischemia and reperfusion: a mechano-energetic study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 54, 213-22, 2009.
- ✓ Ragone, M. I., Torres, N. S., Consolini, A. E.. Energetic study of cardioplegic hearts under ischaemia/reperfusion and [Ca²⁺] changes in cardiomyocytes of guinea-pig: mitochondrial role. *Acta Physiol (Oxf).* 207, 369-84, 2013.
- ✓ Reuter H., Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol. London* 195:45-70, 1968.
- ✓ Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B., Prossnitz E. R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307: 1625-1630, 2005.
- ✓ Ricchiuti N.V., Gibbs C.L. Heat production in a cardiac contraction. *Nature.* 208:897-898, 1965.
- ✓ Rich T.L., Langer G.A., Klassen M.G. Two components of coupling calcium in single ventricular cell of rabbits and rats. *Am. J. Physiol.* 254; H932-946, 1988.
- ✓ Riess M.L., Camara A.K., Heinen A., Eells J.T., Henry M.M., Stowe D.F. KATP channel openers have opposite effects on mitochondrial respiration under different energetic conditions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51:483-91, 2008.
- ✓ Rizzuto R., Simpson A. W., Brini M., Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 358: 325-7, 1992.
- ✓ Roman R. J., Bonventre J. V., Silva P., Lechene C. Sodium orthovanadate diuresis in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218: 168-174, 1981.

- ✓ Rosenkranz-Weiss P., Tomek R. J., Mathew J., Eghbali M. Gender-specific differences in expression of mRNAs for functional and structural proteins in rat ventricular myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 26: 261–270, 1994.
- ✓ Ruiz-Meana M., Abellán A., Miró-Casas E., Agulló E., Garcia-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297: H1281–H1289, 2009.
- ✓ Ruiz-Meana M., Abellán A., Miró-Casas E., García-Dorado D. Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes. *Basic Res. Cardiol.* 102: 542-552, 2007.
- ✓ Ruiz-Meana M., Fernandez-Sanz C., Garcia-Dorado D. The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc. Res.* 88: 30-9, 2010.
- ✓ Ruiz-Meana M., García-Dorado D., Miró-Casas E., Abellán A., Soler-Soler J. Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 71: 715-724, 2006.
- ✓ Ruiz-Meana M., García Dorado D., Pino P., Insete J., Agulló L., Soler-Soler J. Cariporide preserves mitochondria proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H999-1006, 2003.
- ✓ Rutter G. A., Denton R. M. Regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca²⁺ ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD⁺ ratios. *Biochem. J.* 252: 181-9, 1988.
- ✓ Rutter G. A., Rizzuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci.* 25: 215-21, 2000.
- ✓ Sadek H.A., Nulton-Persson A.C., Szweda P.A., Szweda L.I. Cardiac ischemia/reperfusion, aging, and redox-dependent alterations in mitochondrial function. *Arch. Biochem. Biophys.* 420:201-208, 2003.
- ✓ Sagara Y., Inesi G. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.* 266: 13503-6, 1991.
- ✓ Said M., Mundiña-Weilenmann C., Vittone L., Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch.* 444: 801-9, 2002.
- ✓ Said M., Vittone L., Mundiña-Weilenmann C., Ferrero P., Kranias E.G., Mattiazzi A. Role of dual-site phospholamban site-specific mutants. *Am. J. Physiol.* 285:H1198-1205, 2003.

- ✓ Salas M., Valverde C. A., Sánchez G., Said M., Rodriguez J. S., Portiansky E. L., Kaetzel M. A., Dedman J. R., Donoso P., Kranias E. G., Mattiazzi A. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.*; 48: 1298–1306, 2010.
- ✓ Sanada S., Kitakaze M., Asanuma H., Harada K., Ogita H., Node K., Takashima S., Sakata Y., Asakura M., Shinozaki Y., Mori H., Kuzuya T., Hori M. Role of mitochondrial and sarcolemmal KATP channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H256-H263, 2001.
- ✓ Sancak Y., Markhard A. L., Kitami T., Kovács-Bogdán E., Kamer K. J., Udeshi N. D., y col. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science.* 42: 1379–82, 2013.
- ✓ Sánchez J.A., García M.C., Sharma V.K., Young K.C., Matlib M.A., Sheu S-S. Mitochondria regulate inactivation of L-type Ca²⁺ channels in rat heart. *J. Physiol.* 536.2:387-396, 2001.
- ✓ Santo-Domingo J., Vay L., Hernández-Sanmiguel E., Lobatón C.D., Moreno A., Montero M., Alvarez J. The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Br. J. Pharmacol.* 151:647-54, 2007.
- ✓ Saris N.E., Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling with emphasis on mitochondria. *Biochemistry.* 70:187-194, 2005.
- ✓ Sato T., Saito T., Saegusa N., Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* 111:198-203, 2005.
- ✓ Schafer C., Ladilov Y., Inserte J., Schafer M., Haffner S., García-Dorado D., Piper H.M. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc. Res.* 51: 241–250, 2001.
- ✓ Schinella G., Fantinelli J.C., Mosca S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clinical Nutrition.* 24: 360-366, 2005.
- ✓ Schwab K, Stein R, Scheler C, Theuring F. Dietary genistein enhances phosphorylation of regulatory myosin light chain in the myocardium of ovariectomized mice. *Electrophoresis.* 33: 1795-803., 2012.
- ✓ Schwertz D. W., Beck J. M., Kowalski J. M., Ross J. D. Sex differences in the response of rat heart ventricle to calcium. *Biol. Res. Nurs.* 5: 286–298, 2004.
- ✓ Sebag I.A., Gillis M.A., Calderone A., Kasneci A., Meilleur M., Haddad R., Noiles W., Patel B., Chalifour L.E. Sex hormone control of left ventricular structure/function: mechanistic insights using echocardiography, expression, and DNA methylation analyses in adult mice, *American Journal of Physiology –Heart and Circulatory Physiology.* 301: H1706–H1715, 2011.

- ✓ Setchell K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1333S-1346S, 1998.
- ✓ Sham J.S.K., Hatem S.N., Morad M. Species differences in the activity of the Na⁺-Ca²⁺- exchanger in mammalian cardiac myocytes. *J. Physiol.* 488.3: 623-631, 1995.
- ✓ Shannon T. R., Ginsburg K. S., Bers D. M. Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophys. J.* 78: 334-43, 2000.
- ✓ Sharma V.K, Ramesh V., Franzini-Armstrong C., Sheu S.S. Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32:97:104, 2000.
- ✓ Sharp A. H., Imagawa T., Leung A. T. Identification and characterization of the dihydropyridine-binding subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 262: 12309-15, 1987.
- ✓ Shattock M.J., Bers D.M. Rat vs rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am. J. Physiol.* 256:C813-C822, 1989.
- ✓ Sheu S.S., Sharma V.K., Banerjee S.P. measurement of cytosolic free calcium concentration in isolated rat ventricular myocytes with quin2. *Circ. Res.* 55:830-834, 1984.
- ✓ Shuba L.M.; McDonald T.F. Excitation-contraction coupling: relationship of calcium currents to contraction. *En Physiology and Pathophysiology of the heart*, editor: N. Sperelakis. 3ra Edición. Kluwer Academic Publishers. Capítulo 13, pp 269-287, 1995.
- ✓ Sigal N. H., Dumont F. J. Cyclosporin-A, FK-506, and rapamycin-pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 519-560, 1992.
- ✓ Silverman H.S., Stern M.D. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc. Res.* 28:581-97, 1994.
- ✓ Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W., y Liao, J. K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 407, 538-541, 2000.
- ✓ Sims C., Reisenweber S., Viswanathan P. C., Choi B. R., Walker W. H., Salama G. Sex, age, and regional differences in L-type calcium current are important determinants of arrhythmia phenotype in rabbit hearts with drug-induced long QT type 2. *Circ. Res.* 102: e86-e100, 2008.
- ✓ Soei L.K., Sassen L.M., Fan D.S., van Veen T., Krams R., Verdouw P.D. Myofibrillar Ca²⁺ sensitization predominantly enhances function and mechanical efficiency of stunned myocardium. *Circulation.* 90:959-69, 1994.

- ✓ Sperelakis N. Cell physiology sourcebook. A molecular approach. Academic Press, San Diego, 2001.
- ✓ Sperelakis N., Schneider J.A. Metabolic control mechanism of calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell. *Am. J. Cardiol.* 37:1079-1085, 1976.
- ✓ Stauffer B. L., Konhilas J. P., Luczak E. D., Leinwand L. A. Soy diet worsens heart disease in mice. *J. clin. Inv.* 116: 209-216, 2006.
- ✓ Stice, J. P., Chen, L., Kim, S. C., Chen, L., Tran, A. L., Liu, T. T., y col. 17 β -estradiol, aging, inflammation and the stress response in the female heart. *Endocrinology* 152, 1589–1598, 2011.
- ✓ Strehler E. E., Caride A. J., Filoteo A. G., Xiong Y., Penniston J. T., Enyedi A. Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099: 226-36, 2007.
- ✓ Suga H., Hisano R., Hirata S., Hayashi T., Yamada O., Ninomiya I. Heart rate-independent energetics and systolic pressure-volume area in dog heart. *Am. J. Physiol.* 244:H206-214, 1983.
- ✓ Sumii K., Sperelakis N. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 77: 803-812, 1995.
- ✓ Sun H., Leblanc N., Nattel S. Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes. *Am. J. Physiol.* 272: H1625-1635, 1997.
- ✓ Sutko J. L., Airey J. A., Welch W., Ruest L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol. Rev.* 49: 53-98, 1997.
- ✓ Sutko J.L., Bers D.M., Reeves J.P. Postrest inotropy in rabbit ventricle: Na⁺-Ca²⁺ exchange determines sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content. *Am. J. Physiol.* 250:H654-H661, 1986.
- ✓ Szewczyk A., Kajma A., Malinska D., Wrzosek A., Bednarczyk P., Zabłocka B., Dołowy K. Pharmacology of mitochondrial potassium channels: dark side of the field. *FEBS Lett.* 584:2063-2069, 2010.
- ✓ Szewczyk A., Skalska J., Glab M., Kulawiak B., Malinska D., Koszela I., Kunz W.S. Mitochondrial potassium channels: from pharmacology to function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757:715-720, 2006.
- ✓ Taberner A. J., Han J. C., Loiselle D. S., Nielsen P. M. An innovative work-loop calorimeter for in vitro measurement of the mechanics and energetics of working cardiac trabeculae. *J Appl Physiol.* 111: 1798-803, 2011.
- ✓ Tada M., Inui M. Regulation of calcium transport by the ATPase-phospholamban system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15:565-575, 1983.

- ✓ Takagishi Y., Yasui K., Severs N. J., Murata Y. Species-specific difference in distribution of voltage-gated L-type Ca(2+) channels of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: C1963-9, 2000.
- ✓ Tanaka H., Namekata I., Nouchi H., Shigenobu K., Kawanishi T., Takahara A. New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: diversity in the excitation-contraction mechanisms of the heart. *J. Pharmacol. Sci.* 109:327-33, 2009.
- ✓ Tani M. Mechanisms of Ca²⁺ overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu. Rev. Physiol.* 52:543–559, 1990.
- ✓ Tappia P. S., Dent M. R., Aroutiounova N., Babick A. P., Weiler H. Gender differences in the modulation of cardiac gene expression by dietary conjugated linoleic acid isomers. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85: 465–475, 2007.
- ✓ Terracciano C. M., MacLeod K. T. Measurements of Ca²⁺ entry and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content during the cardiac cycle in guinea pig and rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 72: 1319-26, 1997.
- ✓ Thastrup O., Cullen P. J., Drøbak B. .K, Hanley M. R., Dawson A. P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2466-70, 1990.
- ✓ Theroux P., Ross J. Jr, Franklin D., Kemper W. S., Sasayama S. Coronary arterial reperfusion. III. Early and late effects on regional myocardial function and dimensions in conscious dogs. *Am. J. Cardiol.* 38: 599-606, 1976.
- ✓ Tissier, R., Waintraub, X., Ciuvreur, N., Gervais, M., Bruneval, P., Mandet, C., Zini,R., Enriquez, B., Berdeaux, A., Ghaleh, B. Pharmacological postconditioning with the phytoestrogen genistein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 42, 79-87, 2007.
- ✓ Trollinger D.R., Cascio W.E., Lemasters J.J. Selective loading of Rhod-2 into mitochondria shows mitochondrial Ca²⁺ transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:554-559, 1997.
- ✓ Tsang S., Wong S.S., Wu S., Kravtsov G.M., Wong T.M., Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptorstimulation are associated with increased activities of ryr, serca, and ncx inthe heart . *American Journal of Physiology – Cell Physiology.* 296: C766–C782, 2009.
- ✓ Tsien R.Y., Zucker R.S. Control of cytoplasmic calcium with photolabile tetracarboxylate-2-nitrobenzhydrol chelators. *Biophys. J.* 50:843-853, 1986.

- ✓ Valverde C. A., Kornyejev D., Ferreiro M., Petrosky A. D., Mattiazzi A., y Escobar A. L. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovascular Research*. 85, 671–680, 2010.
- ✓ Valverde C.A., Mundiña-Weilenmann C., Reyes M., Kranias E.G., Escobar A.L., Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca²⁺ after perfusion arrest in isolated perfused mouse heart. *Cardiovascular Research*. 70:335-345, 2006.
- ✓ Varadarajan S.G., An J., Novalija E., Smart S.C., Stowe D.F. Changes in [Na⁺]_i, compartmental [Ca²⁺]_i, and NADH with dysfunction after global ischemia in intact hearts. *Am. J. Physiol*, 280: H280–293, 2001.
- ✓ Vittone L., Mundiña-Weilenmann C., Said M., Ferrero P., Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 34:39-50, 2002.
- ✓ Vizgirda V. M., Wahler G. M., Sondgeroth K. L., Ziolo M. T., Schwertz D. W. Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 282: H256–H263, 2002.
- ✓ Voss, M. R., Stallone, J. N., Li, M., Cornelussen, R. N. M., Kneuferrmann, P., y Knowlton, A. A. Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 285, H687–H692, 2003.
- ✓ Wang. B., Tanaka K., Morita A., Ninomiya Y., Maruyama K., Fujita K., Hosoi Y. y Neno M., Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *Journal of Radiation Research*. 54: 620–629, 2013.
- ✓ Wang M., Tsai B.M., Kher A., Baker L.B., Wairiuko G.M., Meldrum D.R., Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia–reperfusion. *American Journal of Physiology –Heart and Circulatory Physiology*. 288: H221–H226, 2005.
- ✓ Wang S.Y., Winkler L., Langer G.A. Role of calcium current and sarcoplasmic reticulum calcium release in control of myocardial contraction in rat and rabbit myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 25:1339-1347, 1993.
- ✓ Wasserstrom J. A., Kapur S., Jones S., Faruque T., Sharma R., Kelly J. E., Pappas A., Ho W., Kadish A. H., Aistrup G. L. Characteristics of intracellular Ca²⁺ cycling in intact rat heart: a comparison of sex differences. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 295: H1895–H1904, 2008.
- ✓ Wattanapernpool J. Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats, *Life Sciences*. 63: 955–964, 1998.

- ✓ Wattanapermpool J., Riabroy T., Preawnim S. Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. *Life Sciences* 66: 533–543, 2000.
- ✓ Watts, S. W., Yeum, C. H., Campbell, G., y Webb, R. C. Serotonin stimulates protein tyrosyl phosphorylation and vascular contraction via tyrosine kinase. *J. Vasc. Res.* 33: 288-298, 1996.
- ✓ Wehrens X. H., Lehnart S. E., Reiken S., Vest J. A., Wronska A., Marks A. R. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 511-8, 2006.
- ✓ Weiss J.N., Kirge P., Honda H.M, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ. Res.* 93:292-301, 2003.
- ✓ Weiss J.N., Lamp S.T. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J. Gen. Physiol.* 94:911-935, 1989.
- ✓ Wendt I.R., Loiselle D.S. The effects of external calcium concentration on activation heat on cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13(Suppl 3):8P, 1981.
- ✓ Wier W. G. Calcium transients during excitation-contraction coupling in mammalian heart: aequorin signals of canine Purkinje fibers. *Science.* 207: 1085-7, 1980..
- ✓ Williams G. S.B., Boyman L.W. Lederer J. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 78: 35–45, 2015.
- ✓ Wolska B.M., Lewartowski B. Calcium in the in situ mitochondria of rested and stimulated myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23:217-226, 1991.
- ✓ Wu Q.Y., Feher J.J. Ryanodine perfusion decreases cardiac mechanical function without affecting homogenate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake: comparison with the stunned heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:943-955, 1996.
- ✓ Wu Q., Zhao Z., Sun H., Zhang Y., Hao Y. L., Sun Y. W. The cardioprotection of estrogen on solated global myocardial ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 25: 355-60, 2009.
- ✓ Yan Y., Liu J., Wei C., Li K., Xie W., Wang Y., Cheng H. Bidirectional regulation of Ca²⁺ sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 77: 432-41, 2008.
- ✓ Yaras N., Tuncay E., Purali N., Sahinoglu B., Vassort G., Turan B. Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3584–H3592, 2007.

- ✓ Yokoshiki, H., Sumii, K., Sperelakis, N. Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog, daidzein. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28: 807-14, 1996.
- ✓ Zalk R., Lehnart S. E., Marks A. R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 367-85, 2007.
- ✓ Zhai P., Eurell T. E., Cotthaus R., Jeffery E. H., Bahr J. M., Gross D. R. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H2766-75, 2000.
- ✓ Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Ding H.L., Zhou Z.N. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Life Sci.* 73:1275-87, 2003.

Zot A.S., Potter J.D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 16:535-550, 1987. Citado por: Thompson R.B., Warber K.D., Potter J.D. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York, 1990.