



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**TERAPIA COMBINADA CON CONDICIONAMIENTO
ISQUÉMICO REMOTO Y TRATAMIENTO METABÓLICO
PARA LA PREVENCIÓN DEL DAÑO POR
REPERFUSIÓN. MECANISMOS IMPLICADOS**

Tesis presentada por Juan José Alburquerque Béjar para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesis doctoral realizada en el Laboratorio de Patología Cardiocirculatoria del Hospital Universitari Vall d'Hebron e Institut de Recerca bajo la dirección del Dr. David García-Dorado y del Dr. Antonio Rodríguez Sinovas.

Tesis adscrita al Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, programa de Doctorado en Medicina.

El doctorando,

Juan José Alburquerque Béjar

Director de la tesis,

Dr. David García-Dorado

Director de la tesis,

Dr. Antonio Rodríguez Sinovas

Barcelona, 2016

AGRADECIMIENTOS

Unos cuantos párrafos no son suficientes para expresar lo afortunado que me siento al haber tenido la oportunidad de desarrollar esta tesis doctoral. Soy consciente de la suerte de haber podido trabajar durante estos años en algo que me apasionaba, la ciencia, teniendo en cuenta la situación de crisis económica y social que atravesamos en los últimos tiempos.

Si a alguien he de agradecerle gran parte de este trabajo es al Dr. Antonio Rodríguez Sinovas, co-director de esta tesis. Gracias por confiar en mí y por concederme la oportunidad de comenzar con vosotros este proyecto que hoy por fin se materializa. Por tu gran paciencia conmigo, por enseñarme técnicas de laboratorio que desconocía, por explicarme todo aquello que tantas veces no he comprendido bien, y por ser tan cercano.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. David García-Dorado, director del Servicio de Cardiología y co-director también de esta tesis. Gracias por haberme recibido en vuestro grupo de investigación, por tu confianza y por tus consejos e ideas orientando la parte experimental y dirección científica de este trabajo.

Una mención especial merecen Ignasi Barba y Elisabet Miró, ya que ambos han empleado gran parte de su tiempo en explicarme la teoría, y en colaborar en el desarrollo de los experimentos que aquí han quedado recogidos, tanto en resonancia magnética nuclear como en función mitocondrial, respectivamente.

A todos mis compañeros de laboratorio (tanto a los que están ahora como a los que ya no), bien sean predoctorales, doctores, técnicos, o Investigadores Principales, pues todos ellos han creado un agradable clima en el grupo y han hecho que sea una suerte trabajar aquí. A Úrsula Vildosa, José Castellano, Celia Fernández, Marcos Poncelas, Paula Rudenick, Víctor Hernando, Amanda Denuc, Úrsula Gimeno, Mireia Llobet, Mireia Andrés, Ángeles Rojas, David Aluja, Marta Minguet, Sara Sansaloni, Laura Ramos, Giuliana Ríos, Teresa Fernández, Ángeles Carmona, Javier Inserte, Marisol Ruiz. Gracias a todos, en especial a Laura Valls, por su simpatía, humildad y compañerismo, gracias por toda la ayuda que siempre me has ofrecido. *Et desitjo molta sort en el camí cap a la teva pròpia tesi.*

De enorme valía ha sido también la colaboración y los consejos del personal del estabulario del VHIR en los experimentos con cerdos, así como sus cuidados a estos animales. Muchas gracias a Carla, Marielle, Ángel y Albert.

No puedo pasar sin mencionar a la Dra. Marta Agudo, quien encendió en mí la curiosidad por la investigación, y de la misma forma a Francisco Nadal (gracias por tu tiempo y por enseñarme todo con tu infinita paciencia), Arturo Ortín, Leticia Nieto, Manuel Jiménez, Caridad Galindo, y todo el equipo del laboratorio de Oftalmología Experimental del Profesor D. Manuel Vidal, en la Universidad de Murcia, con quienes realicé un Máster que me llevaría finalmente a seguir el doctorado en la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Mis amigos han sido un apoyo muy importante en esta etapa que comenzó al separarme (sólo) geográficamente de ellos. Gracias a todos: a los nuevos (y agradecer especialmente el diseño de cubierta de Adrián Paczka), a los de toda la vida y a los también biólogos, pues han sido en muchas ocasiones el motor que me ha animado a no rendirme nunca.

A todos aquellos animales que hay tras la “n”.

A Barcelona, por el descubrimiento. A Murcia, por el reencuentro.

Y a los más importantes, aquellos sin que nada de esto hubiera sido posible, a mi hermano Javi y a mis padres Ana Rosa y Tomás, por haber hecho de mí quien soy. Por todo el esfuerzo, por todos los ánimos, por todo el cariño, por todo. Desde la lejanía, pero ante el mismo mar. GRACIAS.

A ti,

*“La primera obligación de un ser vivo es la de ser feliz,
la felicidad, esa rosa sin causa”.*

(Antonio Gala)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1 Mecanismos celulares y consecuencias del daño miocárdico por isquemia-reperusión | 17 |
| 1.1 La condición isquémica..... | 17 |
| 1.2 La reperusión..... | 18 |
| 1.3 Consecuencias del daño por isquemia-reperusión..... | 22 |
| 2 Estrategias terapéuticas farmacológicas frente al daño por reperusión | 25 |
| 2.1 Interferencia con la recuperación del ph intracelular durante la reperusión ... | 25 |
| 2.2 Reducción de la sobrecarga de calcio citosólica durante la reperusión..... | 27 |
| 2.3 Reducción de las oscilaciones citoplasmáticas de calcio mediante modulación de la función del retículo endoplasmático | 29 |
| 2.4 Inhibidores contráctiles | 30 |
| 2.5 Inhibidores de proteasas..... | 30 |
| 2.6 Inhibidores de los canales de Cx43 | 31 |
| 2.7 Inhibidores de la apertura del mPTP..... | 33 |
| 2.8 Antioxidantes | 34 |
| 2.9 Beta-bloqueantes..... | 36 |
| 2.10 Activación farmacológica de las vías endógenas de cardioprotección | 37 |
| 3 Modulación del metabolismo cardíaco como estrategia protectora frente al daño por reperusión | 43 |
| 3.1 Glucosa-insulina-potasio (GIK) | 43 |
| 3.2 Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) | 47 |
| 3.3 Otras moléculas de interés como moduladoras del metabolismo energético miocárdico | 50 |
| 4 Mecanismos endógenos de protección..... | 53 |
| 4.1 Precondicionamiento isquémico..... | 53 |
| 4.2 Postcondicionamiento isquémico..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 Condicionamiento isquémico remoto | 59 |
| 5 Dificultades en la traslación de los tratamientos cardioprotectores a pacientes con SCAEST y posibles soluciones | 65 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 69 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 73 |
| 1 Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperusión en un modelo de corazón porcino <i>in situ</i> | 75 |
| 1.1 Animales e instrumentación | 75 |
| 1.4 Función regional del ventrículo izquierdo | 77 |
| 1.5 Protocolos experimentales | 78 |
| 1.6 Análisis de la incidencia de arritmias ventriculares malignas | 80 |
| 1.7 Determinación del área en riesgo y del tamaño del infarto | 80 |
| 1.8 Estadística | 80 |
| 2 Mecanismos implicados en la protección por RIC, GIK o exenatida, y por la terapia combinada, sobre el daño por isquemia-reperusión | 83 |
| 2.1 Animales e instrumentación | 83 |
| 2.2 Protocolos experimentales | 83 |
| 2.3 Análisis del metabolismo miocárdico | 83 |
| 2.4 Estudio del grado de activación de vías de señalización citosólicas cardioprotectoras | 85 |
| 2.5 Análisis de la respiración mitocondrial | 87 |
| 2.6 Estadística | 88 |
| 3 Estudio de los mecanismos humorales implicados en la protección por condicionamiento isquémico remoto | 89 |
| 3.1 Protocolo de RIC en modelo porcino | 89 |
| 3.2 Obtención de dializados plasmáticos | 90 |
| 3.3 Análisis del dializado plasmático mediante ¹ H-RMN | 90 |
| 3.4 Modelo de condicionamiento remoto en corazón aislado de ratón utilizando dializados plasmáticos porcinos | 91 |
| 3.5 Protocolos experimentales | 94 |

| | |
|--|------------|
| 3.6 Estadística | 97 |
| RESULTADOS | 99 |
| 1 Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de corazón porcino <i>in situ</i> | 101 |
| 1.1 Variables hemodinámicas | 101 |
| 1.2 Flujo sanguíneo en la arteria coronaria DA..... | 105 |
| 1.3 Función regional del miocardio | 106 |
| 1.4 Tamaño del infarto | 108 |
| 1.5 Arritmias ventriculares durante la isquemia-reperfusión miocárdica | 111 |
| 2 Mecanismos implicados en la protección por RIC, GIK o exenatida, y por la terapia combinada, sobre el daño por isquemia-reperfusión | 115 |
| 2.1 Concentración de glucosa en sangre | 115 |
| 2.2 Metabolismo miocárdico | 115 |
| 2.3 Activación de vías citosólicas de señalización | 118 |
| 2.4 Expresión de eNOS | 121 |
| 2.5 Expresión de Cx43..... | 123 |
| 2.6 Respiración mitocondrial..... | 124 |
| 2.7 Niveles de nitrotirosina en miocardio..... | 124 |
| 3 Estudio de los mecanismos humorales implicados en la protección por condicionamiento isquémico remoto | 125 |
| 3.1 Espectroscopía de ¹ H-RMN de dializados plasmáticos | 125 |
| 3.2 Efectos del plasma post-RIC sobre el daño por isquemia-reperfusión en corazones aislados de ratón | 127 |
| 3.3 Influencia del bloqueo de los receptores de glicina sobre el efecto protector del pretratamiento con plasma post-RIC en corazones aislados de ratón..... | 131 |
| 3.4 Efecto del pretratamiento con succinato sobre el daño por isquemia-reperfusión en corazones aislados de ratón..... | 132 |
| DISCUSIÓN | 135 |
| 1 Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de corazón porcino <i>in situ</i> | 137 |

| | |
|--|------------|
| 1.1 La terapia combinada es superior a las individuales limitando el tamaño del infarto | 137 |
| 1.2 La terapia combinada es superior a las individuales reduciendo la incidencia de arritmias ventriculares durante la reperfusión..... | 138 |
| 1.3 GIK y exenatida tienen efectos similares sobre el metabolismo del miocardio | 139 |
| 1.4 GIK señala a través de Akt y STAT3 | 139 |
| 1.5 RIC, pero no GIK ni exenatida, reduce notablemente el nivel de nitrotirosinación proteica en el tejido miocárdico..... | 141 |
| 1.6 Fosforilación de la Cx43 miocárdica | 143 |
| 1.7 Limitaciones del estudio..... | 143 |
| 2 Mecanismos humorales del condicionamiento isquémico remoto | 145 |
| 2.1 Los dializados plasmáticos porcinos post-RIC son metabólicamente distintos a los basales..... | 145 |
| 2.2 El dializado plasmático porcino obtenido tras la maniobra de RIC reduce el tamaño del infarto en corazones aislados de ratón cuando se administra previamente a la isquemia, pero no al inicio de la reperfusión | 146 |
| 2.3 Mecanismos humorales implicados en la cardioprotección por pretratamiento con dializados plasmáticos post-RIC | 147 |
| 2.4 Limitaciones del estudio..... | 148 |
| RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES..... | 151 |
| Resumen de resultados | 153 |
| Conclusiones..... | 155 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 157 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| Akt | PKB, Proteína quinasa B |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| ATP | Adenosín 5'-trifosfato |
| AR | Área en riesgo |
| BH₄ | Tetrahidrobiopterina |
| Cx43 | Conexina 43 |
| DA | Descendente Anterior (arteria coronaria) |
| dP/dt | Derivada de la presión en función del tiempo |
| ECG | Electrocardiograma |
| eNOS | Óxido nítrico sintasa endotelial |
| ERK ½ | <i>Extracellular signal-regulated kinase-1/2</i> |
| FV | Fibrilación ventricular |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| GIK | Glucosa-Insulina-Potasio |
| GLP-1 | Péptido similar al glucagón tipo 1 |
| GMPc | Guanosín monofosfato cíclico |
| GSK3β | <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> |
| IM | Intramuscular |
| IPC | Precondicionamiento isquémico |
| IpoC | Postcondicionamiento isquémico |
| IP | Intraperitoneal |
| IV | Intravenoso |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| MANOVA | ANOVA de medidas repetidas |
| mPTP | Poros de transición mitocondrial |
| NO | Óxido nítrico |
| ONOO⁻ | Peroxinitrito |
| OxPhos CII | Succinato-ubiquinol oxidoreductasa (Complejo II) |
| PA | Presión arterial |
| PCA | Análisis de Componentes Principales |
| PI3K | Fosfoinositol-3 quinasa |
| PKG | Proteína quinasa G |
| PVI | Presión del ventrículo izquierdo |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| RIC | Condicionamiento isquémico remoto |
| RISK | <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> |
| SAFE | <i>Survivor Activation Factor Enhancement</i> |
| SCAEST | Síndrome Coronario Agudo con Elevación del segmento ST |
| SEM | Error estándar de la media |
| STAT3 | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| TSP | Ácido 3-(trimetilsilil) tetrauterio-propiónico |
| TV | Taquicardia ventricular |
| VI | Ventrículo izquierdo |

INTRODUCCIÓN

La principal causa de muerte y discapacidad tanto en nuestro país (Genova-Maleras et al., 2012) como a nivel mundial (Moran et al., 2014) son las enfermedades cardiovasculares, siendo especialmente relevante el papel jugado por la cardiopatía isquémica. En la mayoría de los casos, el proceso subyacente a esta última es la aterosclerosis, un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares, y que se caracteriza por el engrosamiento de las capas íntimas y media de los vasos afectados y por la pérdida de elasticidad de los mismos. La aterosclerosis es una patología compleja que ocurre en las paredes arteriales, donde se depositan ácidos grasos y colesterol, y que, junto a la formación de tejido fibroso y al acúmulo de células inflamatorias, acaban formando placas, que estrechan el lumen de los vasos, y dificultan, por tanto, el flujo sanguíneo a su través. La pared de estas placas puede acabar erosionándose o rompiéndose, lo cual provoca la activación de la cascada de coagulación y la formación de un trombo, que puede ocluir completamente la circulación sanguínea en la arteria afectada, dando lugar, en el caso de las arterias coronarias, a la aparición de isquemia miocárdica e infarto (Mendis et al., 2011).

La arteria coronaria afectada puede, por tanto, verse estenosada parcial o completamente, dando lugar a la aparición de isquemia en el tejido miocárdico por la reducción del flujo sanguíneo coronario, al desarrollo de infarto agudo de miocardio y a la aparición posterior de remodelado ventricular adverso (Gajarsa and Kloner, 2011; Libby, 2013).

Existe una relación directa entre la duración del insulto isquémico y la extensión de la muerte celular (Reimer et al., 1977). Además, la dimensión final del infarto también depende del tamaño del territorio distal a la placa coronaria responsable (el área en riesgo), y de la presencia y magnitud de flujo residual, en forma de oclusión parcial, irrigación colateral o ambas (García-Dorado et al., 1987a). Por tanto, el tratamiento de elección para limitar el volumen de miocardio infartado es realizar la reperfusión lo más rápidamente posible (Downey and Cohen, 2006), disminuyéndose la cantidad de tejido que es posible salvar a medida que se retrasa el momento de la reperfusión, y siendo muy baja a partir de las tres horas de isquemia (Hausenloy et al., 2013a). En este sentido, hay que remarcar que los beneficios de la reperfusión temprana no se limitan a la fase aguda, reduciendo el tamaño del infarto y mejorando la supervivencia hospitalaria, sino que se extienden a largo plazo, mejorando la esperanza de vida de los pacientes hasta 20 años después de la intervención (van Domburg et al., 2005).

Se ha constatado que cuando la reperfusión se realiza durante este intervalo de tiempo prudencial (en el que todavía es posible salvar parte del miocardio sometido a isquemia), la muerte celular ocurre predominantemente durante los primeros minutos después de la restauración del flujo sanguíneo,

INTRODUCCIÓN

en forma de necrosis, y es causada por mecanismos desencadenados durante la reperfusión (Piper et al., 1998). Este daño, adicional al producido por el propio período de isquemia, se denomina daño letal por reperfusión, y su existencia ofrece la posibilidad de añadir, a la restauración del flujo, tratamientos capaces de reducir la tasa de muerte celular. Por ello, el desarrollo de terapias eficaces y clínicamente aplicables para la prevención de la muerte celular por reperfusión constituye un objetivo prioritario en la lucha para disminuir el impacto social y sanitario de la cardiopatía isquémica (Rodríguez-Sinovas et al., 2007a).

Por otra parte, cabe mencionar que la elevada mortalidad que produce la cardiopatía isquémica no es responsable, por sí sola, del alto impacto social y sanitario que representa esta enfermedad, sino que, además, esta patología se asocia a una pérdida importante de la calidad de vida (en parte debida a las comorbilidades cardiovasculares), y a un elevado coste económico (más de 60 billones de euros al año en la Unión Europea) (Frohlich et al., 2013). Además, como agravante de esta situación, se estima que la cardiopatía isquémica seguirá siendo la primera en la lista de enfermedades mortales en el mundo hasta al menos el año 2030 (Mathers and Loncar, 2006). Esta tesis pretende aportar nuevo conocimiento sobre la fisiopatología y tratamiento de esta enfermedad, así como identificar posibles nuevas dianas terapéuticas para reducir el tamaño del infarto, mejorar la función sistólica del ventrículo izquierdo y aumentar la supervivencia y la calidad de vida en pacientes con cardiopatía isquémica.

1 Mecanismos celulares y consecuencias del daño miocárdico por isquemia-reperfusión

El término “daño letal por reperfusión” hace referencia explícita a la muerte celular que se produce en el momento de la reperfusión, tras una isquemia transitoria, y que se puede prevenir mediante intervenciones aplicadas en el momento de la restauración del flujo (Fig. 1) (Piper et al., 1998). Está caracterizado por una serie de cambios fisiopatológicos en el cardiomiocito, que dan lugar a los procesos biológicos causantes de la necrosis. A día de hoy, las vías moleculares y procesos celulares por los que se rige esta muerte necrótica no están del todo esclarecidos, pero diversos estudios apoyan la existencia de dos mecanismos principales interconectados: el desarrollo de hipercontractura y la apertura del poro de transición de mitocondrial (mPTP) (Piper et al., 1998; García-Dorado et al., 2014b). Ambos procesos se desencadenan tras las alteraciones fisiopatológicas provocadas inicialmente por la isquemia, y que ocurren previamente a la reperfusión, como la caída del pH, la privación energética, o la pérdida de la homeostasis catiónica.

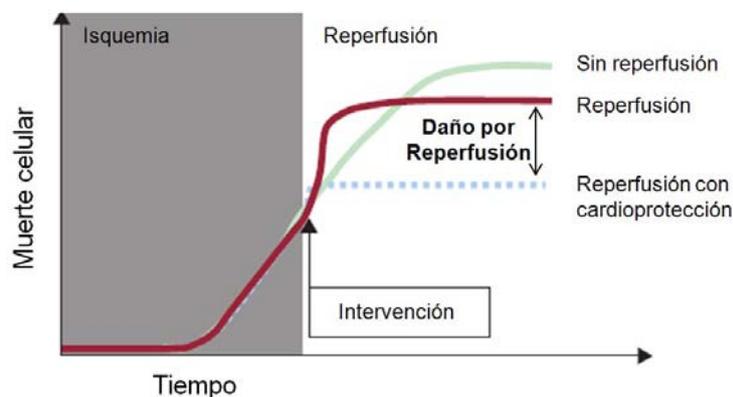


Figura 1. Ilustración del concepto de daño por reperfusión. La muerte celular aumenta de forma proporcional a la duración de la isquemia miocárdica. La reperfusión detiene este proceso, pero se asocia a su vez a un daño adicional producido en los primeros minutos de la misma. Tratamientos aplicados en el inicio de la restauración del flujo, pueden hacer disminuir esta muerte. Modificado de (García-Dorado and Piper, 2006; García-Dorado et al., 2014b).

1.1 LA CONDICIÓN ISQUÉMICA

La privación del flujo sanguíneo que habitualmente llega al tejido, es decir, la situación de isquemia, conlleva grandes desequilibrios iónicos que tienen relación con la disminución del oxígeno disponible. La carencia de oxígeno, que habitualmente es fundamental para el mantenimiento de la producción energética en forma de adenosín 5'-trifosfato (ATP) a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, conduce a una mayor

INTRODUCCIÓN

utilización del metabolismo anaerobio, concretamente de la vía glucolítica, para intentar mantener así la síntesis de ATP. En consecuencia, se produce, por un lado, acumulación intracelular de ácido láctico, y por otro, de CO₂ extracelular (que no puede ser eliminado al no haber flujo sanguíneo), conduciendo, por tanto, a acidosis tisular (Piper et al., 2004; Insete et al., 2008; Perricone and Vander Heide, 2014; García-Dorado et al., 2014b). Con respecto a los niveles de ATP, seguirán descendiendo hasta alcanzar niveles críticos, lo que provocará la aparición del rigor isquémico (Bowers et al., 1992).

La acidosis intracelular desencadena la extrusión de H⁺ desde el interior de la célula a través del intercambiador Na⁺/H⁺ sarcolemal, causando, a su vez, una entrada masiva de Na⁺ al citosol. Además, el agotamiento de las reservas de ATP provoca el cese del funcionamiento de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, agravando aún más la sobrecarga citosólica de Na⁺ (Murphy and Steenbergen, 2008). El acumulo progresivo de Na⁺ activa el funcionamiento reverso del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal, extrayendo Na⁺ a costa de introducir Ca²⁺, iniciándose así una paulatina pérdida de la homeostasis de este catión, que, en condiciones fisiológicas, está estrictamente regulado (Piper et al., 1998; Piper et al., 2004). Como además las ATPasas de Calcio del Retículo Sarcoplasmático (la familia de proteínas SERCA) son dependientes de energía, no podrán captar el Ca²⁺ para retirarlo desde el sarcoplasma al interior del retículo. Como consecuencia, al final del episodio isquémico, los cardiomiocitos presentan un pH ácido, y sobrecarga de Na⁺ y Ca²⁺.

1.2 LA REPERFUSIÓN

Si el periodo de depleción energética no ha sido demasiado prolongado, el suministro de oxígeno durante los primeros minutos de la reperfusión es capaz de repolarizar las mitocondrias de una gran parte de los cardiomiocitos y de reactivar la síntesis de ATP (Piper et al., 1998; García-Dorado et al., 2014b). Sin embargo, este hecho, unido a las alteraciones iónicas que se iniciaron durante la fase de isquemia, puede acabar desencadenando la muerte celular, bien sea mediante el desarrollo de hipercontractura, o mediante la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP).

1.2.1 El desarrollo de la hipercontractura

La hipercontractura se puede definir como la activación desmesurada del aparato contráctil que se da en los primeros minutos de la reperfusión, y que produce un brusco acortamiento de los cardiomiocitos. Ello conduce a un aumento de la tensión mecánica debido a las interacciones entre los cardiomiocitos adyacentes, pudiendo llegar a romperse el sarcolema de las células afectadas, y provocando la muerte de las mismas, dando lugar a un

patrón histológico conocido como necrosis en bandas de contracción (Ganote, 1983; Miyazaki et al., 1987; García-Dorado et al., 1992a).

Los mecanismos responsables de la rotura del sarcolema por la aparición de hipercontractura son complejos y aun se desconocen con exactitud, pero al menos hay tres componentes principales implicados: alteraciones en la homeostasis iónica, edema intracelular y fragilidad celular. Estos factores, junto a la propagación del daño entre células adyacentes, explican, en gran medida, el tamaño final del infarto.

1.2.1.1 Reenergización celular durante la reoxigenación, alteraciones en la homeostasis iónica y normalización del pH intracelular

El restablecimiento del aporte de oxígeno a los cardiomiocitos supervivientes al episodio isquémico permite la reactivación de la síntesis de ATP por parte de la mitocondria. Además, y simultáneamente a la recuperación energética, el retorno del flujo sanguíneo produce un rápido lavado de los catabolitos depositados en el exterior de la célula, incluyendo el lactato y H^+ , con lo que se crea un brusco gradiente de pH entre los espacios intra- y extracelular. Esta situación la célula la intenta resolver mediante la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del cotransportador Na^+/HCO_3^- , que tratan de normalizar el pH intracelular. Sin embargo, la actividad de ambos transportadores de membrana empeora la sobrecarga de Na^+ intracelular (van Borren et al., 2004). Este exceso de Na^+ es de difícil extrusión por parte de la $ATPase Na^+/K^+$ sarcolemal, pues, a pesar de que ya hay energía para su funcionamiento, su estructura de anclaje a la membrana y su función han quedado dañadas por la activación de calpaínas dependientes de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión (Inserte et al., 2005). El resultado es la activación, en su modo reverso, del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Inserte et al., 2002), incrementando así la sobrecarga citosólica de Ca^{2+} que se inició durante la fase de isquemia.

La recuperación energética, por otro lado, provoca que la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) reanude su actividad. SERCA intentará retirar la sobrecarga de Ca^{2+} citosólica hacia el retículo endoplásmico (Siegmund et al., 1992). Sin embargo, la capacidad del mismo queda rápidamente saturada, lo cual llevará a un proceso de liberación de Ca^{2+} a través del receptor de rianodina. La repetición cíclica de procesos de captación y liberación de Ca^{2+} por parte del retículo llevará a oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Piper et al., 2006).

La rápida corrección del pH intracelular tiene, además, un efecto perjudicial añadido, debido a que la acidosis desempeña un papel potencialmente protector. Así, la acidosis inhibe la maquinaria contráctil miofibrilar, modificando la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos (Marban and Kusuoka, 1987). Su rápida recuperación durante el inicio de la reperfusión

elimina este factor protector, permitiendo que las oscilaciones de Ca^{2+} que ocurren durante esta fase, en presencia de ATP, acaben provocando la activación contráctil excesiva del cardiomiocito. Por otro lado, la acidosis reduce también la actividad del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Chen and Li, 2012), con lo que durante la reperfusión se facilitaría su actividad, aumentando, con ello, la sobrecarga de calcio durante esta fase.

Además de contribuir al desarrollo de la hipercontractura, las oscilaciones de Ca^{2+} pueden desencadenar a su vez oscilaciones en el potencial transmembrana celular, en forma de posdespolarizaciones tempranas o tardías, las cuales se asocian a la génesis de las arritmias por reperfusión (Priori et al., 1990).

1.2.1.2 Normalización de la osmolaridad tisular

El retorno del flujo sanguíneo durante la reperfusión provoca que el exceso de los catabolitos procedentes del metabolismo anaerobio, acumulados en el espacio extracelular durante la isquemia, sea rápidamente lavado, generándose un gradiente osmótico transsarcolemal. Este gradiente, junto a la alta concentración de Na^+ intracelular, va a favorecer la entrada de agua hacia el citoplasma, provocando edema celular (García-Dorado et al., 1992b; Piper et al., 1998). Todo ello desencadenará un aumento en el volumen de la célula, y por tanto de la presión osmótica, que contribuirá al aumento del estrés mecánico causante de la rotura sarcolemal.

1.2.1.3 Incremento de la fragilidad del citoesqueleto

El aumento del volumen celular y la hipercontractura, que causan el estrés mecánico que puede conducir a la rotura del sarcolema, ocurren, además, en una situación en la que se produce un incremento en la fragilidad de estructuras celulares como el citoesqueleto. En este aumento de la fragilidad celular juegan un papel muy importante las calpaínas, una familia de cisteín proteasas no lisosomales dependientes del Ca^{2+} . Su activación durante la reperfusión, debida a la sobrecarga de este catión, genera una importante degradación de proteínas del citoesqueleto (Zhang et al., 2006b; Inserte et al., 2012; Neuhof and Neuhof, 2014), que favorece, junto a los factores mencionados anteriormente, que se produzca la pérdida de la integridad celular (Ruiz-Meana et al., 1995).

1.2.1.4 Propagación del daño celular a través de las “gap junctions”

Las uniones tipo gap (“gap junctions”) son áreas especializadas de la membrana plasmática, formadas por canales que conectan el citoplasma de dos células contiguas (Herve and Derangeon, 2013). Estos canales están formados por una familia de proteínas transmembrana denominadas conexinas

(Rodríguez-Sinovas et al., 2007b), siendo la conexina 43 (Cx43) la isoforma predominante en el miocardio. Seis monómeros de conexina forman un hemicanal en la membrana plasmática de un cardiomiocito, y la interacción entre los dominios extracelulares de dos hemicanales provenientes de células adyacentes constituyen un canal intercelular.

En los cardiomiocitos, estas uniones aparecen como placas conteniendo miles de canales. Estas placas se hallan típicamente en los discos intercalares, situados en los extremos celulares (Revel and Karnovsky, 1967; Severs, 1990), siendo su principal función la de transmitir correctamente el impulso eléctrico, permitiendo la contracción coordinada del órgano (Severs et al., 2004; Dhillon et al., 2013). Su importancia en la propagación del impulso eléctrico ha quedado demostrada mediante estudios experimentales en los que se ha observado que la reducción de la expresión de Cx43 en modelos transgénicos se asocia a un incremento en la incidencia de arritmias ventriculares, tanto inducibles como espontáneas, en situación de normoxia o de isquemia-reperfusión (Sánchez et al., 2011).

Estudios más recientes permitieron demostrar que la Cx43, y los canales intercelulares que forma, juega un papel fundamental no sólo en el acoplamiento eléctrico, sino también en el químico, permitiendo la propagación del daño por reperfusión entre células adyacentes. Las uniones tipo gap son permeables a metabolitos con un peso molecular inferior a 1500 Da, incluyendo diversos cationes. De hecho, se ha demostrado que los cambios en las concentraciones de Na^+ que ocurren durante la reperfusión, pueden propagarse a las células vecinas (Ruiz-Meana et al., 1999), en las cuales se activaría la forma reversa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, propagándose así el daño por reperfusión (García-Dorado et al., 2004; Rodríguez-Sinovas et al., 2012). Aunque la propagación de los cambios iónicos puede tener lugar también durante los primeros momentos del insulto isquémico (Rodríguez-Sinovas et al., 2006b), parece ser especialmente relevante durante la reperfusión (Rodríguez-Sinovas et al., 2004), ya que la acidosis que ocurre durante la isquemia provoca el cierre de estos canales (Liu et al., 1993).

1.2.2 La apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP)

El mPTP es un canal multiprotéico de alta permeabilidad, poco selectivo (permeable a moléculas <1.5 kDa), localizado en la membrana interna de la mitocondria, cuya composición no ha sido todavía clarificada, y que permite la conexión directa entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana (Halestrap, 2009). En condiciones fisiológicas este canal permanece normalmente cerrado, ya que su apertura disipa el potencial electroquímico de la membrana mitocondrial, detiene la síntesis de ATP por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa e hidroliza el ATP presente, y causa edema y rotura mitocondrial, facilitando que se liberen al citosol

elementos mitocondriales, como citocromo C o el propio Ca^{2+} (Di Lisa et al., 2001; Weiss et al., 2003; Honda et al., 2005; Halestrap and Richardson, 2015).

La apertura de este canal queda inhibida durante la isquemia pues lo impide la acidosis intracelular (Griffiths and Halestrap, 1995). Por contra, en la reperfusión este poro se abre porque se reúnen multitud de factores favorables a ello (Seidlmayer et al., 2015), tales como la sobrecarga de calcio, la elevada concentración de fosfato, la depleción energética, y el elevado estrés oxidativo por el aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Crompton, 1999; Halestrap et al., 2004). De hecho, durante la reperfusión se produce una producción exagerada de ROS, debida, en parte, a la activación de enzimas citosólicos como la xantina oxidasa, o NADPH oxidasas (Thompson-Gorman and Zweier, 1990; Matsushima et al., 2014). Además de este origen citosólico, los radicales de oxígeno también son generados por la propia actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, principalmente a nivel de los complejos I y III (Chen et al., 2008).

La participación del mPTP en el daño letal por reperfusión ha quedado demostrada en estudios en los que se han utilizado bloqueantes farmacológicos, como la ciclosporina A o la sangliferina A. Se trata de dos drogas que inhiben la apertura del mPTP a través de su unión a ciclofilina D, uno de los componentes de este complejo multiprotéico (Halestrap et al., 1997), y que son capaces de aminorar el daño por reperfusión en diversos modelos animales (Hausenloy et al., 2003; Argaud et al., 2005).

La apertura del mPTP está estrechamente relacionada con el fenómeno de la hipercontractura. Así, las oscilaciones citoplasmáticas de Ca^{2+} favorecen la apertura del mPTP (Ruiz-Meana et al., 2009). Por otro lado, la apertura del mPTP puede provocar liberación de Ca^{2+} hacia el citosol, y por tanto favorecer la aparición de oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} e hipercontractura (Ruiz-Meana et al., 2007; Abdallah et al., 2011). De hecho, parece que el papel relativo de la hipercontractura y la apertura del mPTP en el daño por reperfusión, depende de la duración del episodio isquémico. Así, la hipercontractura desempeñaría un papel más importante tras un episodio de isquemia relativamente breve, mientras que la apertura del mPTP jugaría un papel predominante tras insultos isquémicos prolongados (Ruiz-Meana et al., 2011).

1.3 CONSECUENCIAS DEL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Como hemos mencionado antes, el tratamiento de elección en pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCAEST), es realizar la reperfusión lo más rápidamente posible, con el objeto de salvar el miocardio viable, limitar el tamaño del infarto, preservar la función sistólica del ventrículo izquierdo y prevenir la aparición de la insuficiencia

cardiaca (Hausenloy and Yellon, 2013). Sin embargo, e irremediamente, existe un daño producido por la propia reperfusión que se manifiesta de cuatro formas distintas, siendo algunas reversibles y otras irreversibles (Hausenloy and Yellon, 2013).

1.3.1 Manifestaciones reversibles del daño por reperfusión

1.3.1.1 Arritmias inducidas por la reperfusión

El rápido restablecimiento del flujo coronario en pacientes con SCAEST que son tratados con angioplastia primaria, puede venir acompañado de arritmias ventriculares, que normalmente desaparecen por sí solas o bien son fáciles de tratar (Hearse and Tosaki, 1987).

1.3.1.2 Aturdimiento miocárdico

El aturdimiento hace referencia a la disfunción contráctil transitoria que se produce en el miocardio tras una isquemia aguda. Esta forma de daño procede de los efectos perjudiciales del estrés oxidativo, y de la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular sobre el aparato contráctil del cardiomiocito (Kloner et al., 1998).

1.3.2 Manifestaciones irreversibles del daño por reperfusión

1.3.2.1 Obstrucción microvascular

Este fenómeno se describe como la imposibilidad de reperfundir una región que previamente ha estado en isquemia (Krug et al., 1966). Los factores que están implicados son diversos, e incluyen, entre otros, daño capilar con alteración en la vasodilatación y edema, compresión externa por el aumento de tamaño de células endoteliales y cardiomiocitos, microembolización a partir de material friable que se desprende de la placa aterosclerótica, pequeños trombos formados por plaquetas, y liberación de sustancias trombogénicas y vasomotoras (Luo and Wu, 2006; Ito, 2006; Heusch et al., 2009).

La obstrucción microvascular se asocia con infartos mayores, menores fracciones de eyección del ventrículo izquierdo tras la reperfusión, remodelado adverso y peores resultados clínicos (Hombach et al., 2005). Además, en los casos más severos, el daño producido en el endotelio puede llegar a producir extravasación de sangre hacia el espacio intersticial, lo que provocaría hemorragia miocárdica dentro del área del infarto (Ganame et al., 2009).

1.3.2.2 Daño letal por reperfusión

Se trata de la muerte de los cardiomiocitos inducida por la propia reperfusión, siendo los efectores finales principalmente implicados, como ya hemos comentado, la hipercontractura y la apertura del mPTP (Piper et al., 1998; Yellon and Hausenloy, 2007). Fue la observación de que intervenciones

INTRODUCCIÓN

terapéuticas aplicadas sólo en el inicio de la reperfusión conseguían disminuir hasta en un 50% el tamaño del infarto, lo que demostró la existencia del daño letal por la reperfusión, que se sumaría al causado por la propia isquemia (Piper et al., 1998; Yellon and Hausenloy, 2007).

2 Estrategias terapéuticas farmacológicas frente al daño por reperfusión

Si bien es cierto que los mecanismos causantes del daño celular por reperfusión no son completamente conocidos, las investigaciones desarrolladas hasta el momento han permitido establecer algunas dianas terapéuticas, cuya validez ha sido testada en estudios experimentales. A la luz de los resultados obtenidos a partir de estos estudios, son varios los ensayos clínicos que se han llevado a cabo para averiguar si los efectos cardioprotectores descubiertos pueden traducirse en terapias útiles en humanos (Vander Heide and Steenbergen, 2013). Sin embargo, gran parte de estos ensayos clínicos han dado lugar a resultados negativos o inconsistentes (Rodríguez-Sinovas et al., 2007a). En la actualidad, por tanto, ante un paciente con infarto agudo de miocardio, el tratamiento de elección es realizar la reperfusión a la mayor brevedad posible (Boateng and Sanborn, 2013). Los primeros estudios que demostraron la importancia de la reperfusión temprana (Van de Werf, 2014), se realizaron a principios de los años setenta, en modelos caninos. En ellos se demostró que este procedimiento era capaz de salvar parte del miocardio infartado (Ginks et al., 1972; Maroko et al., 1972a). Más tarde, y pese a ser una cuestión ampliamente debatida en la época (Braunwald and Kloner, 1985), se establecería la existencia de un daño producido por la propia reperfusión, denominado daño letal por reperfusión (Piper et al., 1998).

La identificación de parte de los mecanismos celulares causantes de la muerte celular ha permitido ir conociendo algunas de las dianas terapéuticas sobre las que sería posible incidir, y poner en marcha, por tanto, nuevos estudios con finalidad cardioprotectora, primero en modelos animales y más tarde a través de ensayos clínicos en pacientes (Ibañez et al., 2015). A continuación se resumen las principales estrategias cardioprotectoras investigadas en modelos experimentales, dirigidas contra estas dianas establecidas, así como los principales ensayos clínicos relacionados que se han desarrollado en pacientes.

2.1 INTERFERENCIA CON LA RECUPERACIÓN DEL pH INTRACELULAR DURANTE LA REPERFUSIÓN

La acidosis intracelular producida durante la isquemia inhibe muchos de los mecanismos implicados en el daño por reperfusión, como la contractilidad miofibrilar que causa la hipercontractura dependiente de Ca^{2+} , la formación del mPTP, la activación de las calpaínas y la propagación de la muerte celular a través de las uniones tipo gap (Inserte et al., 2011b). Por dichos motivos, retrasar la recuperación del pH intracelular durante los

INTRODUCCIÓN

primeros momentos de la reperfusión debería tener efectos protectores, disminuyendo la hipercontractura e impidiendo la apertura del mPTP y la activación de las calpaínas. Se han investigado dos aproximaciones distintas para lograr ralentizar la recuperación del pH intracelular hasta valores fisiológicos. Por un lado, utilizando tampones ácidos en el momento de la reperfusión (Qiao et al., 2013), y por otro, prolongando la acidosis mediante el bloqueo del intercambiador sarcolemal Na^+/H^+ (Masereel et al., 2003; Karmazyn, 2013).

Respecto a la primera aproximación, se ha demostrado que la prolongación directa de la acidosis durante el inicio de la reperfusión, utilizando infusiones transitorias de tampones con un pH bajo, es capaz de reducir la muerte celular y el tamaño del infarto en diferentes modelos experimentales, como en cardiomiocitos aislados (Bond et al., 1991; Ruiz-Meana et al., 2004), en preparaciones de corazón aislado (Kaplan et al., 1995; Ruiz-Meana et al., 2004; Inserte et al., 2008) y en modelos de corazón *in situ* (Kitakaze et al., 1997; Rodríguez-Sinovas et al., 2009). Por otro lado, la utilización de inhibidores del transportador Na^+/H^+ , tales como la amilorida, cariporida (HOE642), eniporida (EMD96785) (Scholz et al., 1995; ten Hove et al., 2003; Zhou et al., 2008), sabiporida (Touret et al., 2003), benzamida (BIIB-513) (An et al., 2001) o el SM-20550 (Yamada et al., 2002) permite también retrasar la recuperación del pH durante la reperfusión, así como disminuir la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} (Stromer et al., 2000; An et al., 2001; Portman et al., 2001), efectos asociados a reducciones en el desarrollo de hipercontractura y en la muerte celular durante la reperfusión. Sin embargo, muchos de estos inhibidores parecen ser sólo efectivos cuando se administraban antes de la isquemia, pero no cuando únicamente se dan en el momento de la reperfusión (García-Dorado et al., 1997a; Klein et al., 2000). Concretamente, la cariporida ejerce una potente acción anti-isquémica, retrasando la aparición del rigor isquémico y del desacoplamiento intercelular (García-Dorado et al., 1997a; Ruiz-Meana et al., 2000; Rodríguez-Sinovas et al., 2003), efectos que podrían explicarse por su acción sobre la mitocondria, ya que preserva el gradiente de protones y retrasa el agotamiento del ATP durante la isquemia en cardiomiocitos aislados de ratón (Ruiz-Meana et al., 2003).

Además de su efecto beneficioso sobre el tamaño del infarto, la inhibición del transportador Na^+/H^+ reduce la génesis de arritmias tanto durante la fase de isquemia (Gumina et al., 2000) como durante la reperfusión. Sin embargo, este no parece ser el caso de la infusión de soluciones ácidas. De hecho, en un modelo porcino *in situ* de isquemia transitoria seguida de reperfusión, la infusión de una solución de Krebs ácida durante los primeros minutos de la reinstauración del flujo coronario se asoció con un incremento en

la incidencia de fibrilación ventricular durante la reperfusión (Rodríguez-Sinovas et al., 2009).

La estrategia farmacológica del uso de inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ ha sido ampliamente investigada también en el área clínica. Un pequeño ensayo con 100 pacientes mostró que la cariporida administrada intravenosamente antes de la reperfusión incrementaba la fracción de eyección, resultando, así, beneficiosa contra el daño por isquemia-reperfusión (Rupprecht et al., 2000). Estos resultados dieron pie a ensayos clínicos incluyendo un mayor número de pacientes, como fue el caso del estudio GUARDIAN (n=11590) (también con cariporida) donde, desgraciadamente, no se observaron efectos sobre la incidencia de muerte o infarto a los 36 días de la terapia con trombolisis o con revascularización percutánea (Theroux et al., 2000). No obstante, en un subgrupo de pacientes del estudio GUARDIAN, a los que se les sometió a cirugía de revascularización coronaria, sí que se observó una reducción significativa del riesgo relativo de muerte o infarto cuando les era administrada la dosis más alta (Theroux et al., 2000). Este hecho podría sugerir que el efecto cardioprotector de los inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ ocurría sólo cuando se administraban con anterioridad al evento isquémico (Boyce et al., 2003), tal y como también se había confirmado en los estudios experimentales (Klein et al., 2000; Rodríguez-Sinovas et al., 2003). Otro ejemplo de estudio con falta de eficacia fue el ESCAMI (n=1389), con la administración de eniporida durante la reperfusión. Este ensayo tampoco fue capaz de demostrar ningún beneficio sobre la mortalidad, insuficiencia cardiaca o arritmias (Zeymer et al., 2001).

2.2 REDUCCIÓN DE LA SOBRECARGA DE CALCIO CITOSÓLICA DURANTE LA REPERFUSIÓN

La manera más sencilla de disminuir la sobrecarga de Ca^{2+} consiste en administrar soluciones con bajas concentraciones de este catión durante los primeros minutos de la reperfusión. No obstante, esta opción ha quedado principalmente limitada a estudios de protección mediante estrategias cardioplégicas (Chen, 1996). Así, la administración de una solución pobre en Ca^{2+} (0.25 mM) durante los primeros momentos de la reperfusión mejoró la función ventricular postisquémica en corazones aislados de rata (Fukuhiro et al., 2000).

Una alternativa a esta estrategia es utilizar bloqueantes de los canales de Ca^{2+} tipo L (Viola et al., 2009), como el diltiazem, ya que se han probado sus efectos limitando el daño miocárdico irreversible o el aturdimiento, tanto cuando se administran antes de la isquemia como previamente a la reperfusión (García-Dorado et al., 1987b; Higginson et al., 1991). Por otra parte, el magnesio (Mg^{2+}) también posee propiedades bloqueantes del mencionado canal, habiéndose demostrado que es capaz de reducir el tamaño del infarto en

INTRODUCCIÓN

diferentes especies cuando se administra en el momento de la reperfusión (Christensen et al., 1995; Herzog et al., 1995; Imura et al., 2011; Mirica et al., 2013). Sin embargo, parte de la efectividad de este último podría deberse a sus acciones sobre las especies reactivas del oxígeno (Maulik et al., 1999; Quan et al., 2013).

Probablemente, sin embargo, la opción más interesante para reducir la sobrecarga de calcio que se produce al inicio de la reperfusión sea el bloqueo directo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Iwamoto et al., 2007; Toth et al., 2009). Así, su inhibición mediante KB-R7943 demostró ejercer un efecto protector contra el daño por reperfusión, cuando se administraba tras la isquemia, en cardiomiocitos aislados, corazón aislado de rata y corazón porcino *in situ* (Schafer et al., 2001; Inserte et al., 2002; Ren et al., 2014). Estos efectos se asociaron con una reducción en el desarrollo de hipercontractura y en las oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} . Además, la administración del KB-R7943 también ejerce un efecto protector frente a las arritmias de la reperfusión (tanto taquicardias como fibrilaciones ventriculares), al menos cuando se administra previamente a la isquemia en corazones aislados de conejo (Elias et al., 2001).

En cuanto a las primeras intervenciones farmacológicas investigadas en pacientes con SCAEST aparecen los bloqueantes de los canales de calcio, aunque las evidencias clínicas de su posible efecto cardioprotector son cuestionables, en parte debido a la inexistencia de grandes estudios clínicos (Dirksen et al., 2007). De este modo, en dos pequeños ensayos aleatorizados, tanto la administración intracoronaria de nisoldipina (n=36) al principio de la reperfusión miocárdica (Sheiban et al., 1997), como la administración intravenosa de diltiazem (n=90) previa a la reperfusión (Pizzetti et al., 2001), mejoró la función del ventrículo izquierdo, y en el último caso, además, redujo el pico de creatina quinasa, asociándose a una reducción en el tamaño del infarto. Sin embargo, el estudio DATA (n=59), también con administración intravenosa de diltiazem, no presentó diferencias ni en la fracción de eyección ni en la liberación de enzimas marcadoras de infarto, aunque sí redujo los eventos cardiacos adversos a los 35 días (Theroux et al., 1998).

De igual forma, tampoco existen datos concluyentes sobre la utilidad del ión magnesio como agente cardioprotector, pese a que sí se han realizado ensayos de mayor envergadura. Aunque el estudio LIMIT-2 (n=2316), que contemplaba la administración intravenosa de MgSO_4 antes de la reperfusión, logró demostrar una reducción en la mortalidad a los 28 días, no se hallaron diferencias en la liberación de enzimas (Woods et al., 1992). Por otro lado, no se observaron beneficios en la mortalidad o en la función cardiaca en otros dos grandes ensayos, ISIS-4 y MAGIC, sumando, entre ambos, más de 60000 individuos (Grober et al., 2015).

Por otro lado, en el ensayo CASTEMI (n=387), la administración intravenosa de caldaret (un modulador del manejo del calcio intracelular, que inhibe su entrada a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y que también provoca su extracción desde el citosol hacia el retículo) después del inicio de la isquemia, no demostró ser capaz de modificar el tamaño del infarto ni la fracción de eyección en pacientes con SCAEST tratados con angioplastia primaria (Bar et al., 2006). La misma falta de eficacia mostró este compuesto en el estudio EVOLVE sobre una población de 141 pacientes con SCAEST que también fueron sometidos a angioplastia primaria (Jang et al., 2008).

2.3 REDUCCIÓN DE LAS OSCILACIONES CITOPASMÁTICAS DE CALCIO MEDIANTE MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Además de reducir la sobrecarga citosólica de calcio, se puede actuar directamente sobre las oscilaciones en las concentraciones de este ión que se producen durante la reperfusión (Piper et al., 2006). Por un lado, y en relación a la captación de calcio por parte del retículo sarcoplasmático, se ha visto que el bloqueo farmacológico de la Ca^{2+} -ATPasa (SERCA) con halotano reduce la incidencia de hipercontractura en miocitos aislados reoxigenados (Siegmund et al., 1997). Además, la administración de halotano durante la reperfusión fue capaz de reducir significativamente el tamaño del infarto en un protocolo de isquemia-reperfusión *in vivo* en conejo (Schlack et al., 1997), aunque se ha propuesto que, en parte, la protección que ejerce este anestésico volátil podría explicarse también por su interacción con las *gap junctions* (Rodríguez-Sinovas et al., 2004). Otros inhibidores de SERCA, como el ácido ciclopiazónico (Seidler et al., 1989), también han demostrado ejercer efectos cardioprotectores en estudios en miocardio aislado de conejo, aunque en este caso los efectos desaparecían cuando se administraba sólo durante la reperfusión (Avellanal et al., 1998). Además, los efectos protectores se extienden a acciones sobre las arritmias de reperfusión, como se ha demostrado con varios inhibidores de SERCA, como ácido ciclopiazónico o taspigarguina, administrados antes de la isquemia y durante la reperfusión (du Toit and Opie, 1994).

Por otro lado, la modulación de la extrusión de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático al citosol produce, también, efectos cardioprotectores (Fauconnier et al., 2013). Así, bloqueantes como la rianodina, administrados durante todo el experimento, redujeron la incidencia de arritmias ventriculares, tanto durante la isquemia como durante la reperfusión, en corazones aislados de rata (Thandroyen et al., 1988). Otros autores han demostrado una mejora en la función cardíaca en corazones aislados de conejo tratados con rianodina y sometidos a isquemia-reperfusión, respecto al grupo control (Akita et al., 1993).

2.4 INHIBIDORES CONTRÁCTILES

Existen algunos fármacos capaces de inhibir directamente la maquinaria contráctil de la célula durante los primeros minutos de la reperfusión, como la 2,3-butanodiona monoxima (BDM) o la blebistatina. La BDM es un inhibidor reversible, no competitivo, de la miosina II-ATPasa (Chung et al., 2015), capaz de atenuar el desarrollo de hipercontractura en cardiomiocitos aislados sometidos a isquemia simulada y reoxigenación (Siegmund et al., 1991), y de ejercer protección contra el daño por isquemia-reperfusión en corazones aislados de rata (Tani et al., 1996). Además, estudios *in situ*, en un modelo de isquemia regional en corazón de cerdo, permitieron demostrar que el tratamiento intracoronario con BDM, administrada durante los primeros minutos de la reperfusión, reducía el desarrollo de hipercontractura, efecto que se asociaba con una disminución significativa del tamaño del infarto (García-Dorado et al., 1992a). Resultados similares se han obtenido también en otras especies, como en el modelo de corazón de perro *in situ*, donde la administración de BDM también logró reducir las dimensiones del miocardio infartado (Schlack et al., 1994).

La blebistatina es un inhibidor específico para las isoformas de miosina II no musculares y del músculo esquelético, que produce desacoplamiento del proceso de excitación-contracción sin afectar a otras propiedades del cardiomiocito, como pueden ser las características del potencial de acción (Fedorov et al., 2007; Dou et al., 2007). La blebistatina reduce la incidencia de taquicardia ventricular en corazones de ratón con infarto crónico, y ha sido utilizada para llevar a cabo múltiples ensayos electrofisiológicos en modelos murinos y lagomorfos de corazón aislado (Fedorov et al., 2007; Brack et al., 2013). Al igual que pasaba con la BDM, la administración de blebistatina durante los primeros minutos de la reperfusión en corazones aislados de rata se ha asociado con una reducción del desarrollo de hipercontractura durante la misma y con una disminución de la muerte celular, determinada mediante liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Inserte et al., 2013).

2.5 INHIBIDORES DE PROTEASAS

Las proteasas dependientes de calcio, como las calpaínas, permanecen inhibidas durante la isquemia por la acidosis intracelular que se produce durante esta fase, pero se reactivan con el restablecimiento del pH al principio de la reperfusión (Inserte et al., 2009; Neuhof and Neuhof, 2014). Una vez activadas son capaces de degradar proteínas estructurales del sistema de anclaje entre el sarcolema y el citoesqueleto, como la α -fodrina y la anquirina-B, aumentando la fragilidad de ambos (Inserte et al., 2004). Además, también queda dañado el anclaje de la Na^+/K^+ ATPasa a la membrana, y por tanto perjudica su función normal (Singh and Dhalla, 2010). Se ha demostrado que la administración de MDL-7943, un inhibidor de la actividad de las calpaínas,

consigue atenuar el daño por reperfusión, efecto asociado a la conservación de α -fodrina y de anquirina-B, y a protección de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa (Inserte et al., 2005). Asimismo, el uso de otros inhibidores de calpaínas, como el MDL-28170, también ha probado ser beneficioso limitando el tamaño del infarto en corazón aislado de rata (Hernando et al., 2010). Otros inhibidores de las calpaínas, cuyo desarrollo ha sido más reciente, como es el caso del SNJ-1945 (Koumura et al., 2008), han demostrado ejercer efectos cardioprotectores frente al daño por reperfusión en modelos de paro cardíaco mediante cardioplegia realizado en preparaciones aisladas de corazón de rata (Yoshikawa et al., 2010), así como en modelos de corazón de rata *in situ* tras isquemias breves seguidas de reperfusión (Takeshita et al., 2013).

Además del uso de moléculas que logran detener la actividad de las calpaínas, existen inhibidores de otras proteasas que podrían ser útiles contra el daño por reperfusión. Es el caso de la aprotinina, un inhibidor de serín proteasas que ha demostrado efectos similares reduciendo el tamaño del infarto al ser administrada *in situ* en corazón de cerdo (Khan et al., 2004).

2.6 INHIBIDORES DE LOS CANALES DE Cx43

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la extensión de la hipercontractura y de la muerte celular, que se produce en el miocardio durante la reperfusión, puede ser en parte reducida con fármacos que actúen inhibiendo los canales formados por Cx43 (Rodríguez-Sinovas et al., 2012; Schulz et al., 2015). Sin embargo, muchas de las moléculas inhibitoras de las conexas son, en general, poco selectivas, y tienen efectos también sobre otras dianas intracelulares, lo cual dificulta la correcta interpretación de los resultados (Bodendiek and Raman, 2010).

Es el caso del heptanol, cuya administración durante la reperfusión ha logrado limitar la propagación de la hipercontractura en cardiomiocitos aislados y la necrosis en corazones *in situ* de cerdo y aislados de rata sometidos a isquemia transitoria (García-Dorado et al., 1997b; Rodríguez-Sinovas et al., 2004). Un caso parecido ocurre con el halotano (Rodríguez-Sinovas et al., 2004), otro bloqueante de las uniones tipo gap que, además, puede intervenir inhibiendo las oscilaciones de Ca^{2+} en el citosol, actuando sobre el retículo sarcoplasmático, y reduciendo así la hipercontractura (Siegmund et al., 1997). Por otro lado, la administración de heptanol previamente a la isquemia ejerce también un efecto protector reduciendo la incidencia de arritmias ventriculares en corazón aislado de rata (Sun et al., 2014), así como el tamaño del infarto (Rodríguez-Sinovas et al., 2006b). Sin embargo, la protección provocada por el pretratamiento con heptanol puede deberse a sus acciones antiisquémicas, ya que su administración previa retrasa la aparición del rigor isquémico y del

INTRODUCCIÓN

desacoplamiento eléctrico y reduce la sobrecarga de Ca^{2+} que ocurre durante la isquemia (Rodríguez-Sinovas et al., 2006b).

Otros inhibidores de las uniones tipo gap también han demostrado ser eficaces frente al daño por reperfusión cuando se administran tras el episodio de isquemia. Sería el caso del ácido palmitoleico o del ácido glicerretínico (y sus derivados, como la carbenoxolona), cuya administración al inicio de la reperfusión lograron atenuar el daño letal en preparaciones de miocardio de rata en un modelo de corazón aislado de Langendorff (Rodríguez-Sinovas et al., 2004; Schulz et al., 2015).

Sin embargo, la falta de especificidad de muchas de estas moléculas inhibitoras, ha despertado el interés en la búsqueda de nuevos agentes con acciones más selectivas. Recientemente se han desarrollado una serie de péptidos sintéticos que mimetizan la estructura de determinadas regiones de la propia conexina 43, y que se comportan como bloqueantes específicos de los canales de esta proteína (Schulz et al., 2015). Un ejemplo son los péptidos Gap26 y/o el Gap27, capaces de interactuar con zonas concretas del primer o segundo lazo extracelular, respectivamente, de la molécula de Cx43, impidiendo la interacción de un hemicanal de Cx43 con el de la célula vecina, y previniendo, de esta manera, la formación de los canales de las uniones tipo gap (Evans and Boitano, 2001). Existen estudios donde se ha visto que la administración de Gap26 después de una isquemia regional es capaz de reducir el tamaño del infarto en corazones aislados de rata sometidos a isquemia-reperfusión, y de aumentar la supervivencia en cardiomiocitos aislados sometidos a un protocolo de la misma naturaleza (Hawat et al., 2010).

Los bloqueantes convencionales de conexina no son capaces de distinguir entre acciones sobre los canales de las uniones tipo gap o sobre los hemicanales. Algo similar puede ocurrir también con los péptidos miméticos. De hecho, se ha demostrado que Gap26/27 también son capaces de inhibir los hemicanales de conexina (Braet et al., 2003). Por tanto, no se puede descartar que parte de las acciones de todas estas drogas sean debidas a sus acciones sobre los hemicanales en vez de sobre los canales de las uniones tipo gap. De hecho, la apertura descontrolada de los hemicanales en el sarcolema podría ser dañina para el miocardio, al alterar el equilibrio iónico, facilitando la aparición de edema celular y permitiendo la pérdida de metabolitos críticos (Wang et al., 2013). Para poder diferenciar entre ambas posibilidades, más recientemente se han desarrollado dos nuevos péptidos miméticos, L2 y Gap19, selectivos sobre los hemicanales, pero sin actividad sobre los canales de las uniones tipo gap, que interaccionan con los dominios intracelulares de la Cx43. En estudios realizados con Gap19, se ha comprobado que este péptido es cardioprotector en un modelo de isquemia-reperfusión miocárdica *in vivo* en

ratón, apoyando, que la participación de la Cx43 en el daño por reperfusión es, al menos en parte, mediada a través de los hemicanales (Wang et al., 2013).

2.7 INHIBIDORES DE LA APERTURA DEL mPTP

La apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), localizado en la membrana interna de la mitocondria, es un importante evento que se desencadena por multitud de factores que se dan en el miocardio reperfundido tras un periodo de isquemia, y que es causante de daños irreversibles en la célula. Impedir de forma directa su apertura es una estrategia cardioprotectora que ha suscitado y dirigido el interés de numerosas investigaciones (Bernardi and Di Lisa, 2015).

Una de las primeras moléculas en describirse como bloqueante de este megacanal fue la ciclosporina A (Szabo and Zoratti, 1991). Este fármaco se utiliza en la práctica clínica como un potente inmunosupresor, capaz de reducir el riesgo de rechazo tras un trasplante de un órgano (Cohen et al., 1984; Molnar et al., 2015). Su acción inmunosupresora radica en su unión a las ciclofilinas y sus efectos inhibiendo la calcineurina, una proteína fosfatasa activada por calcio (Liu et al., 1991). Las ciclofilinas son proteínas ubicuas, de estructura bien conservada, que poseen actividad enzimática del tipo peptidilprolil cis-trans isomerasa (Fischer et al., 1989; Takahashi et al., 1989). Esta actividad enzimática de las ciclofilinas es inhibida por la ciclosporina A (Borel et al., 1977), y es el complejo formado por ciclosporina A con la isoforma citosólica ciclofilina A el que inhibe a su vez a la calcineurina (Liu et al., 1991).

En relación a la inhibición de la apertura del mPTP, la acción de la ciclosporina A está asociada a su interacción con la ciclofilina, concretamente con la isoforma mitocondrial, la ciclofilina D (Wang and Heitman, 2005). La ciclofilina D modula la apertura del poro de transición de permeabilidad, pero no es un componente estructural del mismo (Basso et al., 2005). Diversos estudios han revelado el efecto cardioprotector de la ciclosporina A frente al daño por reperfusión en varios modelos animales (Bunger and Mallet, 2013). Es el caso de la administración de esta droga en corazón *in situ* de cerdo (Skyschally et al., 2010) y de conejo (Argaud et al., 2005), observándose una reducción significativa del tamaño del infarto. También en corazón aislado de rata se ha visto su efecto cardioprotector, mejorando la recuperación funcional del ventrículo izquierdo tras el periodo de isquemia-reperfusión (Griffiths and Halestrap, 1993). Además, se ha observado protección en cardiomiocitos de perro aislados, mejorando la función respiratoria mitocondrial (Sharov et al., 2007). Más allá, se ha comprobado su efecto protector, tras hipoxia-reoxigenación, en miocitos aislados a partir de muestras de trabécula auricular de pacientes que habían sido sometidos a cirugía de *bypass* coronario, observándose mayor supervivencia en las células que habían sido tratadas con ciclosporina A al inicio de la reoxigenación (Shanmuganathan et al., 2005).

INTRODUCCIÓN

La eficacia de la inhibición de la apertura del mPTP frente al daño por reperfusión se ha confirmado mediante el uso de otras drogas, como la sangliferina A. Esta droga también interacciona con ciclofilina D, pero en un dominio distinto al de la ciclosporina A (Clarke et al., 2002). La administración de sangliferina A durante los primeros momentos de la reperfusión es capaz de reducir el tamaño del infarto en corazones aislados de rata (Hausenloy et al., 2003), efecto asociado con un aumento en los niveles de ROS requeridos para inducir despolarización de las mitocondrias, una medida indirecta de apertura del mPTP. Otros estudios realizados con la sangliferina A comprenden resultados como una mejora en la supervivencia de cardiomiocitos aislados a partir de aurículas de pacientes de cirugía cardíaca, sometidos *in vitro* a hipoxia-reoxigenación (Shanmuganathan et al., 2005), o como la reducción en el tamaño del infarto al ser administrada *in situ* en corazón de conejo (Argaud et al., 2005).

Más recientemente se han hallado otras moléculas con capacidad para inhibir el mPTP. Sin embargo, su relativa novedad hace que los estudios sobre cardioprotección aun sean escasos. Es el caso de la antamadina (Azzolin et al., 2011), obtenida de *Amanita phalloides*, el esfingolípido ceramida (Novgorodov et al., 2008), o el tetrapéptido denominado bendavia (Brown et al., 2014).

En lo referente a ensayos clínicos, la ciclosporina A demostró, en un ensayo piloto (n=58), que era capaz de reducir el tamaño del infarto en pacientes con SCAEST, determinado mediante resonancia magnética a los 5 días, cuando se administraba al inicio de la reperfusión (Piot et al., 2008). Dicha reducción persistía a los seis meses del evento isquémico (Mewton et al., 2010). Estos trabajos han dado lugar al desarrollo de un gran estudio europeo, el ensayo multicéntrico CIRCUS (n=970), en el que se analizaban los efectos de la administración intravenosa de ciclosporina A en pacientes con SCAEST sometidos a intervención percutánea. Lamentablemente, en este ensayo clínico la ciclosporina no fue capaz de reducir la incidencia de la variable combinada de muerte, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca durante la hospitalización inicial, rehospitalización y remodelado ventricular adverso (Cung et al., 2015). Entre las posibles explicaciones para la falta de eficacia de la ciclosporina en el ensayo CIRCUS podrían incluirse que la tasa de aspiración de trombos fue mayor en este estudio que en los previos, que sólo se incluyeron pacientes con infartos anteriores, o que la droga utilizada iba disuelta en un vehículo lipídico que podría afectar la funcionalidad mitocondrial y la apertura del mPTP.

2.8 ANTIOXIDANTES

La generación exagerada de ROS que se producen durante los momentos iniciales de la reperfusión, principalmente a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, favorecen la apertura del mPTP (Di Lisa and Bernardi, 34

1998), que tan importante papel juega en el daño por reperfusión, e inducen, además, peroxidación lipídica y modificación en la estructura de diversas proteínas (Kevin et al., 2005). Esta acción oxidante, tanto sobre la membrana, como sobre las miofibrillas del citoesqueleto, incrementa, además, la fragilidad celular, colaborando, en este aspecto, con el efecto producido por la activación de las calpaínas (Becker, 2004). Por estas razones se ha propuesto que la administración de sustancias antioxidantes podría ser beneficiosa frente al daño por reperfusión. Sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes modelos experimentales de isquemia-reperfusión han sido generalmente muy variables (Miura et al., 1988; Iwamoto et al., 1991; van Jaarsveld et al., 1994; Fantinelli et al., 2006; Yang et al., 2014).

A pesar de que un número considerable de antioxidantes (beta caroteno, licopeno, vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, etc.) han demostrado efectos protectores, en muchos casos sus características farmacocinéticas limitan su uso como agentes terapéuticos (Jain et al., 2015). Además, las desigualdades en sus efectos se deben, en muchos casos, a diferencias entre los modelos; mientras que su efecto protector se muestra evidente en cardiomiocitos aislados, no es tan claro en modelos animales de corazón aislado o *in situ* (Becker, 2004), pese a que también existen resultados positivos. Es el caso de M40403, un mimético de la superóxido dismutasa, que además de limitar la extensión del miocardio dañado, también fue capaz, cuando se administraba antes de la isquemia, de disminuir la incidencia de arritmias ventriculares en un modelo de rata *in situ* (Masini et al., 2002).

Por otro lado, la posibilidad de interferir “*in situ*” con la producción de ROS, en vez de detoxificar los ROS ya producidos mediante el uso de antioxidantes, ha sido menos explorada. Así, la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria con amobarbital reduce el tamaño del infarto en corazones aislados de rata o ratón sometidos a isquemia-reperfusión, tanto cuando se administra antes de la isquemia como en el momento de la reperfusión (Stewart et al., 2009; Xu et al., 2014). Este efecto se asoció con una menor producción de ROS en mitocondrias aisladas tras la restauración del flujo (Stewart et al., 2009).

La atenuación del estrés oxidativo mediante el uso de antioxidantes, como terapia para reducir el tamaño del infarto de miocardio en pacientes con SCAEST, también ha dado lugar a resultados contradictorios que, en general, no apoyan su papel cardioprotector (Perricone and Vander Heide, 2014). En un estudio realizado en 120 pacientes, en el que se administró superóxido dismutasa humana recombinante (h-SOD) previamente a la revascularización, ésta no modificó ni la tasa de mortalidad ni la fracción de eyección a los 10 días del infarto (Flaherty et al., 1994). De forma similar, el tratamiento con edavarona, aunque logró reducir la liberación enzimática y la incidencia de

arritmias durante la reperfusión, no pudo mejorar la fracción de eyección a las dos semanas de la revascularización, en un ensayo aleatorizado en pacientes con SCAEST (n=80) (Tsujita et al., 2004). Además, en un reciente meta-análisis analizando el papel cardioprotector de diversas vitaminas antioxidantes, se observó que su suplementación no tenía efectos significativos sobre eventos cardiovasculares mayores, infarto de miocardio, muerte por cualquier causa, muerte cardiaca, y cualquier posible evento relacionado con el corazón (Ye et al., 2013).

2.9 BETA-BLOQUEANTES

Otra estrategia que también se ha utilizado para reducir el tamaño del infarto es la administración de β -bloqueantes. Su eficacia reduciendo el tamaño del infarto se ha comprobado en diversos estudios experimentales. Así, su administración intravenosa en un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión porcino ha demostrado aumentar el miocardio salvado, así como mejorar la fracción de eyección del ventrículo izquierdo entre los días 4 y 22 después de la intervención (Ibañez et al., 2007). Posteriormente este mismo grupo observó, también en un modelo porcino, que la administración intravenosa de metoprolol antes de la reperfusión coronaria resultaba en un mayor índice de miocardio salvado que su administración oral iniciada tras la reperfusión (Ibañez et al., 2011).

En cuanto a pacientes con SCAEST en la región anterior del corazón, en el reciente estudio METACARD-CNIC (n=270), la administración intravenosa de metoprolol, previa a la angioplastia primaria, fue capaz de reducir el tamaño del infarto (Ibañez et al., 2013). Este efecto beneficioso persistía incluso seis meses después del evento isquémico, y los pacientes tratados mostraron una mejora significativamente superior en la fracción de eyección (Pizarro et al., 2014). Sin embargo, en un ensayo posterior sobre una población con SCAEST no restringida, la administración intravenosa de metoprolol anterior a la angioplastia primaria, no se asoció con una reducción en el tamaño del infarto (Roolvink et al., 2016). De forma similar, en el estudio COMMIT, de mayor tamaño (n=45852), el tratamiento con metoprolol no modificó la tasa de mortalidad en pacientes con SCAEST (93%) tratados mediante terapia fibrinolítica (Chen et al., 2005). Sin embargo, el METOCARD-CNIC parece ser más representativo que el anterior en cuanto al tratamiento actual de los pacientes con SCAEST en la región anterior del corazón, tanto en cuanto al seguimiento de las guías de práctica clínica, como en cuanto a los criterios de inclusión de los pacientes (Ibañez et al., 2015).

2.10 ACTIVACIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS VÍAS ENDÓGENAS DE CARDIOPROTECCIÓN

Existen fármacos que, mediante mecanismos dependientes o independientes de receptor, son capaces de activar en el cardiomiocito una serie de cascadas citosólicas protectoras, fundamentalmente formadas por quinasas, como son las vías RISK, SAFE, y GMPc/PKG, que pueden interactuar entre sí, y que se describen a continuación.

La vía RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) es una importante ruta bioquímica implicada en el desarrollo cardíaco y la citoprotección (Ertracht et al., 2014). Está formada por un grupo de quinasas activadas de forma secuencial por mecanismos dependientes e independientes de receptor, y que acaban, en general, modulando la apertura del mPTP (Fig. 2-A) (Hausenloy and Yellon, 2007). Las proteínas quinasas más importantes son PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), Akt (también llamada Proteína quinasa B, PKB) y Erk1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase-1/2*), las cuales confieren alta cardioprotección cuando son activadas mediante fosforilación específicamente en el momento de la reperfusión miocárdica (Hausenloy and Yellon, 2004). También están implicadas otras muchas quinasas como GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) (Cohen and Frame, 2001; Park et al., 2006b), o como PKC (Proteína quinasa C), principalmente la isoforma PKC- ϵ (Budás et al., 2007).

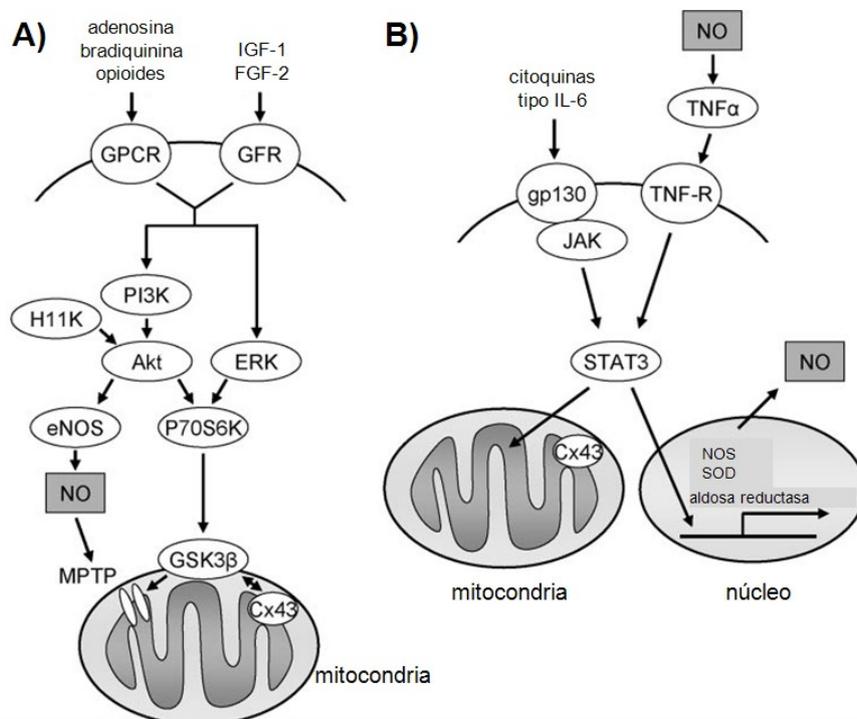


Figura 2. Principales vías implicadas en la señalización celular que conduce a la cardioprotección. **A**, vía RISK. **B**, vía SAFE. GPCR, Receptor acoplado a proteína G; IGF-1, Factor de crecimiento insulínico tipo 1; FGF-2, Factor de crecimiento de fibroblastos 2; IL-6, Interleuquina 6; SOD, Superóxido dismutasa; NOS, Óxido nítrico sintasa. Tomado de (Heusch et al., 2008).

INTRODUCCIÓN

Adicionalmente a la vía RISK, se ha demostrado la existencia de una segunda vía mediadora de la protección, e independiente de la activación de Akt o de ERK. Se trata de la denominada vía SAFE (*Survivor Activating Factor Enhancement*) (Lecour, 2009b), la cual implica la participación de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). STAT3 es fosforilado, y por tanto activado, por las JAK (Janus quinasas) (Fig. 2-B) durante la isquemia o isquemia/reperfusión. Las JAK son una familia de tirosín quinasas que son funcionales cuando determinados ligandos, como TNF α (Factor de Necrosis Tumoral α) o factores de crecimiento, las activan a través de receptores de membrana (Lecour, 2009a).

Finalmente, una tercera vía mediadora sería la del GMPc/PKG (Fig. 3). Está implicada en modular la velocidad de recuperación del pH intracelular durante la reperfusión, pero también tiene efectos sobre las oscilaciones del Ca²⁺ y sobre el mPTP (Inserte and García-Dorado, 2015). El GMPc funciona como un importante segundo mensajero en el cardiomiocito, y es producido a partir de GTP por dos tipos distintos de la enzima guanilil ciclasa (GC), dependiendo de su localización subcelular. La forma soluble (sGC) se encuentra en el citosol del cardiomiocito, y requiere la acción del óxido nítrico (NO) endógeno para poder sintetizar GMPc. Por otro lado, la enzima particulada (pGC) es una proteína integral de la membrana plasmática, y se activa específicamente por la unión de los péptidos natriuréticos (NP), como el BNP o el ANP (Cerra and Pellegrino, 2007), a sus receptores. La activación de los mismos pone en marcha la actividad de la guanilil ciclasa (Costa et al., 2006). En cualquiera de los dos casos, el GMPc sintetizado activará la proteína quinasa G (PKG), que será la responsable de actuar sobre el o los efectores finales de la protección (García-Dorado et al., 2009). Cabe mencionar que los niveles intracelulares de GMPc están regulados también por su degradación hidrolítica mediante fosfodiesterasas (PDE) (Bender and Beavo, 2006). Igualmente, merece la pena destacar que las distintas vías pueden estar interrelacionadas. Así, la producción de NO a partir de la eNOS, y por tanto la producción de GMPc, puede incrementarse, en parte, a través de la vía RISK, por activación de PI3K/Akt (Gao et al., 2002; Bertrand et al., 2008).

Los principales activadores de la vía RISK son las moléculas que actúan a través de su unión a receptores acoplados a proteínas G, que en último término pondrá en marcha la cascada de proteínas quinasas citosólicas (Hausenloy and Yellon, 2007). Ejemplos de este sistema de activación son la adenosina y agonistas de su receptor, la bradiquinina y los opioides (Tanaka et al., 2014), ligandos que, administrados en el periodo de la reperfusión miocárdica, han demostrado reducir el tamaño del infarto en modelos experimentales (Hausenloy and Yellon, 2007). Diversos estudios han puesto de manifiesto una reducción en el tamaño del infarto cuando se administraba

adenosina durante la reperfusión, tanto en un modelo *in vivo* en conejo (Kis et al., 2003), como sobre corazones aislados de rata (Park et al., 2006a). Igualmente la administración de bradiquinina durante la fase de reperfusión también ha logrado reducir el infarto en corazones aislados de ratón (Bell and Yellon, 2003b) y rata (Park et al., 2006b). Por su parte, opioides suministrados minutos antes de la reperfusión intravenosamente en un modelo *in vivo* de rata redujeron significativamente el tamaño del infarto, aboliéndose este efecto protector con la administración de bloqueantes específicos (Gross et al., 2004). De hecho, el uso de bloqueantes específicos ha permitido demostrar el papel endógeno de adenosina, bradiquinina y opioides, dependiendo de la especie, en la activación de la vía RISK durante maniobras cardioprotectoras, pero no de otros agonistas dependientes de receptor, como norepinefrina o angiotensina (Schulz et al., 2001).

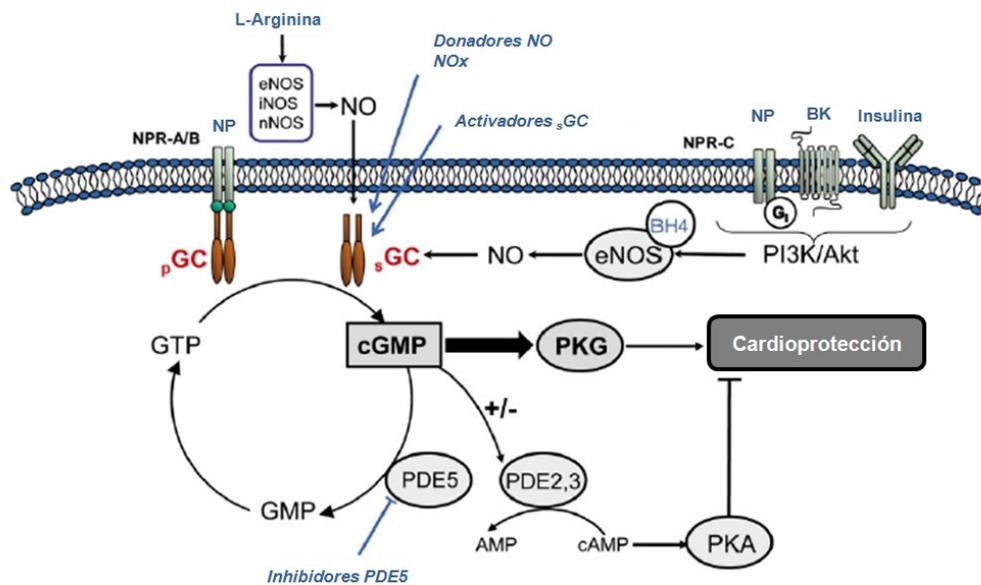


Figura 3. Representación de la vía GMPc/PKG. GMPc es sintetizado por la activación de las vías NO/sGC y NP/pGC, y regulado por PDEs compartimentadas. Agonistas de receptores asociados a proteína G estimulan el eje eNOS/sGC/PKG, vía activación de PI3K/Akt. Las acciones principales de GMPc no solo están mediadas por PKG, sino también por la regulación de los efectos mediados por AMPc a través de la modulación de PDE2 y PDE3. Las diferentes estrategias farmacológicas que han sido probadas para estimular la vía GMPc/PKG se muestran en azul. BK, Bradiquinina; Nox, Nitritos/nitratos; NP, Péptido natriurético. PDE, Fosfodiesterasa. Tomado de (Inserte and García-Dorado, 2015).

En el escenario clínico, el tratamiento con adenosina ha sido el centro de interés de diversos ensayos. Dos de los más relevantes son los estudios multicéntricos AMISTAD (n=236) (Mahaffey et al., 1999) y AMISTAD-II (n=2118) (Ross et al., 2005), en los que se valoraba el posible efecto cardioprotector de una infusión intravenosa de adenosina junto con lidocaína, en pacientes con elevación del segmento ST. En el primer ensayo, los

INTRODUCCIÓN

pacientes fueron intervenidos con terapia trombolítica, y, en el segundo, algunos casos fueron tratados con trombolisis y otros con intervención percutánea. Los resultados de estos dos ensayos indicaron que la adenosina no modificaba, en general, el tamaño del infarto, aunque en el subgrupo de pacientes que había sufrido infartos anteriores parecía existir una modesta limitación del infarto (Kassimis et al., 2015). Sin embargo, otros estudios posteriores como el ADMIRE (Kopecky et al., 2003) o el ATTACC (Quintana et al., 2003) dieron lugar a resultados negativos en cuanto a la reducción del tamaño del infarto y en cuanto a la mejora de la función del ventrículo izquierdo, respectivamente. Por otro lado, la administración intracoronaria de adenosina, como complemento de la angioplastia primaria, sí logró mejorar la función cardíaca en un ensayo realizado sobre 54 pacientes con infarto agudo de miocardio sometidos a angioplastia primaria, efecto asociado a una menor mortalidad (Marzilli et al., 2000). Sin embargo, en un estudio posterior, el ensayo PROMISE (n=201), no fue capaz de demostrar beneficio limitando el tamaño del infarto, excepto en aquellos pacientes cuya duración de la isquemia era inferior a 200 minutos (García-Dorado et al., 2014a).

Por otro lado, la vía RISK puede ser activada por mecanismos independientes de receptor. Es el caso de las estatinas, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, utilizadas para reducir el colesterol en sangre, que ejercen acciones protectoras cuando son administradas durante la reperusión (Bell and Yellon, 2003a). Su mecanismo de acción también depende de la activación de PI3K-Akt y de la fosforilación de eNOS. Igualmente, se ha demostrado esta dependencia de la activación de PI3K en el efecto protector que tiene el isoflurano (Chiari et al., 2005).

En cuanto a las terapias con estatinas en la práctica clínica, de nuevo hay resultados discordantes. El estudio ARMYDA-ACS (n=171) demostró que el pretratamiento con atorvastatina era capaz de reducir la liberación de enzimas marcadoras de daño miocárdico en pacientes no SCAEST que cursaban con síndrome coronario agudo (Patti et al., 2007). Sin embargo, un estudio posterior (n=173) determinó que no había diferencias en el tamaño del infarto entre los grupos tratados con altas dosis de atorvastatina (80 mg antes de la intervención percutánea y durante los 5 días posteriores) y los tratados a bajas dosis (10 mg diarios después de la intervención) (Hahn et al., 2011) en pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST. Por otro lado, el uso generalizado de las estatinas en el tratamiento de los pacientes con síndrome coronario agudo hace difícil la realización de ensayos aleatorizados (estatinas vs. placebo) en pacientes con SCAEST, con el objetivo de evaluar su efecto sobre el tamaño del infarto (Kloner, 2013).

Además de la vía RISK, es posible modular farmacológicamente la activación de otras vías cardioprotectoras, como la vía del GMPc/PKG. La

modulación de esta vía puede conseguirse o bien mediante estimulación de la guanilato ciclasa y consiguiente formación de GMPc, o bien evitando la degradación de este importante mediador intracelular (Inserte and García-Dorado, 2015). Por un lado, la forma citosólica de la guanilato ciclasa es activada de forma independiente de receptor de membrana, por la producción de NO generado por la enzima NOS, que utiliza L-arginina como sustrato. Se ha observado que la administración preisquémica de L-arginina atenúa el daño por reperfusión en corazón *in situ* de cerdo (Padilla et al., 2000). Efectos similares se han descrito con nitratos y nitritos, que son reducidos en sucesivos pasos generando finalmente NO, así como con donadores sintéticos de NO (Lundberg et al., 2008), habiéndose observado una reducción del tamaño del infarto cuando se administran antes de la isquemia (Shiva et al., 2007). Así mismo, la producción de GMPc puede aumentarse de forma dependiente de receptor (aunque en este caso se trata de un receptor no acoplado a proteínas G) mediante estimulación de la forma particulada de la GC (pGC), tras la administración de péptidos natriuréticos, que conducen a limitación del tamaño del infarto (Padilla et al., 2001; Ren et al., 2007). Sin embargo, hay que considerar, en este punto, que la activación de estos receptores también puede conducir a la activación de la vía RISK, como se ha visto en corazón aislado de rata (Sangawa et al., 2004). En cuanto a la inhibición de la degradación del GMPc, la administración de inhibidores de PDE ha logrado reducir el infarto en diferentes modelos experimentales (Kukreja et al., 2011).

A nivel clínico, el uso de péptidos natriuréticos podría resultar esperanzador. Su administración intravenosa o intracoronaria, en pacientes con SCAEST, ha demostrado mejorar la función cardíaca postinfarto al mes (Hayashi et al., 2001) y a los seis meses (Kuga et al., 2003) respectivamente, y prevenir el remodelado ventricular adverso, así como reducir la incidencia de arritmias durante la reperfusión. En el ensayo multicéntrico J-WIND-ANP (n=1216), la infusión de un análogo del péptido natriurético auricular (Kitakaze et al., 2007) disminuyó la liberación enzimática de creatina quinasa, una medida indirecta del tamaño del infarto, efecto asociado a un incremento en la fracción de eyección.

3 Modulación del metabolismo cardíaco como estrategia protectora frente al daño por reperfusión

Una forma distinta de abordar el daño por reperfusión es provocando un cambio en el metabolismo energético del miocardio, pasando de la habitual oxidación de ácidos grasos de cadena larga, hacia la oxidación de glucosa (Bertrand et al., 2008). En este sentido, los ácidos grasos y la glucosa compiten por ser oxidados a nivel del Ciclo de Randle (Randle et al., 1963), de forma que unos inhiben el metabolismo de la otra y viceversa. El metabolismo de los ácidos grasos resulta más eficaz energéticamente, pero lo hace a costa de un mayor consumo de oxígeno. En una situación como la isquemia, desplazar el metabolismo hacia el consumo de glucosa podría resultar beneficioso, debido a la menor disponibilidad de oxígeno, permitiendo mantener durante algún tiempo los niveles de ATP (Grossman et al., 2013). Los principales sistemas que se han utilizado para redirigir el metabolismo del miocardio hacia el consumo de glucosa son la administración de soluciones conteniendo insulina (como la de glucosa-insulina-potasio, GIK) o la administración de agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1).

3.1 GLUCOSA-INSULINA-POTASIO (GIK)

La idea de que el tratamiento con glucosa podía ser beneficioso en varias enfermedades cardíacas aparece por primera vez en 1912 (Goulston, 1912), y los primeros resultados experimentales, comprobando los efectos mecánicos de una mezcla de insulina y glucosa en corazón aislado, datan de 1927 (Visscher and Muller, 1927; van der Horst and Zijlstra, 2005). En 1935, Evans y colaboradores mostraron que la captación de glucosa está aumentada en el miocardio isquémico (Evans et al., 1935). Sin embargo, no fue hasta treinta años más tarde cuando Sodi-Pallares y colaboradores sugirieron que la interferencia metabólica durante la isquemia miocárdica con una infusión de GIK podía provocar un efecto beneficioso, con un descenso en los signos electrocardiográficos provocados por la misma (Sodi-Pallares et al., 1962). Además, estos mismos autores fueron capaces de demostrar que la infusión de GIK es capaz de reducir la incidencia de arritmias durante el período de isquemia (Sodi-Pallares et al., 1963). Este último hecho lo atribuyeron a la entrada de potasio en los cardiomiocitos durante la isquemia (Sodi-Pallares et al., 1963), ya que la insulina, además de facilitar la captación y el consumo de glucosa en las células, también estimularía el flujo de potasio hacia su interior (Zierler et al., 1985).

Desde esos estudios iniciales, la terapia con GIK ha sido ampliamente investigada en el ámbito del daño por isquemia-reperfusión, por sus posibles

INTRODUCCIÓN

efectos protectores sobre el tamaño del infarto. Así, en un modelo canino de oclusión coronaria se observó que una infusión intravenosa de GIK, administrada 30 minutos después de la isquemia, se asociaba a una reducción en la extensión del área necrótica miocárdica (Maroko et al., 1972b). Las acciones protectoras de GIK, en general, se han asociado con una reducción en los niveles de ácidos grasos libres (Jonassen et al., 2000), con mejoras en la bioenergética del miocardio (Cave et al., 2000; Angelos et al., 2002) y con incrementos en la captación de glucosa y en la tasa glucolítica en el mencionado tejido (Zhu et al., 2000; Cave et al., 2000). Sin embargo, los datos que existen hasta el momento no son del todo concluyentes, ya que hay bastantes estudios contradictorios, incluyendo trabajos en modelos animales *in vivo* de infarto de miocardio (Bellows and Kloner, 1998; Jonassen et al., 2000). Una de las posibles causas de esta disparidad de resultados es que las concentraciones de insulina utilizadas han sido, en muchas ocasiones, variables (Das, 2002), lo cual dificulta la correcta interpretación de los resultados.

Dado que el mecanismo de acción inicialmente propuesto para explicar la protección por GIK sería el cambio metabólico, que sería especialmente beneficioso en condiciones de baja tensión de oxígeno, el efecto protector debería darse principalmente cuando la solución de GIK se administra antes de la isquemia, o durante la misma. Así, la insulina, administrada durante la isquemia, ejerce un efecto protector frente a la muerte necrótica tanto en corazones aislados de rata como en cardiomiocitos en cultivo (Díaz et al., 2015). Adicionalmente, la acción de la insulina facilitando la acumulación de glucógeno y la utilización de la glucosa, lleva a que las células tengan mayores reservas energéticas durante la isquemia, lo cual conduce a una mejor tolerancia ante la misma (Haider et al., 1984). Sin embargo, la insulina también ha demostrado ejercer un efecto protector cuando se administra al inicio de la reperfusión (Sack and Yellon, 2003). De hecho, en un modelo de infarto de miocardio *in vivo* en corazones de rata, el tratamiento con GIK redujo de forma similar el tamaño del infarto cuando la solución se administraba sólo durante la reperfusión o durante todo el protocolo (isquemia y reperfusión) (Jonassen et al., 2000).

Algunos autores han postulado que la insulina sería la principal responsable de la protección ejercida por GIK (Gao et al., 2002; Abdallah et al., 2006). Se trata de una hormona de naturaleza peptídica sintetizada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino, y de función hipoglucemiante. Etimológicamente, insulina deriva de la palabra “ínsula”, en latín “isla”, haciendo referencia metafórica a dicha estructura, donde es sintetizada y secretada (Ahmad, 2014). De hecho, Jonassen y colaboradores, utilizando un modelo de corazón aislado de rata, demostraron que la

administración únicamente de insulina, tanto durante los primeros quince minutos de la reperfusión, como durante las dos horas siguientes, era capaz de reducir significativamente el tamaño del infarto (Jonassen et al., 2001). Estudios realizados en otros modelos animales, como en corazones *in situ* caninos o de conejo, han permitido llegar a conclusiones similares respecto al efecto protector de la insulina durante la reperfusión (Zhang et al., 2006a; Wong et al., 2011). A la vista de estos resultados, parece que el papel protector que tiene la GIK se vincularía al efecto cardioprotector independiente que ejerce la insulina (Sack and Yellon, 2003).

La explicación de por qué la GIK, y especialmente la insulina, ejerce un efecto protector durante la reperfusión no es del todo conocida. A los efectos metabólicos (que quizás sean menos importantes en esta fase) se añade la posible activación, dependiente de la interacción de la insulina con sus receptores, de diferentes vías de señalización que pueden conducir a un efecto cardioprotector. Así, la insulina se ha descrito que activa la vía RISK, al unirse a su receptor en la superficie celular (Bertrand et al., 2008). Gracias a esta unión, el receptor de insulina pone de manifiesto su actividad tirosina quinasa, lo que llevará en último término a la activación de PI3K y Akt, y por tanto pondrá en funcionamiento la vía RISK (Fig. 4) (Bertrand et al., 2008). Además, su potencial protector sobre el corazón también está relacionado con su capacidad de suprimir la generación tanto del TNF- α como de anión superóxido (Das, 2001; Groeneveld et al., 2002).

Finalmente, la modulación del metabolismo energético miocárdico también se ha utilizado con cierto éxito en el tratamiento de los pacientes con SCAEST sometidos a revascularización coronaria. En concreto, la administración de GIK ha sido probablemente la estrategia más investigada (Kloner and Nesto, 2008). Así, el estudio ECLA (n=407) demostró que la infusión de GIK, durante 10 horas después del inicio de los síntomas, se asociaba a una reducción en la mortalidad (Diaz et al., 1998). Sin embargo, en este estudio sólo el 60% de los pacientes fueron reperfundidos, y la revascularización fue más frecuente en los pacientes tratados con GIK que con placebo, lo cual puede dificultar la correcta interpretación de los resultados (Diaz et al., 1998). Por el contrario, en el ensayo multicéntrico Pol-GIK (n=954) no se hallaron diferencias en la mortalidad o en la incidencia de eventos cardíacos (Ceremuzynski et al., 1999). De igual forma, los estudios GIPS (n=940) (van der Horst et al., 2003) y REVIVAL (n=312) (Pache et al., 2004) tampoco manifestaron efectos sobre la mortalidad. No obstante, en un meta-análisis posterior, sumando 4992 pacientes, se detectó una reducción en la mortalidad hospitalaria cuando la terapia con GIK se administraba durante la reperfusión, especialmente a altas dosis (Timmer et al., 2004). Desafortunadamente, estos beneficios no se observaron en el subsiguiente

INTRODUCCIÓN

estudio GIPS-II (n=889) (Timmer et al., 2006), en pacientes sin evidencias clínicas de insuficiencia cardiaca, subgrupo en que se halló reducción en la mortalidad en el ensayo GIPS. Tampoco fue el caso del estudio CREATE-ECLA, de mayor envergadura (n=20201), donde la terapia con GIK no consiguió reducir la mortalidad ni la liberación de enzimas cardíacas (Mehta et al., 2005). No obstante, a pesar de que el efecto de la GIK sobre el tamaño del infarto en pacientes con SCAEST no parece claro a la vista de los estudios presentados, el más reciente (IMMEDIATE) puede haber aportado resultados alentadores. El ensayo multicéntrico IMMEDIATE reclutó 871 pacientes con alta probabilidad de síndrome coronario agudo que, en su mayoría, fueron reperfundidos mediante angioplastia primaria, y que comenzaron a recibir el tratamiento con GIK o placebo por vía intravenosa durante su traslado en ambulancia hacia el hospital (Selker et al., 2012). En este estudio, y a pesar de que en la población general del mismo el tratamiento con GIK durante 12 horas no modificó la tasa de progresión a infarto de miocardio, la mortalidad a 30 días o la incidencia de variable compuesta mortalidad intrahospitalaria junto a paro cardíaco, en el subgrupo de pacientes con SCAEST, la terapia con GIK sí redujo significativamente la incidencia de la variable compuesta mortalidad intrahospitalaria y paro cardíaco. Además, en el pequeño subgrupo de pacientes en los que se midió el tamaño del infarto, determinado mediante gammagrafía de perfusión miocárdica (SPECT), se observó una disminución en el tamaño, tanto en el total de pacientes como en el subgrupo con SCAEST (Selker et al., 2012). Lo que diferencia fundamentalmente al IMMEDIATE de otros ensayos anteriores con GIK, es que, tratándose de un estudio multicéntrico, doble ciego y aleatorizado con placebo, la administración de GIK a los pacientes con síndrome coronario agudo se hizo tan temprano como fue posible (Selker et al., 2014).

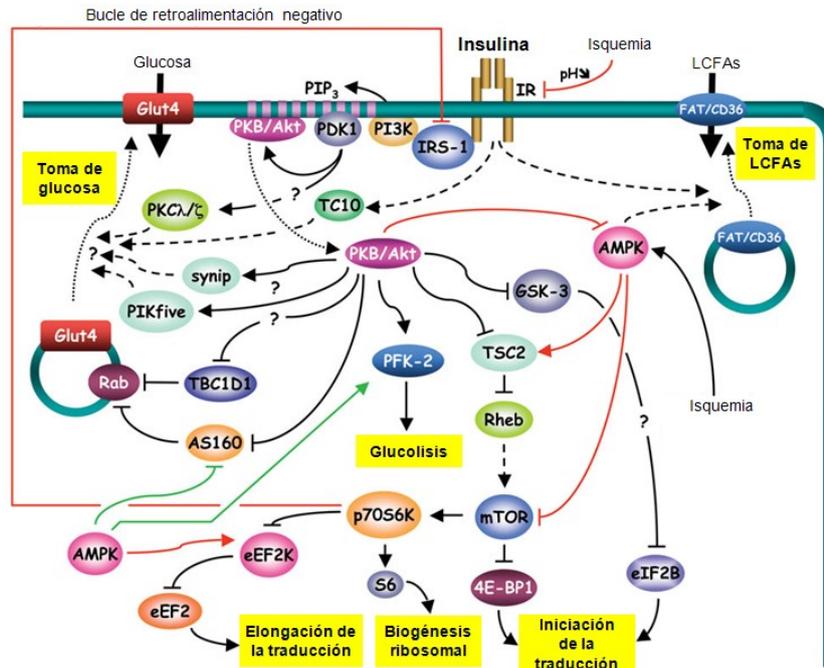


Figura 4. Vías implicadas en la señalización intracelular provocada por la unión de la insulina a sus receptores y que participan en la regulación del metabolismo cardiaco. Las líneas de puntos simbolizan translocaciones y las sólidas ilustran interacciones directas, mientras que las líneas discontinuas representan regulación indirecta. Se muestran las interacciones entre insulina y AMPK (líneas rojas indicando inhibición de una vía a la otra, y líneas verdes señalando efectos análogos a los de la insulina). Las interrogaciones representan eventos de señalización que aun no se han establecido en el tejido cardiaco. Tomado de (Bertrand et al., 2008).

3.2 PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1)

Otra molécula capaz de modificar el metabolismo miocárdico hacia una mayor utilización de glucosa, y candidata a reducir el daño por reperfusión es el GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*) (Deacon, 2004). El GLP-1 es una incretina, es decir, una hormona liberada al torrente sanguíneo por las células L del intestino delgado y grueso en respuesta a la ingesta de alimento (Clarke et al., 2014). Su principal función es reducir la glucemia postprandial, estimulando la liberación de insulina dependiente de glucosa, e inhibiendo la secreción de glucagón por parte de las células alfa pancreáticas (Crepaldi et al., 2007). De esta forma participa, por tanto, en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el organismo (Ussher and Drucker, 2012).

La investigación sobre la modulación de los niveles de GLP-1 se ha centrado en el tratamiento de enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2 (Tasyurek et al., 2014). Sin embargo, sus efectos sobre el órgano cardiaco, así como su potencial cardioprotector son, actualmente, objeto de un gran interés (Poudyal, 2016), especialmente considerando que la diabetes tipo 2 es, precisamente, uno de los factores de riesgo cardiovascular

INTRODUCCIÓN

más importantes, junto con la obesidad, la dislipemia y la hipertensión (Mazzone et al., 2008).

Los efectos directos de GLP-1 sobre el corazón están asociados a la presencia de su receptor (GLP-1R) (Fig. 5), que se ha descrito con seguridad tanto en la aurícula como en las arterias y arteriolas del ventrículo izquierdo (Richards et al., 2014), aunque existe cierta controversia sobre su presencia en cardiomiocitos ventriculares (Wei and Mojsov, 1995; Ussher et al., 2014; Richards et al., 2014). Su inactivación a nivel cardíaco es esencial para un correcto control de la frecuencia cardiaca (Ussher et al., 2014). De hecho, estos receptores podrían jugar un papel importante en la mejora de la eficiencia energética durante la isquemia, y también, en parte, en la activación de vías citosólicas cardioprotectoras (Poudyal, 2016). En efecto, la activación del GLP-1R en los cardiomiocitos incrementa la captación de glucosa (mediada por la activación de eNOS y de p38-MAPK), a la vez que desencadena la estimulación de una cascada de quinasas pro-supervivencia (Fig. 5). Estas quinasas incluyen PI3K-Akt, además de señalización mediada por GMPc (Seufert and Gallwitz, 2014).

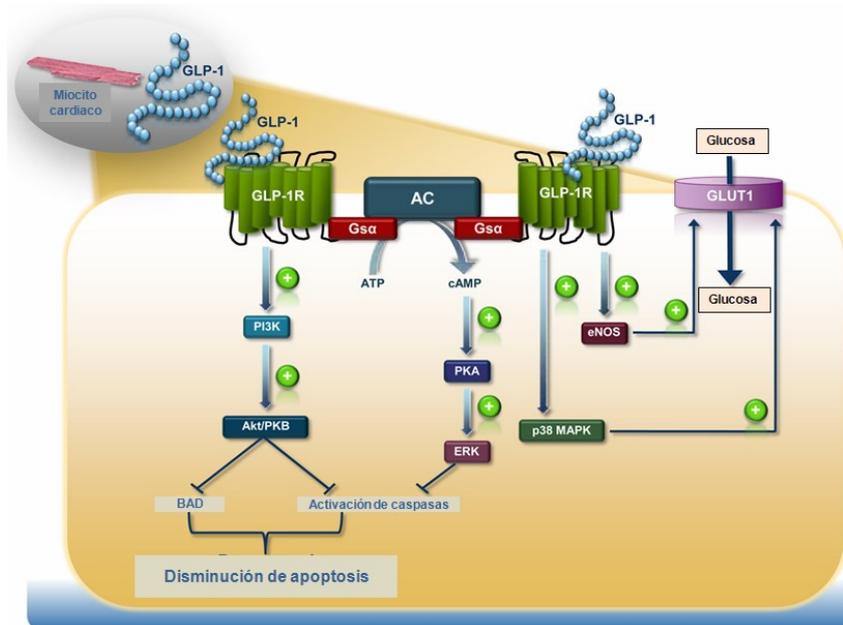


Figura 5. Vías de transducción de señales dependientes de la activación de GLP-1R en el cardiomiocito. Las vías conducen a una reducción en la tasa de apoptosis y a un incremento en la captación de glucosa, independientemente de la vía clásica mediada por insulina. AC, adenilato ciclasa; GLP-1R, receptor de GLP-1. Tomado de (Ussher and Drucker, 2012).

Son varios los estudios que sustentan que la inducción de la cardioprotección asociada a GLP-1 radica en gran medida en su potencial para provocar un cambio en el sustrato energético. En un estudio reciente, realizado tanto en corazón *in situ* de rata, como en el modelo de corazón aislado de Langendorff (Aravindhan et al., 2015), la administración de GLP-1 previamente a la isquemia y durante todo el experimento se asoció a un aumento

significativo en la captación de glucosa, incrementándose además el nivel de lactato en el área en riesgo del ventrículo izquierdo, y acompañándose de una reducción en el tamaño del infarto (Aravindhan et al., 2015). Otro estudio que también apoyó el efecto protector de GLP-1, realizado en corazones aislados de rata demostró que el pretratamiento durante dos semanas con un inhibidor de la degradación de GLP-1, conseguía reducir el tamaño del infarto cuando eran perfundidos con alta concentración de glucosa, y no así con concentraciones fisiológicas. Además, este efecto protector era abolido por antagonistas del receptor de GLP-1 (Hausenloy et al., 2013b).

3.2.1 Agonistas del receptor para GLP-1 e inhibidores de DPP-4

El GLP-1 posee una vida media corta, inferior a dos minutos, pues es degradado rápidamente, de forma natural, por la enzima dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4) (Crepaldi et al., 2007). Para solventar este problema, y poder utilizar GLP-1 como herramienta terapéutica frente al daño por reperfusión, se han utilizado dos enfoques distintos: por un lado, desarrollar agonistas de los GLP-1R resistentes a la degradación por la DPP-4, y por otro lado, inhibidores de esta última enzima (Nauck, 2016).

Los agonistas del receptor GLP-1 se pueden dividir en los de acción corta (con vida media entre 2 y 4 horas) y los de acción prolongada (con vida media entre 12 horas y varios días) (Meier, 2012). Entre los de vida media corta se encuentran la exenatida y la lixisenatida, mientras que entre los de acción prolongada aparecen liraglutida, albiglutida, dulaglutida o exenatida-LAR (Meier, 2012; Gupta, 2013). La exenatida es una versión sintética de la exendina-4, una hormona peptídica hallada en 1992 en la saliva de un lagarto americano denominado Monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*, Cope 1869) (Eng et al., 1992; Goke et al., 1993). “Exendina”, etimológicamente, deriva de la contracción de los términos “exocrino” y “endocrino”, y hace referencia al hecho de que estos péptidos provienen de una glándula exocrina pero poseen funciones endocrinas (Sanggaard et al., 2015). La exendina-4 es capaz de activar el receptor del GLP-1, lo que conduce a la liberación de insulina (Goke et al., 1993).

La administración de estos agonistas en experimentos de isquemia-reperfusión ha dado lugar, en general, a efectos cardioprotectores, tanto cuando se administra antes como después de la isquemia. Así, se ha visto que la albiglutida, administrada antes de la isquemia, es capaz de reducir el tamaño del infarto, mejorar los parámetros hemodinámicos y la función cardiaca postisquémica, efectos asociados a un incremento en la captación de glucosa en un modelo de isquemia regional *in vivo* en rata (Bao et al., 2011). Por otro lado, en corazones aislados de rata el tratamiento con curaglutida durante la reperfusión redujo el desarrollo de hipercontractura y el tamaño del infarto (Salling et al., 2012). Igualmente, en un modelo porcino de oclusión coronaria

INTRODUCCIÓN

transitoria *in situ*, la exenatida, administrada justo antes de la reperfusión, logra reducir el infarto y mejorar la función cardíaca (Timmers et al., 2009). Finalmente, cabe comentar que los efectos protectores de los agonistas de los receptores GLP-1 se extienden más allá de la fase aguda del infarto. Así, en un modelo crónico de infarto de miocardio en ratón, la administración de exendina-4 a las 48 h de la oclusión coronaria mejora la función cardíaca, a la par que provoca una disminución en la fibrosis postinfarto, previniendo el remodelado cardíaco (DeNicola et al., 2014).

Por otra parte, los inhibidores de la enzima DPP-4 también son capaces de proteger frente al daño por isquemia-reperfusión. Es el caso de la linagliptina y el BI-14361, que suministrados como pretratamiento en un modelo de isquemia transitoria en ratas, redujeron significativamente el tamaño del infarto respecto a los controles (Hoche et al., 2013). También la vildagliptina, administrada intravenosamente en cerdos antes de una oclusión coronaria, no solo resultó en una disminución del tamaño del infarto, sino que además disminuyó el número de latidos ventriculares prematuros e incrementó el umbral necesario para desencadenar una fibrilación ventricular durante la isquemia (Chinda et al., 2013). Este efecto antiarrítmico de los inhibidores de DPP-4 lo compartirían con los agonistas del receptor del GLP-1, como la exendina-4, que son capaces de reducir la incidencia de arritmias ventriculares, disminuyendo la duración, el número, y la severidad de las mismas, durante la isquemia miocárdica (Kai et al., 2013).

A nivel clínico, se ha comprobado que la infusión intravenosa de exenatida iniciada 15 minutos antes de la reperfusión, fue capaz de reducir el tamaño del infarto en pacientes con SCAEST (n=172), revascularizados mediante angioplastia primaria, comparados con el grupo tratado con placebo (Lonborg et al., 2012a; Lonborg et al., 2012b). Posteriormente, el estudio EXAMI confirmó que la administración intravenosa de exenatida en 39 pacientes sometidos a revascularización coronaria percutánea, era segura y factible (Bernink et al., 2013), y se observó, a pesar de que el estudio no tenía poder estadístico para ello, una tendencia a un menor tamaño del infarto en los pacientes tratados con exenatida. Más allá, en un ensayo diferente (n=58), la inyección subcutánea conjuntamente a una infusión intravenosa de este análogo, como complemento a la terapia de reperfusión mediante angioplastia primaria, se asoció con una disminución significativa del tamaño del infarto y con una mejora de la función del ventrículo izquierdo (Woo et al., 2013).

3.3 OTRAS MOLÉCULAS DE INTERÉS COMO MODULADORAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MIOCÁRDICO

Además de los casos mencionados anteriormente, existen fármacos, como la trimetazidina, un inhibidor de la oxidación de ácidos grasos, capaces también de inducir un cambio en el metabolismo del miocardio, como se ha

demostrado en corazones aislados de rata (Kantor et al., 2000). Así, la administración de trimetazidina justo antes de la reperfusión es capaz de reducir el tamaño del infarto y de mejorar la función cardíaca en ratas sometidas, *in situ*, a isquemia regional seguida de reperfusión (Khan et al., 2010).

A pesar de la gran variedad de estrategias terapéuticas exploradas hasta el momento para hacer frente al daño por reperfusión, no cabe duda de que los tratamientos metabólicos con GIK o análogos del GLP-1 se encuentran entre los más prometedores para su posible investigación en pacientes con SCAEST. Ello es así debido a su relativa seguridad y a su facilidad de manejo, sustentada sobre todo por la experiencia obtenida en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo II.

4 Mecanismos endógenos de protección

Como respuesta evolutiva al daño miocárdico que se produce durante un episodio de isquemia transitoria seguido de reperfusión, los animales han desarrollado una serie de mecanismos innatos y potentes de protección endógena. Estos mecanismos endógenos se ponen en marcha mediante episodios transitorios y breves de isquemia-reperfusión, que confieren protección frente a uno más prolongado y letal (isquemia índice), y se conocen, de forma genérica, como maniobras de “condicionamiento isquémico” (Saxena et al., 2010). Desde su descubrimiento hasta hoy se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de sus efectos, mecanismos, y su aplicación clínica, aunque aún queda mucho por entender. Según el momento en el que se apliquen los ciclos breves de isquemia-reperfusión, estas maniobras se pueden dividir en preconditionamiento isquémico (cuando se aplican antes de la isquemia índice) o postcondicionamiento isquémico (cuando se aplican justo en el momento de la reperfusión), pudiéndose realizar, así mismo, en un órgano diferente al que se pretende proteger (condicionamiento remoto).

4.1 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

La primera observación relativa a este mecanismo de protección la realizaron Murry y colaboradores en un modelo canino, y data de 1986 (Murry et al., 1986). Estos autores advirtieron que la aplicación de 4 isquemias miocárdicas transitorias, de 5 minutos de duración, previas a una oclusión de 40 minutos de una arteria coronaria, lograba una reducción del 75% del tamaño del infarto. A este fenómeno se le denominó “precondicionamiento isquémico” (IPC), y como concepto es de los pocos que han sido ratificados por la mayor parte de la comunidad científica, habiéndose descrito efectos cardioprotectores en todos los modelos evaluados, desde cardiomiocitos hasta corazones aislados, así como en experimentos *in vivo*, y en una amplia variedad de especies, incluyendo ratón, rata, conejo, perro y cerdo (Przyklenk, 2013). Si bien el criterio principal para valorar la eficacia del IPC es su capacidad para reducir el tamaño del infarto, algunos estudios han demostrado también mejoría en otras variables de interés clínico, como sobre la función cardíaca tras la isquemia, con reducción del aturdimiento miocárdico postinfarto (Yellon and Downey, 2003), así como sobre la incidencia de arritmias ventriculares inducidas por la isquemia y/o la reperfusión (Taggart and Yellon, 2002; Saxena et al., 2010), aunque los efectos sobre estas variables secundarias son menos claros y existe cierta controversia (Ovize et al., 1995; Yellon and Downey, 2003).

INTRODUCCIÓN

La protección por IPC se presenta en dos fases claramente diferenciadas. Inicialmente, existe una primera ventana o fase temprana de protección, donde los efectos del IPC comienzan a notarse a los 5-15 minutos de la aplicación de los ciclos preconditionantes, durando su efecto entre 1 y 2 horas. Posteriormente, aparece una segunda ventana protectora que demora más en desarrollarse, pero que alcanza su máximo efecto hacia las 24 horas de la aplicación de los ciclos preconditionantes, pudiendo extenderse hasta los cuatro días siguientes (Saxena et al., 2010). Los mecanismos de ambas fases son diferentes: mientras que la fase temprana ocurre por modificaciones post-traduccionales de proteínas preexistentes, la fase tardía depende de la síntesis *de novo* de proteínas cardioprotectoras. Asimismo, el grado de protección que producen también puede ser distinto, habiéndose descrito que la primera ventana es mucho más eficaz limitando el tamaño del infarto, mientras que la segunda lo sería reduciendo el aturdimiento del miocardio (Bolli, 2007).

Para que la protección durante la fase temprana del IPC tenga lugar, se han de tener en cuenta algunas consideraciones temporales. En primer lugar, un régimen preconditionante de menos de 1-2 minutos de isquemia seguida de reperfusión es incapaz de producir un efecto protector (Schulz et al., 2001), mientras que aumentar la intensidad del episodio preconditionante, hasta los 15-20 minutos de isquemia, puede provocar un efecto contraproducente (Yamasaki et al., 1997). En segundo lugar, el intervalo entre el último episodio preconditionante y el inicio de la isquemia sostenida debe quedar comprendido entre los 5 y 15 minutos; prolongarlo más allá de una hora puede suponer la pérdida del efecto protector (Schulz et al., 2001). Por último, la propia duración de la isquemia sostenida debe ser tal que el daño producido por la misma no resulte excesivo, y por tanto, que permita encontrar tejido al que salvar (Przyklenk, 2013).

En cuanto a su aplicación en pacientes, y pese a que el preconditionamiento isquémico local ha demostrado ejercer una potente protección contra el daño por reperfusión en modelos experimentales, su propia naturaleza, que requiere de su aplicación antes del inicio de la isquemia, limita su práctica en la clínica (Schmidt et al., 2014a). Por esta razón, su utilización ha quedado prácticamente relegada a estrategias de cardioprotección durante intervenciones de cirugía cardíaca (Ghosh and Galiñanes, 2003), siendo pocos los estudios clínicos realizados, y sobre todo en el ámbito de la cirugía de *bypass* coronario. Así, en un pequeño ensayo con 30 pacientes sometidos a este tipo de cirugía, se observó un descenso significativo en la liberación de troponina-T a las 72 horas en aquellos casos en que se intervino con esta maniobra de preconditionamiento (Teoh et al., 2002). Sin embargo, el preconditionamiento isquémico local no ha sido evaluado en el contexto del

infarto agudo de miocardio, debido a la imposibilidad de aplicar un estímulo condicionante planificado (Fordyce et al., 2015).

4.1.1 Mecanismos de acción del IPC

Si bien el conocimiento referente a los mecanismos protectores del IPC es todavía incompleto, los últimos años de intensa investigación han permitido desarrollar un paradigma general (Yellon and Downey, 2003; Murphy and Steenbergen, 2008). Esencialmente, el preconditionamiento es un fenómeno que comienza con la liberación de uno o más factores desencadenantes por parte del área de tejido condicionado, que, o bien actuando a través de receptores de membrana acoplados a proteínas G o con actividad tirosina quinasa, o bien independientemente de receptores, activan múltiples y complejas cascadas de señalización. Estas cascadas mediadoras, formadas por un conjunto de proteínas citosólicas, principalmente proteínas quinasas, confluyen en una serie de efectores finales que, en último término, serán los responsables de desencadenar la respuesta cardioprotectora (Przyklenk, 2013).

Entre los desencadenantes dependientes de receptor, y probablemente los principales responsables endógenos de la cardioprotección por IPC, se ha descrito que la adenosina, la bradiquinina y los opioides, desempeñarían, dependiendo del modelo animal, un papel clave. De hecho, el bloqueo de sus receptores es capaz de abolir, dependiendo del modelo, la reducción del infarto inducida por el IPC (Heusch, 2015). Así mismo, otros agonistas neurohumorales pueden también preconditionar el corazón cuando se administran exógenamente, tales como norepinefrina, angiotensina, y endotelina, aunque se cree que estas sustancias no actuarían de forma endógena como desencadenantes de la protección, ya que no se liberan en cantidad suficientemente durante los ciclos preconditionantes (Schulz et al., 2001; Yellon and Downey, 2003). Una mención especial requieren los desencadenantes asociados a receptores con actividad tirosina quinasa, como los factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento tumoral (TGF- β 1) o la insulina (Hausenloy and Yellon, 2007). Por otro lado, también se ha descrito que hay moléculas, como es el caso de los radicales libres (Das et al., 1999) o como el NO, que actúan como desencadenantes de la protección por IPC de forma independiente de receptores (Schulz et al., 2001). Es importante destacar que el uso exógeno de muchas de estas sustancias ha permitido imitar, de forma farmacológica, el preconditionamiento isquémico. En cualquier caso, e independientemente de si la acción de los desencadenantes viene mediada por receptor o no, estos factores activarán en el cardiomiocito una serie de vías protectoras, fundamentalmente formadas por quinasas, como son las vías RISK, SAFE, y GMPc/PKG, mencionadas en el punto 2.10. Dentro de estas vías mediadoras, la PKA podría jugar un papel clave. Su activación es

INTRODUCCIÓN

capaz de retrasar la activación de las calpaínas durante la reperfusión, impidiendo el aumento de la fragilidad del sarcolema (Inserte et al., 2004). De hecho, se ha demostrado que la inhibición de la PKA con H89 es capaz de atenuar la protección por IPC en corazones aislados de rata, un efecto asociado con una menor degradación de proteínas estructurales, como α -fodrina (Inserte et al., 2004). Por otro lado, y a pesar de la existencia de estas vías, también se ha descrito la existencia de un mecanismo protector mitocondrial independiente de la señalización citosólica, que puede proteger frente al fallo respiratorio mitocondrial inducido por la isquemia y frente al daño oxidativo (Ruiz-Meana et al., 2014).

Independientemente de la vía mediadora implicada, todas ellas acaban actuando sobre uno o más efectores finales más o menos comunes. Entre los candidatos propuestos se encuentran los canales de K^+ ATP-dependientes de la mitocondria (mitoK_{ATP}), cuya función se encuentra inhibida a concentraciones fisiológicas de ATP. Se ha sugerido que su apertura durante los ciclos preconditionantes podría hacer más resistente a la mitocondria a la entrada de Ca^{2+} (Holmuhamedov et al., 1999), o bien prevenir la apertura del mPTP durante la reperfusión (Hausenloy et al., 2002). La Cx43 mitocondrial podría ser, así mismo, otro efector final de la protección (Ruiz-Meana et al., 2008; Schulz et al., 2015). Aunque los mecanismos que conectan la presencia de Cx43 en la mitocondria con la cardioprotección por IPC no son conocidos, se ha sugerido que puede interaccionar con varios elementos claves del daño por isquemia-reperfusión, incluyendo los propios mitoK_{ATP} o el mPTP (Ruiz-Meana et al., 2008; Schulz et al., 2015). La Cx43 se encuentra localizada en la membrana interna de la mitocondria, donde controla los flujos de K^+ en este orgánulo (Miro-Casas et al., 2009), y se sabe que la reducción en la expresión de Cx43 mitocondrial se asocia a pérdida de la eficacia cardioprotectora del IPC (Rodríguez-Sinovas et al., 2006a). De hecho, la Cx43 mitocondrial podría jugar un papel importante en la protección mitocondrial independiente de la activación de las cascadas de señalización citosólicas mencionadas anteriormente (Ruiz-Meana et al., 2014).

Sin embargo, los candidatos más ampliamente aceptados como efectores finales de la protección por IPC son la hipercontractura que ocurre durante la reperfusión, la fragilidad celular y la apertura del mPTP. Así, por ejemplo, la activación de la vía GMPc/PKG aumenta la captación de Ca^{2+} por parte del retículo sarcoplasmático, reduciendo de esta manera las oscilaciones de Ca^{2+} , disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos a este catión, y por tanto, la aparición de hipercontractura (García-Dorado et al., 2006). Por otro lado, el IPC reduce la fragilidad del sarcolema, debido a la inhibición de las calpaínas mediada por PKA (Inserte et al., 2012), y del citoesqueleto, acción, esta última, mediada por la activación de la quinasa p38 MAPK (Yellon and

Downey, 2003). Asimismo, la activación de la vía GMPc/PKG puede conducir a inhibición del mPTP por activación secuencial de PKC- ϵ 1 y GSK3 β (García-Dorado et al., 2006; Ferdinandy et al., 2007). Además, se ha demostrado que la activación de STAT3 también inhibe la apertura del mPTP (Boengler et al., 2010; Szczepanek et al., 2015).

4.2 POSTCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

A pesar de la importancia del descubrimiento del IPC, su utilización clínica como estrategia terapéutica en pacientes con isquemia miocárdica ha sido bastante limitada. Ello se debe a que al tratarse de un pretratamiento sólo puede utilizarse en situaciones en las que la aparición de la isquemia sea previsible, como puede ser en el caso de la cirugía cardíaca o durante un trasplante, pero no en pacientes con SCAEST. Sin embargo, en 2003 se demostró, en un modelo de corazón canino *in situ*, que la aplicación de varios episodios de isquemias breves efectuados en el momento de la reperfusión lograban reducir el tamaño del infarto en la misma medida en que lo conseguía el IPC. A este fenómeno se le denominó “postcondicionamiento isquémico” (IPoC) (Zhao et al., 2003). Para que esta maniobra sea eficaz protegiendo frente al daño por reperfusión, es imprescindible que la primera reoclusión de la arteria coronaria se realice inmediatamente después del inicio de la reperfusión, en apenas unos segundos, puesto que el retraso de un solo minuto provoca la pérdida de eficacia en la reducción del tamaño del infarto (Cohen and Downey, 2011). Otro requisito de un protocolo estándar de IPoC es que, a diferencia del IPC, la duración de los ciclos postcondicionantes de isquemia-reperfusión es más corta. Generalmente se realizan de 3 a 6 ciclos, con una duración de 10-60 segundos (Przyklenk, 2013). La efectividad del postcondicionamiento isquémico reduciendo el tamaño del infarto ha sido demostrada en diversos modelos experimentales, como en rata (Inserte et al., 2011a), conejo (Chiari et al., 2005) o cerdo (Rodríguez-Sinovas et al., 2009).

El primer estudio piloto en clínica con postcondicionamiento local, se publicó en 2005 (Staat et al., 2005), incluyendo 30 pacientes con SCAEST sometidos a angioplastia primaria. Se halló una reducción significativa en la liberación de creatina quinasa en aquellos pacientes en los que se realizó la maniobra de postcondicionamiento, mediante 4 ciclos de inflado y desinflado del balón de angioplastia (Staat et al., 2005). Desde este ensayo, el postcondicionamiento isquémico ha demostrado reducir el tamaño del infarto (mediante biomarcadores o técnicas de imagen) en la mayoría de los estudios clínicos acometidos, apoyando, por tanto, esta observación inicial (Przyklenk, 2013; Heusch, 2013). Más allá, incluso en uno de los ensayos (n=38) se observó beneficio a largo plazo: un año después de la intervención, el grupo postcondicionado mostró un incremento del 7% en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, comparado con el grupo control (p=0.04) (Thibault et al.,

2008). Sin embargo, existen algunos estudios contradictorios. Así, el ensayo POST (n=700) no fue capaz de demostrar ningún beneficio en el grupo sometido a postcondicionamiento, realizado inmediatamente tras la angioplastia primaria (Hahn et al., 2013). De igual manera, en el ensayo POSTEMI (n=272), el postcondicionamiento tampoco redujo de forma significativa el tamaño del infarto en pacientes con SCAEST (Limalanathan et al., 2014).

4.2.1 Mecanismos de acción del IPoC

Tanto el postcondicionamiento como el preconditionamiento comparten, en gran medida, las mismas vías de protección. Al igual que pasaba con el IPC, los ciclos postcondicionantes provocan la liberación de una serie de mediadores al torrente sanguíneo, que estimulan a sus correspondientes receptores asociados a proteínas G, con la consiguiente activación de una o más cascadas de señalización (Hausenloy and Yellon, 2009). Las principales vías mediadoras implicadas en la protección por IPoC han sido, al igual que en el IPC, las vías RISK, SAFE y GMPc/PKG, que acabarían confluyendo a nivel mitocondrial, inhibiendo, principalmente, la apertura del mPTP (Przyklenk, 2013). Sin embargo, en el caso del postcondicionamiento cabe destacar que una parte importante de la protección puede ser debida a que retrasa la recuperación del pH intracelular durante la reperfusión, prolongando la acidosis durante los primeros minutos de la misma (Inserte et al., 2009), y permitiendo, por tanto, la persistencia de un factor cardioprotector clave durante esta fase (Rodríguez-Sinovas et al., 2009). El retraso en la recuperación del pH intracelular puede explicarse, al menos en parte, porque los ciclos breves de isquemia-reperfusión reducen el lavado de lactato y otros metabolitos, ayudando así a mantener la acidosis (Inserte and García-Dorado, 2015). Además, se ha sugerido que la activación de la PKG inhibe la actividad del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática. Así, la inhibición farmacológica de la vía GMPc/PKG consiguió abolir los efectos protectores del IPoC en corazones aislados de rata sometidos a 40 minutos de isquemia global seguida de reperfusión, efecto asociado a una aceleración de la recuperación del pH_i (Inserte et al., 2011a).

Por otro lado, es importante remarcar que el IPoC es capaz de activar la vía del GMPc/PKG de forma independiente de la activación de Akt, y dependiente de la reducción del estrés oxidativo durante la reperfusión (Inserte et al., 2013). Así, en corazones aislados de rata se demostró que la atenuación de la producción de O_2^- por el IPoC al inicio de la reperfusión, lograba limitar la oxidación de BH_4 , y por tanto reducía el desacoplamiento de eNOS, incrementando así la activación de la vía GMPc/PKG dependiente de NO (Fig. 6). Además, también se ha visto que el IPoC reduce la actividad de SERCA al inicio de la reperfusión, debido a un retraso en la fosforilación de

phospholamban (PLB), efecto a su vez mediado por activación de PKG e inhibición de PKA y de CaMKII (Inserte et al., 2014). Este efecto contribuiría a la protección por IPoC, favoreciendo la extrusión del calcio citosólico a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal (Inserte et al., 2014).

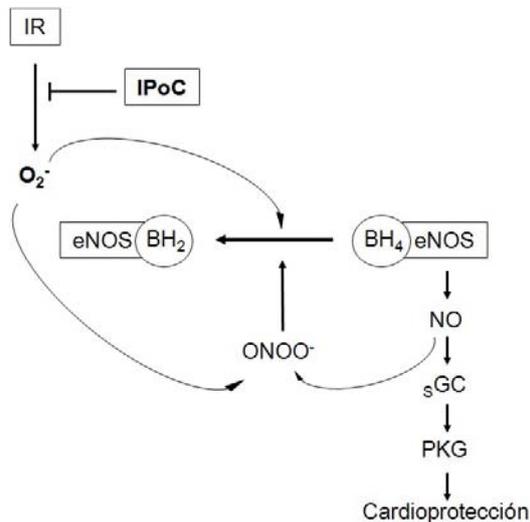


Figura 6. Mecanismo propuesto para la activación de la vía GMPc/PKG dependiente de NO por el IPoC. El IPoC atenúa la producción de O_2^- generado al inicio de la reperfusión, reduciendo el estrés oxidativo y el desacoplamiento de eNOS. NO, óxido nítrico; ONOO^- , peroxinitrito; O_2^- , superóxido; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; BH_4 , tetrahidrobiopterina; sGC, guanilil ciclasa soluble adenilato. Tomado de (Inserte et al., 2013).

4.3 CONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO REMOTO

Tras la aparición en escena del preconditionamiento isquémico, Przyklenk y colaboradores describieron, en 1993, en un modelo de corazón *in situ* canino, que la aplicación de isquemias transitorias en el territorio de una arteria coronaria, era capaz de reducir los efectos deletéreos de una isquemia más prolongada en un territorio remoto, irrigado por una arteria coronaria distinta (Przyklenk et al., 1993). Se trataba, por tanto, de la primera descripción de una maniobra conocida como “preconditionamiento isquémico remoto”, en este caso, intraórgano. Estudios posteriores permitieron confirmar que estas isquemias transitorias podían aplicarse también a un órgano distante, y diferente al que se pretende proteger, con el hallazgo de que el tamaño del infarto de miocardio podía ser reducido mediante la aplicación de episodios breves de isquemia-reperfusión en el riñón o a nivel intestinal, aplicados inmediatamente antes de la isquemia miocárdica (Gho et al., 1996; Hausenloy and Yellon, 2008). Más tarde se descubrió que era posible aplicar esta maniobra no sólo antes de la isquemia miocárdica prolongada, sino también en el momento de la reperfusión (Kerendi et al., 2005) (postcondicionamiento isquémico remoto) o incluso durante la propia isquemia (percondicionamiento isquémico remoto) (Schmidt et al., 2007). Independientemente del momento de aplicación, el hecho más interesante desde el punto de vista clínico es que los ciclos condicionantes pueden también aplicarse en una extremidad corporal, mediante el inflado y desinflado de un manguito de presión (Andreka et al., 2007). La eficacia del condicionamiento remoto reduciendo el tamaño del infarto se ha demostrado en varias especies, incluyendo rata (Gircz et al., 2014) o cerdo (Andreka et al., 2007).

INTRODUCCIÓN

En general, el “condicionamiento isquémico remoto” (RIC) es una maniobra no invasiva y fácil de realizar en la clínica, y es segura, efectiva y económica, lo cual la convierte en un firme candidato para su traslación en pacientes con SCAEST (Heusch et al., 2015). El protocolo estándar consiste en 3-4 ciclos de isquemia y reperfusión, de 5 minutos de duración, aplicados en un brazo o pierna. Sin embargo, el algoritmo más efectivo aún no ha sido identificado (Przyklenk, 2013; Heusch et al., 2015).

Desde el punto de vista clínico, el RIC, ejercido en un órgano o tejido distante al cardíaco, podría resultar más interesante que el IPC o el IPoC (Heusch et al., 2015). Mientras que el condicionamiento isquémico local es una técnica invasiva, que requiere disponer de un laboratorio de hemodinámica con capacidad para acceder al vaso coronario de forma percutánea, el RIC se puede hacer de forma sencilla, incluso en una ambulancia, mediante ciclos de hinchado y deshinchado de un manguito colocado en alguna extremidad, anterior o inferior, del paciente (Heusch et al., 2015).

La primera aplicación clínica del preconditionamiento isquémico remoto (n=57), demostró una reducción significativa en la liberación de troponina-T a 6, 12, 24, 48 y 72 horas de la intervención, en pacientes sometidos a cirugía de *bypass* coronario (Hausenloy et al., 2007). Igualmente, en un ensayo más amplio (n=329), se observó una mejoría en los pacientes que fueron intervenidos con esta misma cirugía (Thielmann et al., 2013). En este caso, además de la reducción en la liberación de troponina-I perioperativa, también se halló una reducción en la mortalidad cardíaca, mortalidad por cualquier causa y en eventos cardíacos y cerebrovasculares adversos (MACCE, variable compuesta por mortalidad por cualquier causa, infarto de miocardio, reingreso por insuficiencia cardíaca e ictus isquémico transitorio), tras un periodo de seguimiento de 1.5 años desde la intervención (Thielmann et al., 2013). Además, el ensayo CRISP-Stent, con 192 pacientes sometidos a ciclos de condicionamiento remoto antes de una angioplastia electiva, también resultó en una marcada reducción de la liberación de troponina cardíaca, así como en una disminución de eventos cardíacos adversos mayores a largo plazo, 6 años después de la intervención (Davies et al., 2013). No obstante, dos recientes meta-análisis (Hausenloy et al., 2015; Meybohm et al., 2015) (n=1612 y n=1403, respectivamente) no parecen haber hallado mejoras en las principales variables clínicas en pacientes sometidos a cirugías cardíacas electivas. En estos casos, las principales variables fueron compuestas, como la constituida por eventos cardíacos adversos (Hausenloy et al., 2015), o como la formada por muerte por cualquier causa, infarto de miocardio no fatal, nuevo accidente cerebrovascular e insuficiencia renal aguda (Meybohm et al., 2015).

Sobre el preconditionamiento remoto, esto es, el comienzo de los ciclos de RIC durante el periodo de la isquemia, existe un estudio pionero en

aplicarlo en pacientes con SCAEST (n=333) durante su traslado en ambulancia hacia el hospital (Botker et al., 2010). En este ensayo se realizó la maniobra de RIC mediante el inflado y desinflado de un manguito de presión colocado sobre el antebrazo del paciente, como complemento a la angioplastia primaria, en el centro médico correspondiente. Los resultados fueron esperanzadores tanto porque el RIC mejoró de forma significativa la cantidad de miocardio salvado, determinado mediante SPECT a los 30 días del evento isquémico, como por tratarse de una técnica no invasiva, segura y poco costosa. El beneficio del RIC persistió a largo plazo, con mejoría clínica en la variable compuesta de eventos cardiacos y cerebrovasculares adversos (MACCE), a los 4 años de la intervención (Sloth et al., 2014). Más recientemente, y de la misma forma, en otro estudio clínico en 197 pacientes con SCAEST, también se halló una reducción significativa del tamaño del infarto, determinado mediante resonancia magnética cardiaca a los 3-6 días de la intervención (White et al., 2015). La maniobra del RIC también se inició con anterioridad a la reperfusión y durante la misma.

En cuanto al postcondicionamiento remoto, un ensayo (n=100) en pacientes con SCAEST anterior, en el que se empleó la maniobra RIC a la vez que la reperfusión miocárdica con angioplastia primaria, también consiguió buenos resultados, reduciendo la liberación enzimática asociada al infarto (Crimi et al., 2013). Sin embargo, otro estudio realizado en 360 participantes con angina estable o inestable, no encontró diferencias significativas en la variable principal, la liberación de troponina-T, tras el procedimiento (Lavi et al., 2014). Se ha propuesto que la principal causa que explicaría este resultado negativo en este último estudio, sería el retraso excesivo en la aplicación de la maniobra de postcondicionamiento remoto, que se comenzó hasta 25 minutos después de la intervención coronaria percutánea (Lavi et al., 2014). Este hecho podría asociarse con que la ventana para la cardioprotección pudiera encontrarse cerrada tras ese tiempo, lo que llevaría a plantear diseños de ensayos clínicos optimizando el intervalo necesario para que aquella se produzca (Fordyce et al., 2015).

4.3.1 Mecanismos de acción del RIC

Durante los últimos años se han propuesto, como mínimo, dos teorías distintas, que no son mutuamente excluyentes, para explicar la generación de la señal cardioprotectora del RIC y su transporte desde el tejido remoto hasta el corazón: por un lado la liberación de factores humorales por parte del tejido condicionado que son liberados al torrente sanguíneo, y por otro la activación de fibras nerviosas sensoriales en el órgano periférico, que activan la inervación autonómica cardíaca a través del sistema nervioso central (Heusch, 2015). En cualquier caso, las cascadas mediadoras de la cardioprotección que

INTRODUCCIÓN

se ponen en marcha a nivel cardíaco son similares a las descritas para el preconditionamiento isquémico (Sivaraman et al., 2015).

La posibilidad de que algún factor humoral, liberado por el tejido condicionado, fuese responsable de la cardioprotección por RIC, fue inicialmente sugerida en estudios que demostraron que la administración del efluente coronario de un corazón preconditionado, era capaz de inducir protección en otro órgano sometido a isquemia-reperusión (Dickson et al., 1999). Esta protección se mantiene incluso cuando ambos órganos son de especies diferentes, como se pudo demostrar en un estudio en el que el plasma sanguíneo o su dializado, obtenido tras la aplicación de ciclos condicionantes en una extremidad en humanos, era capaz de proteger frente al infarto en corazones aislados de conejo (Shimizu et al., 2009). Si bien el mediador humoral liberado durante los ciclos de RIC no es conocido, sí se han propuesto varios candidatos. Mediante aproximaciones proteómicas aplicadas sobre el plasma de voluntarios sanos sometidos a RIC (Hepponstall et al., 2012), se han podido identificar diferencias en el nivel de expresión de determinados péptidos. Por otro lado, unas de las moléculas mediadoras de la protección del RIC podrían ser los nitritos, pues se ha visto que la administración de sulfanilamida (molécula secuestradora de nitritos) abolía los efectos cardioprotectores del plasma de voluntarios sometidos a RIC, cuando fue utilizada para perfundir corazones aislados de ratón en un ensayo de Langendorff (Rassaf et al., 2014). Además, en ratones genéticamente modificados deficientes para eNOS, también se perdía la protección inducida por RIC (Rassaf et al., 2014). Otro posible mediador podría ser el microRNA-144, ya que, mediante técnicas de *microarray*, se ha comprobado el aumento de sus niveles en el miocardio de ratón tras ser sometido a RIC, así como su descenso significativo provocado por el daño por isquemia-reperusión (Li et al., 2014a). Además, los efectos del RIC reduciendo el tamaño del infarto en corazón aislado de ratón fueron abolidos por la administración del antagomir específico para microRNA-144 (Li et al., 2014a). La protección inducida por el RIC podría deberse, así mismo, a la liberación de exosomas o vesículas extracelulares desde el tejido condicionado, que actuarían como transportadores de las señales cardioprotectoras, bien sean estos microRNAs, que quedarían así protegidos de su degradación por las RNAsas plasmáticas, o bien otro tipo de mediadores (Gircz et al., 2014).

La participación de vías nerviosas en la protección inducida por RIC se basa en la hipótesis de que los ciclos breves de isquemia-reperusión en un órgano periférico podrían activar un reflejo neural que protegiera al miocardio contra una isquemia prolongada (Aimo et al., 2015). La transducción de la señal desde el órgano remoto hasta el cardíaco implicaría al sistema somatosensorial, la médula espinal, y el sistema nervioso autónomo (Heusch et al.,

2015). Así, en protocolos *in vivo* llevados a cabo en conejo, sometidos a isquemia-reperfusión miocárdica, la administración de un bloqueante nervioso sensorial como el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (Redington et al., 2012), o la sección del nervio femoral (Steensrud et al., 2010), nervio ciático, vago o médula espinal (Donato et al., 2013), fueron capaces de abolir la protección otorgada por la maniobra del RIC frente al tamaño del infarto. Asimismo, se ha propuesto que la activación del nervio vago, con la consiguiente liberación de acetilcolina, pondría en marcha una cascada endógena en los cardiomiocitos, por acción sobre sus receptores muscarínicos, que resultaría en la estimulación de eNOS y por tanto en el incremento de GMPc (Donato et al., 2013). En resumen, el daño local ocasionado por el RIC, activaría esta vía neural a través de la estimulación de fibras aferentes sensoriales de la extremidad remota, que mandarían una señal hacia la médula espinal para activar tanto al nervio vago como a eferentes simpáticos, para finalmente liberar sustancias cardioprotectoras en el propio órgano diana (Heusch et al., 2015). Los mecanismos humoral y nervioso podrían estar, en parte, interconectados, ya que se ha demostrado que el efecto protector que ejerce el plasma de personas sometidas a la maniobra de RIC sobre corazones aislados de conejo, puede desaparecer si el plasma procede de pacientes con neuropatía periférica (Jensen et al., 2012).

5 Dificultades en la traslación de los tratamientos cardioprotectores a pacientes con SCAEST y posibles soluciones

A la vista de los datos expuestos anteriormente sobre los ensayos clínicos utilizados para reducir el daño por reperfusión en pacientes con SCAEST se desprende que una gran parte de las estrategias terapéuticas investigadas no han sido capaces, desafortunadamente, de cumplir con las expectativas que sobre ellas se habían depositado (Gerczuk and Kloner, 2012; Vander Heide and Steenbergen, 2013). Las únicas excepciones, como ya se ha descrito, parecen ser los tratamientos de cardioprotección endógena mediante técnicas de condicionamiento isquémico, y algunas estrategias farmacológicas como los β -bloqueantes o los tratamientos metabólicos.

Diversas son las razones que pueden explicar el fallo más o menos generalizado en la traslación a la práctica clínica de los beneficios encontrados en modelos experimentales. Entre ellas se incluyen algunas dependientes de la propia fase preclínica, como la falta de robustez de los beneficios explorados (Ibañez et al., 2015; Hausenloy et al., 2016). Además, en los estudios experimentales, los investigadores minimizan al máximo la varianza de diversos factores con el objeto de centrar la atención en los efectos de un determinado tratamiento; esto es, se utilizan determinados modelos animales bajo unos parámetros homogéneos como la cepa, el sexo, el peso, la dieta, el protocolo experimental, el horario de los procedimientos o el buen estado de salud. Sin embargo, la población humana susceptible de ser tratada es muy heterogénea. La dieta es distinta, pueden tomar medicación para otras enfermedades (provocando interferencias con los fármacos testados en los ensayos) (Birnbbaum et al., 2015; Hausenloy et al., 2016), e incluso se desconoce el tiempo definido de la duración de la isquemia (Vander Heide and Steenbergen, 2013). Más importantes aún son las diferencias en el sexo, la edad y las comorbilidades asociadas, como la diabetes, la obesidad o la hipercolesterolemia, que en muchos casos modifican la eficacia de las maniobras cardioprotectoras (Sack and Murphy, 2011). Por lo tanto, el elevado número de variables reduce las posibilidades de encontrar significación estadística ante los beneficios de un tratamiento, ya que sus efectos pueden quedar enmascarados por la mencionada variabilidad (Vander Heide and Steenbergen, 2013).

En general, sería útil revisar y optimizar el enfoque clínico del tratamiento cardioprotector. Hausenloy y colaboradores, proponen tres premisas para ello (Hausenloy et al., 2016). En primer lugar, una selección más

rigurosa de la terapia, pues se ha visto que muchos ensayos clínicos podrían haber fallado debido a que algunos de los datos experimentales son insuficientes o inconsistentes, a la falta de pruebas previas en organismos mayores, o a que los animales son frecuentemente jóvenes, sin enfermedades ni medicación adicionales. En segundo lugar, una mejora en el diseño del ensayo clínico, tanto en la selección de pacientes, como en la dosis y el tiempo de la intervención (con el fin de conseguir suficiente concentración del tratamiento en sangre durante los primeros minutos de la reperfusión). La última proposición es la del uso de terapias combinadas, como describiremos a continuación (Hausenloy et al., 2016).

Precisamente frente a este desafío, como hemos mencionado, una posibilidad interesante para aumentar la eficacia de las maniobras cardioprotectoras sería la de utilizar terapias combinadas. La razón que fundamentaría la utilización de este tipo de terapias frente a las intervenciones simples, podría resumirse en tres premisas. En primer lugar, dos tratamientos (o más de dos) podrían desarrollar efectos beneficiosos sinérgicos, en tanto en cuanto los mecanismos de acción responsables de dichos efectos ocurriesen por activación de vías independientes. En segundo lugar, serían útiles en los casos en que las dosis máximas de cada procedimiento no pudieran ser aplicadas (como por falta de tiempo para poder aplicar un protocolo de RIC completo). Por último, una terapia conjunta podría ser conveniente cuando las comorbilidades o la medicación para otras enfermedades pudieran reducir la eficacia de alguno de los tratamientos que forme parte de esa combinación.

No obstante, a día de hoy esta posibilidad no ha sido lo suficientemente explotada. Se han realizado algunos estudios tratando de encontrar sinergias entre el beneficio obtenido por distintas estrategias de condicionamiento isquémico pero, de nuevo, los resultados no siempre han sido esperanzadores. Así, en el ensayo RIPOST-MI se evaluó, en un total de 151 pacientes con SCAEST, la eficacia del percondicionamiento remoto solo o en combinación con el postcondicionamiento local como tratamientos adjuntos a la angioplastia primaria (Prunier et al., 2014). El tamaño del infarto, correlacionado con la liberación de creatina quinasa-MB a las 72 horas de la intervención, fue menor en todos los casos con respecto al control, pero la combinación de ambas estrategias no consiguió una mayor reducción del infarto que el percondicionamiento por separado (Prunier et al., 2014). Además, no se constituyó un grupo que exclusivamente recibiera postcondicionamiento, con lo que no sabemos cuál hubiese sido su efecto aisladamente. Otro caso es el ensayo LIPSIA (n=696) (Eitel et al., 2015), en el que se observó un aumento del índice de miocardio salvado en los pacientes con SCAEST tratados con la combinación de RIC y postcondicionamiento isquémico local junto a la

angioplastia primaria. Sin embargo, el postcondicionamiento sólo no logró el aumento del miocardio salvado (Eitel et al., 2015). Igualmente, no se constituyó un grupo que exclusivamente recibiera RIC como adjunto a la terapia de la angioplastia primaria. En el ámbito experimental, otro estudio también combinó ambas estrategias de condicionamiento (RIC y postcondicionamiento isquémico local), sobre un modelo de isquemia-reperusión *in vivo* en corazón de rata (Sachdeva et al., 2014), pero en este caso, ni cada maniobra por separado ni la combinación de ambas, fueron capaces de reducir el tamaño del infarto respecto al grupo control. Sin embargo, hay que destacar que todos estos estudios podrían incumplir la primera premisa mencionada anteriormente, ya que, como hemos comentado antes, los mecanismos de las estrategias combinadas podrían ser similares.

Por otro lado, la combinación de un tratamiento farmacológico junto con otro que desencadene protección endógena (como es el caso del mencionado condicionamiento), ha sido muy poco investigada hasta la fecha, y generalmente sobre modelos animales. En un modelo de corazón aislado de rata, antes de extraer el corazón se llevó a cabo un pretratamiento farmacológico con fasudil, un inhibidor de la Rho quinasa, componente de una vía de señalización que desempeña un papel deletéreo en el daño por isquemia-reperusión miocárdico (Li et al., 2014b), junto con un protocolo de postcondicionamiento isquémico tras la isquemia-reperusión global. Se observó que ambos tratamientos, de manera independiente, reducían el tamaño del infarto significativamente y que, además, la combinación de ambas estrategias lograba una reducción del infarto sinérgica, más potente que cada tratamiento por separado (Li et al., 2014b). En otro trabajo experimental, sobre un modelo de isquemia-reperusión en corazón neonatal porcino, se investigó la combinación de preconditionamiento remoto y administración de glucosa e insulina antes de la isquemia (Schmidt et al., 2014b). Pese a que la combinación de ambas estrategias sí logró reducir significativamente el tamaño del infarto, el grupo únicamente preconditionado mostró una tendencia al aumento del área necrótica con respecto al grupo control, e incluso fue significativamente mayor en el grupo tratado con glucosa e insulina.

Por todo lo expuesto anteriormente, esta tesis doctoral pretende investigar los posibles efectos cardioprotectores, frente al daño por reperusión, de una estrategia terapéutica basada en la combinación de dos tratamientos con mecanismos de acción distintos: por un lado, los mecanismos de cardioprotección endógena, como el RIC, que en principio dependen de la activación de cascadas citosólicas de cardioprotección a nivel miocárdico, y por otro lado, los tratamientos con agentes moduladores del metabolismo miocárdico, como la administración de una solución de GIK o el tratamiento con agonistas de los receptores GLP-1, como la exenatida. La elección de estas

INTRODUCCIÓN

dos estrategias se basa en sus efectos positivos sobre el tamaño del infarto en estudios clínicos recientes (Botker et al., 2010; Selker et al., 2012; Lonborg et al., 2012a), y en la relativa seguridad y sencillez de la aplicación de ambos tratamientos. Los efectos sobre el tamaño del infarto de esta combinación no han sido descritos previamente. Adicionalmente, investigaremos los mecanismos responsables de los posibles efectos cardioprotectores de los tratamientos propuestos, tanto cuando se administran de forma separada como en combinación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El tratamiento combinado mediante condicionamiento isquémico remoto y agentes moduladores del metabolismo miocárdico es capaz de ejercer, debido a sus diferentes mecanismos de acción, efectos cardioprotectores aditivos frente al daño por reperfusión, superiores al de las intervenciones por separado.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis son:

1. Determinar si las intervenciones sobre el metabolismo de la glucosa tienen un efecto aditivo sobre la cardioprotección obtenida mediante condicionamiento isquémico remoto en un modelo de corazón porcino *in situ* sometido a oclusión coronaria transitoria.
2. Establecer los mecanismos responsables de la protección inducida por las intervenciones sobre el metabolismo de la glucosa, y la relación de éstos con los causantes de la protección por condicionamiento isquémico remoto, en un modelo de corazón porcino *in situ*.
3. Analizar los mecanismos humorales que subyacen al efecto protector del condicionamiento isquémico remoto, así como su eficacia cardioprotectora en un modelo de isquemia-reperfusión en corazón aislado de una especie animal distinta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de corazón porcino *in situ*

1.1 ANIMALES E INSTRUMENTACIÓN

El presente estudio se ajusta a la normativa nacional y europea sobre protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo). El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Institut de Recerca Vall d'Hebron de Barcelona (números de referencia: 53/11 CEEA y 13/15 CEEA).

En este estudio se utilizaron 46 cerdos macho de granja, de raza híbrida (*Sus scrofa domestica* Lineo, 1758), con un peso medio de 25-30 Kg, y que habían estado en ayunas durante las 12 horas previas a la cirugía. Los animales fueron premedicados con tiletamina-zolazepam (4-6 mg/Kg, IM) y xilacina (1-2 mg/Kg, IM), anestesiados con propofol-lipuro 1% (1.5-2.5 mg/Kg, IV, seguido de una infusión continua de 11 mg/Kg/h) y con fentanilo (5 µg/Kg, IV, seguido de una infusión continua de 3-6 µg/Kg/h), e intubados, manteniéndose la respiración pulmonar mediante un sistema ventilador Puritan Bennett 7200 (*Puritan Bennett Corporation*, Carlsbad, California, Estados Unidos) con una concentración de oxígeno de aproximadamente un 40%. La arteria y vena femoral izquierda fueron canuladas para obtener la presión aórtica (AP) y para recoger muestras de sangre, respectivamente. La arteria femoral derecha fue disecada y rodeada con un lazo de goma elástica, que se utilizó para realizar la maniobra de condicionamiento isquémico remoto. A continuación se procedió a exponer el corazón, mediante esternotomía media y apertura del pericardio, que se suturó a los bordes de la esternotomía para así mejorar el acceso al órgano. La arteria coronaria descendente anterior izquierda (DA, Descendente Anterior) fue disecada en su punto medio, por debajo de la primera rama diagonal, y rodeada con un lazo de goma elástica. Este punto de disección se utilizó para realizar la oclusión de la arteria coronaria mediante ligadura (Fig. 7-E), mientras que un segundo punto de disección, localizado un centímetro distal al primero, se utilizó para medir el flujo sanguíneo coronario (Fig. 7-D) (Rodríguez-Sinovas et al., 2009).

Los gases arteriales fueron monitorizados durante todo el procedimiento experimental, y mantenidos dentro de los límites normales. Se registró, de forma continua, en un ordenador, la derivación II del electrocardiograma (ECG) para monitorizar la frecuencia cardíaca y la presencia de arritmias ventriculares. En el caso de que estas fuesen malignas (fibrilación ventricular o taquicardia ventricular sostenida que comprometiese

MATERIALES Y MÉTODOS

los parámetros hemodinámicos del animal), se revirtieron mediante desfibrilación interna a 30 Julios. Las pérdidas de líquidos se compensaron mediante administración intravenosa de suero fisiológico (10 ml/kg/h). Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentotal sódico (100 mg/Kg, IV).

1.2 REGISTRO DE PRESIONES AÓRTICA Y VENTRICULAR

La presión aórtica se registró mediante un catéter relleno de suero fisiológico, conectado, por un extremo a la cánula introducida en la arteria femoral izquierda, y por el otro, a un transductor de presión (*Coulbourn Instruments*, Lehigh Valley, Estados Unidos). La presión del ventrículo izquierdo (PVI) y su derivada (dP/dt VI) fueron determinadas utilizando un transductor de presión *Millar SPR-350 Mikro-Tip* (*Millar Instruments, Inc*, Texas, Estados Unidos) colocado, por punción desde el ápex cardiaco, en el interior del ventrículo izquierdo (Fig. 7-C) (Rodríguez-Sinovas et al., 2009).

1.3. DETERMINACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO CORONARIO

Para la medida del flujo sanguíneo se utilizó un medidor de flujo por ultrasonidos (*Transonic System Inc, modelo T206, New York, Estados Unidos*), situado alrededor de la DA en el punto de disección distal (Fig. 7-D).

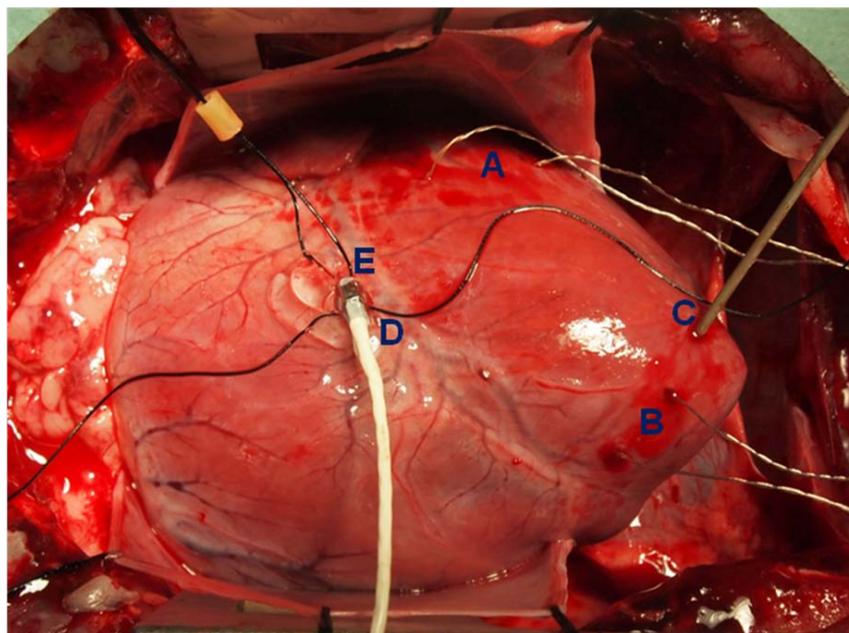


Figura 7. Imagen de un corazón porcino tras la apertura del pericardio y su instrumentación. **A**, Par de cristales en la zona control del miocardio. **B**, Par de cristales en el área en riesgo del miocardio. **C**, Transductor de presión *Millar* en el ápex. **D**, Punto de disección de la coronaria DA con un medidor de flujo sanguíneo. **E**, Punto de disección de la coronaria DA para realizar la oclusión mediante ligadura.

1.4 FUNCIÓN REGIONAL DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO

La contractilidad regional del miocardio se determinó utilizando dos pares de cristales piezoeléctricos hemisféricos (1 mm de diámetro) de poliestireno insertados, por punción, en el tercio interior de la pared ventricular izquierda. Los dos cristales de cada par fueron situados a aproximadamente 1 cm de distancia, perpendicularmente al eje largo del ventrículo izquierdo. Uno de los pares fue implantado en el miocardio susceptible de quedar en isquemia (área en riesgo) (Fig. 7-B), mientras que el otro par se colocó en una zona control del ventrículo izquierdo (Fig. 7-A).

La longitud telesistólica (LTS) y la longitud telediastólica (LTD) fueron identificadas en los registros, y la fracción de acortamiento sistólica (AS) fue calculada a partir de la ecuación $AS = (LTD - LTS) / LTD$. Las medidas telediastólicas fueron tomadas en el punto en que la dP/dt positiva comenzaba su ascenso, mientras las dimensiones telesistólicas se tomaron 20 ms antes del punto más bajo de la dP/dt negativa (Fig. 8).

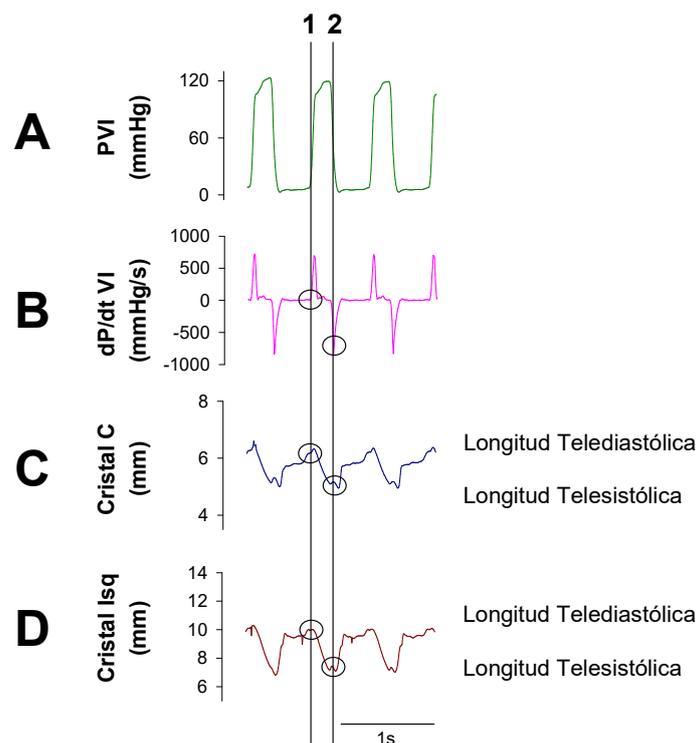


Figura 8. Registros representativos, tomados en situación basal en el modelo porcino, de la presión del VI (PVI), su derivada (dP/dt VI) y de la contractilidad regional en la zona control (Cristal C) y en el área en riesgo (Cristal Isq), y mostrando el método utilizado para determinar la longitud telediastólica (C-1 y D-1) y telesistólica (C-2 y D-2) en estos últimos, utilizando para ello la dP/dt VI.

1.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Todas las señales (ECG, presiones, flujo coronario y contractilidad regional) fueron amplificadas y registradas en un ordenador mediante el interfaz *ML119 PowerLab*, conectado al programa *Chart 5.0* (*ADInstruments*, Castle Hill, Australia). Para evaluar los efectos de los tratamientos sobre el daño por isquemia-reperusión, 46 animales fueron sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA, seguidos de 2 horas de reperusión (n=7-10/grupo) (Fig. 9).

La concentración de glucosa en sangre fue medida en todos los animales, antes de la isquemia y a los 5 minutos de reperusión, utilizando un kit de diagnóstico disponible comercialmente (*Glucocard G⁺ meter*, *Arkray Factory*, Shiga, Japón). La de insulina se determinó en muestras de plasma tomadas a los 5 minutos de reperusión, mediante un kit de ELISA colorimétrico (ab100578, *Abcam*, Cambridge, Reino Unido) a 450 nm. El plasma se obtuvo en tubos con citrato de sodio 0.129M (*Vacutainer*, Plymouth, Reino Unido) tras centrifugación de la sangre completa a 750g, durante 15 minutos. Los animales fueron asignados a uno de los siguientes 6 grupos:

Isquemia-reperusión control (n=10)

Los animales recibieron una infusión intravenosa de glucosa 5%, a un flujo de 1.5 mL/Kg/h, comenzando a los 10 minutos tras el inicio de la isquemia, y manteniéndose hasta el final del experimento (Fig. 9-A). No se realizó ninguna maniobra adicional.

Condicionamiento Isquémico Remoto (RIC) (n=7)

Los animales de este grupo fueron sometidos a 4 ciclos de 5 minutos de isquemia en la extremidad posterior derecha seguidos de 5 minutos de reperusión, comenzando simultáneamente con la ligadura de la arteria coronaria DA (Fig. 9-B). Para ello se usó la goma elástica localizada rodeando la arteria femoral derecha.

Glucosa-Insulina-Potasio (GIK) (n=7)

Este grupo recibió una solución intravenosa que contenía glucosa 30%, insulina 50 U/L (*Actrapid*, *Novodisk A/S*, Bagsvaerd, Dinamarca) y KCl 80 mEq, a razón de 1.5 mL/Kg/h, comenzando su infusión 30 minutos antes del inicio de la reperusión, y continuándose durante toda la duración de la misma (Fig. 9-C), tal y como se describió en el ensayo clínico IMMEDIATE (Selker et al., 2012).

Exenatida (n=8)

Los cerdos recibieron una infusión intravenosa continua de exenatida (*Byetta 10*, *Bristol-Myers Squibb/AstraZeneca EEIG*, Middlesex, Reino Unido)

(10 µg en 100 mL de suero salino 0.9%), que fue suministrada a partir de los últimos 15 minutos de isquemia a razón de 72 mL/h (0.12 µg/min) y reducida a 26 mL/h (0.043 µg/min) durante todo el periodo de reperfusión (Fig. 9-D), tal y como se describió previamente en pacientes (Lonborg et al., 2012a; Lonborg et al., 2012b).

RIC+GIK (n=7)

La solución de GIK fue administrada simultáneamente con la realización de la maniobra de RIC en la arteria femoral derecha, utilizando los protocolos previamente descritos (Fig. 9-E).

RIC+Exenatida (n=7)

Se combinó el tratamiento con exenatida y RIC utilizando igualmente los protocolos descritos con anterioridad (Fig. 9-F).

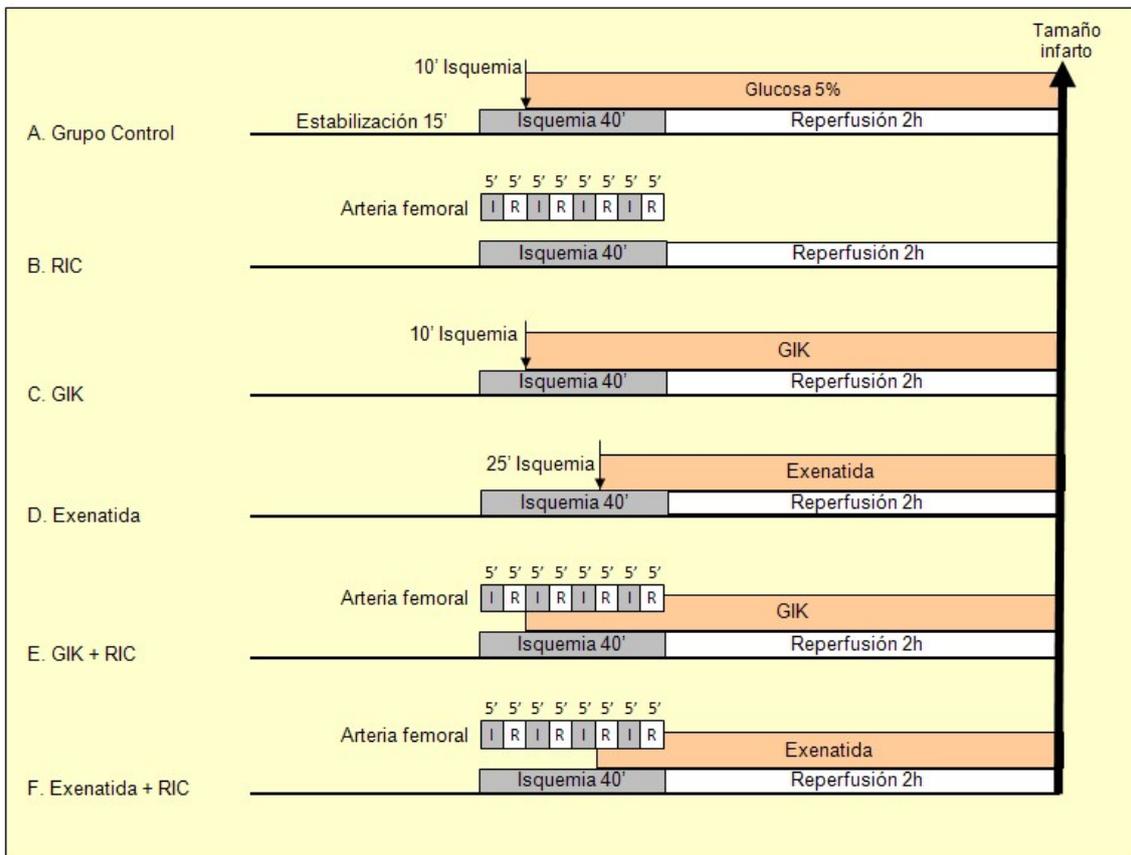


Figura 9. Protocolos experimentales. **A**, Grupo control. **B**, percondicionamiento isquémico remoto (RIC) en arteria femoral. **C**, administración de Glucosa-Insulina-Potasio. **D**, administración de Exenatida. **E**, administración combinada de RIC y GIK. **F**, administración combinada de Exenatida y RIC.

1.6 ANÁLISIS DE LA INCIDENCIA DE ARRITMIAS VENTRICULARES MALIGNAS

Los registros electrocardiográficos fueron examinados para determinar la incidencia de taquicardia ventricular (TV), TV sostenida y fibrilación ventricular (FV), tanto durante la isquemia como durante la reperfusión.

La TV se definió en el ECG como 4 o más latidos prematuros consecutivos de origen ventricular, a una frecuencia mayor de 100 latidos por minuto, y duración del QRS ancho, mayor de 120 ms. Se consideró TV sostenida a aquella cuya duración fuese superior a 30 segundos. La FV se definió como una actividad eléctrica caótica, desorganizada e irregular en morfología, y sin ondas del ECG claramente diferenciables. En los tres casos, las arritmias malignas se asociaron con un descenso marcado en la presión aórtica y en la presión del ventrículo izquierdo.

1.7 DETERMINACIÓN DEL ÁREA EN RIESGO Y DEL TAMAÑO DEL INFARTO

Al final del periodo de dos horas de reperfusión, la arteria coronaria DA fue reocluida y se inyectaron, de forma intravenosa, 10 mL de fluoresceína sódica al 10% (*Laboratoires THEA*, Clermont-Ferrand, Francia). El corazón fue rápidamente extraído, enfriado a 4°C, y cortado en seis secciones transversales (1-1.5 cm de grosor), perpendiculares al eje largo del corazón. Inmediatamente, las secciones fueron pesadas en una balanza de precisión (Precisa 180A, Zurich, Suiza) y fotografiadas con una cámara digital y una escala de referencia, bajo luz ultravioleta, para delinear el área en riesgo. Las secciones fueron entonces incubadas (37°C, pH 7.4) en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% durante 15 minutos y fotografiadas de nuevo, esta vez bajo luz blanca. La tinción con TTC adopta, en tejido viable, un color rojo debido a su reducción mediante una reacción dependiente de NADH, únicamente presente en células que hayan conservado su sarcolema. Por el contrario, las zonas necróticas, cuyas células presentan rotura del sarcolema, presentan una coloración blanca, al haberse perdido el contenido citosólico de NADH. El tamaño de la zona en riesgo y del área necrótica fue determinado a través de las imágenes digitales obtenidas utilizando el programa *Image-Pro Plus* (*Media Cybernetics*, Estados Unidos). La masa de miocardio en riesgo y el tamaño del infarto se calcularon a partir de estas mediciones, teniendo en cuenta el peso fresco de cada una de las secciones del órgano cardiaco.

1.8 ESTADÍSTICA

Los datos se han expresado como media \pm SEM (SEM, error estándar de la media). La presencia de diferencias, entre los distintos grupos, en las concentraciones de insulina, de la temperatura, del tamaño del área en riesgo y del tamaño del infarto se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y el

post-test de Tukey, y mediante ANOVA jerarquizado. En este último caso, el nivel superior fue el número de tratamientos cardioprotectores aplicados (0, 1, o 2). Un segundo nivel fue constituido por los diferentes grupos con tratamientos individuales (placebo, RIC, GIK, exenatida) o combinados (RIC con GIK, RIC con exenatida). El análisis de las arritmias se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis, junto con un ANOVA jerarquizado. Las diferencias entre los distintos grupos en la evolución a lo largo del tiempo de la concentración de glucosa, la fracción de acortamiento sistólica (AS), la frecuencia cardíaca o las variables hemodinámicas fueron estudiados mediante ANOVA de medidas repetidas (MANOVA) y el test *post hoc* de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

2 Mecanismos implicados en la protección por RIC, GIK o exenatida, y por la terapia combinada, sobre el daño por isquemia-reperfusión

2.1 ANIMALES E INSTRUMENTACIÓN

En esta fase se utilizaron 24 cerdos machos, de raza híbrida, con características de peso y ayuno semejantes a las descritas en el punto anterior. La premedicación, anestesia y procedimiento experimental fueron los mismos especificados en el apartado 1.1 de materiales y métodos.

2.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Para evaluar los mecanismos de cardioprotección, los 24 cerdos incluidos en esta fase fueron sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 5 minutos de reperfusión (n=4/grupo). Se recogieron muestras de tejido miocárdico tanto de la zona control como del área en riesgo. Estas muestras fueron procesadas para un posterior análisis metabólico y de la respiración mitocondrial, y establecimiento del grado de activación de las vías RISK, SAFE y GMPc/PKG mediante *western blot*, en los diferentes grupos experimentales.

La concentración de glucosa en sangre se midió en todos los animales antes de la isquemia y a los 5 minutos de reperfusión, como se ha descrito anteriormente. De igual modo, la cantidad de insulina fue medida en muestras de plasma obtenido a los 5 minutos de la reperfusión, de la misma forma expuesta con anterioridad.

Los animales fueron asignados aleatoriamente a los mismos grupos establecidos en el subestudio previo (control, RIC, GIK, Exenatida, RIC+GIK, RIC+Exenatida).

2.3 ANÁLISIS DEL METABOLISMO MIOCÁRDICO

Los metabolitos cardiacos de las biopsias tisulares fueron extraídos utilizando el método del metanol:cloroformo. Las muestras congeladas (0.1-0.3 g) fueron trituradas con un mortero hasta conseguir un polvo fino, al que se añadió 3 mL de metanol:cloroformo en una proporción 2:1. A los 15 minutos, se adicionaron a la mezcla 1.25 mL de cloroformo y 1.85 mL de agua, con el fin de obtener dos fases. Tras una centrifugación a 1200 g durante 5 minutos, a temperatura ambiente, la fase superior (metanol y agua) fue separada de la fase inferior (orgánica). Con la fase intermedia resultante se repitió el proceso de extracción, y tanto la fracción orgánica como la acuosa fueron agrupadas

MATERIALES Y MÉTODOS

con las obtenidas inicialmente. La fase acuosa fue liofilizada y almacenada a -20°C hasta su análisis mediante espectroscopía de RMN.

Los extractos liofilizados provenientes de la fase acuosa fueron disueltos en 600 μ L de dióxido de deuterio (#151882, *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Alemania) conteniendo 1 mmol/L de TSP (ácido 3-(Trimetilsilil) tetradeuterio-propiónico) (#178837, *Sigma-Aldrich*), utilizado como un estándar interno de concentración y de desplazamiento químico. A continuación se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) en un espectrómetro *Bruker Advance 400* (*Bruker*, Karlsruhe, Alemania), conectado a un imán vertical de 9.4 T de campo magnético (Barba et al., 2007).

Cada espectro consistió en la acumulación de 64 escaneados utilizando una secuencia de pulso y adquisición completamente relajada, con presaturación de la señal del agua residual. Otra secuencia de pulsos fue la NOESYPR1D, con un tiempo de mezcla NOE de 100 ms, y con un tiempo entre pulsos de 2s. De algunas muestras seleccionadas se obtuvieron espectros bidimensionales, ^1H - ^1H TOCSY y ^1H - ^{13}C HSQC, para facilitar la asignación de los picos detectados a compuestos químicos concretos (Tabla 1). Los espectros fueron procesados utilizando el programa XWINNMR (*Bruker*), se sometieron a la transformación de Fourier y sus fases fueron corregidas manualmente.

La determinación química de los compuestos contenidos en las muestras, así como la concentración de los mismos, se realizó gracias a bases de datos previamente publicadas y anexionadas al programa *Chemomx* (*Chemomx Inc*, Canadá), el cual facilitó la asignación de los picos de los espectros con los metabolitos correspondientes.

| Secuencia | Pulso-Adquisición | NOESY | TOCSY | ^1H - ^{13}C HSQC |
|-----------------------------|-------------------|--------|---------|-------------------------------------|
| Número de repeticiones | 32 | 128 | 256*256 | 256*256 |
| Tiempo entre pulsos | 9.5 s | 5.5 s | | |
| Resolución de los espectros | 64 k | 32 k | 2 k | 1 k |
| Multiplicación exponencial | 0.5 | 0.3 | | |
| Tiempo total | 6 min | 12 min | 12h | 1d 5h |
| Tiempo de mezcla NOE | | 0.1 s | 0.1 s | |

Tabla 1. Parámetros de los protocolos utilizados en los análisis de RMN sobre los extractos de miocardio.

2.4 ESTUDIO DEL GRADO DE ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CITOSÓLICAS CARDIOPROTECTORAS

Para investigar si la cardioprotección observada en el subestudio previo era debida a la activación de algunas cascadas citosólicas que diversos autores han relacionado con la presencia de cardioprotección, como las vías RISK, SAFE o GMPc/PKG, analizamos el grado de fosforilación y la expresión total de diversas proteínas involucradas en las mismas.

El grado de activación de la vía RISK en los distintos grupos experimentales se analizó, mediante *western blot* convencional (Sánchez et al., 2013), en fracciones totales obtenidas a partir del miocardio de la zona control y del área en riesgo, determinando el estado de fosforilación de Akt, ERK1/2 y GSK3 β . Para estudiar el grado de activación de la vía SAFE, se analizó el estado de fosforilación de STAT3. Adicionalmente, también se determinó la activación de p38 MAPK, AMPK α , y la expresión de Cx43. En todos los casos, se calculó la relación entre las formas fosforiladas y las totales. Como controles de carga se utilizaron la expresión de la succinato-ubiquinol oxidoreductasa (OxPhos Complex II) o de GAPDH. Las muestras miocárdicas obtenidas fueron rápidamente congeladas con nitrógeno líquido para minimizar la degradación de proteínas, y fueron homogeneizadas con un politrón (*DiAx 600 homogenizer, Heidolph, Alemania*) en un 1 ml de tampón de homogeneización frío (en mmol/L: Tris-HCl 20, NaCl 140, EDTA 0.8 (pH 7.8), NaF 1, Na₃VO₄ 1, y un cóctel de inhibidores de proteasas 1% (*Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich*). Los extractos totales cardiacos se obtuvieron a partir del sobrenadante tras una centrifugación a 750 g durante 10 minutos (4°C). La concentración de proteínas de las fracciones totales así obtenidas se determinó mediante el método de Bradford (Sánchez et al., 2013).

Las proteínas de las fracciones totales se separaron en condiciones desnaturalizantes por su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE. El gel concentrador se preparó al 4% (acrilamida/bisacrilamida 37.5:1 al 4%, Tris base 0.125nM, SDS 0.1%, APS 0.05%, TEMED 0.1%, pH 6.8), y el gel separador al 10% (acrilamida/bisacrilamida 37.5:1 al 10%, Tris base 0.375 mM, SDS 0.1%, APS 0.05%, TEMED 0.1%, pH 8.8). Los geles se montaron en un sistema *Mini-Protean III (Bio-Rad, Estados Unidos)* sumergidos en tampón de electroforesis (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1%, pH 8.3). Las muestras se mezclaron con *Laemmli 2X (Bio-Rad, Estados Unidos)*, calentándose a 95°C durante 5 minutos, para a continuación cargar la misma cantidad de proteína (entre 20 y 30 μ g) para cada muestra en cada pocillo. Junto a las muestras, en pocillos adicionales, se cargó un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad, Estados Unidos*). Tras la carga, se aplicó a los geles una corriente de intensidad constante (20 mA por gel), suministrada por una fuente de alimentación (*Power Pac 300, Bio-Rad, Estados*

Unidos). La electroforesis se detuvo cuando el frente de azul de bromofenol (contenido en el laemmli) salió del gel (tras 2 horas, aproximadamente).

Las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Hybond ECL*, *Amersham Biosciences*, Suecia) mediante transferencia húmeda. La transferencia se realizó a 100 V durante 1 hora, con el tampón de transferencia (metanol 20%, Tris base 25 mM, glicina 20 mM), mantenido a 4°C. Para confirmar una carga de proteína similar en todos los carriles, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau. A continuación se lavaron con TBS-Tween 0.1% (Tris base 20 mM, NaCl 138 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.4), y se bloquearon con *phosphoblocker* (*Cell BioLabs, Inc*, San Diego, Estados Unidos) o con leche desnatada en polvo (para proteínas fosforiladas o totales, respectivamente) 5% en TBS-Tween 0.1% durante 1 hora. Tras este paso, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% y se incubaron, durante 90 minutos a temperatura ambiente, con los anticuerpos primarios correspondientes disueltos en TBS, conteniendo un 10% de *Superblock Blocking Buffer* (*Pierce*, Estados Unidos). Finalmente, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% y se incubaron, durante 1 hora, con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (disuelto en *phosphoblocker* o leche 5%). Tras el lavado de las membranas, la expresión de las distintas proteínas se detectó mediante quimioluminiscencia usando *Super Signal West Dura Extended Duration* (*Pierce*, Estados Unidos) como sustrato de la peroxidasa, y registrando la quimioluminiscencia con la cámara CCD *LAS-3000* (*Fujifilm*, Japón). La densidad óptica de las bandas se cuantificó utilizando un programa de análisis de imagen (*Image Gauge*, *Fujifilm*, Japón).

Además de las vías RISK y SAFE, el papel desempeñado por la vía del GMPc/PKG también se investigó mediante análisis por *western blot* del grado de fosforilación de eNOS, tal y como se ha descrito previamente (Inserte et al., 2013). En este caso, las muestras fueron homogeneizadas en tampón conteniendo (en mmol/L) Tris-HCl 50, NaCl 150, EDTA 10, DTT 1, NaF 10, Na₃VO₄ 2, Tritón X-100 1%, y un cóctel de inhibidores de proteasas 1% (pH 7.3), y fueron centrifugadas a 15000 g durante 15 minutos. Los extractos de proteína fueron separados mediante electroforesis, como se ha descrito anteriormente, en geles de poliacrilamida al 7.5 – 12 %. La determinación de la relación dímero:monómero de eNOS se realizó mediante una electroforesis a baja temperatura. Estas muestras se utilizaron, así mismo, para determinar la formación de nitrotirosina.

2.4.1 Anticuerpos

Para evaluar el grado de fosforilación de las proteínas analizadas se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-p-Akt (Ser473), anti-p-ERK1/2

(Thr202/Tyr204), anti-p-GSK3 β (Ser9), anti-p-STAT3 (Tyr705), anti-p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) y anti-p-eNOS (Ser1174) (*Cell Signaling*, Estados Unidos, referencias #9271, #9101, #9323, #9131, #4511 (dilución 1:500), y #9571 (dilución 1:1000), respectivamente), y anti-p-AMPK α 1 (Thr183) + anti-p-AMPK α 2 (Thr172) (*abcam*, Reino Unido, referencia ab133448, dilución 1:1000). Por otro lado, para valorar la expresión total de dichas proteínas se utilizaron los anticuerpos anti-Akt, anti-ERK1/2, anti-GSK3 β , anti-STAT3, anti-p38 MAPK, anti-AMPK α (*Cell signaling*, Estados Unidos, referencias #9272, #4695, #9315, #9132, #8690 y #5832, respectivamente, dilución 1:1000), y anti-eNOS (*BD Transduction Laboratory*, Estados Unidos, referencia #610296, dilución 1:1500). La formación de nitrotirosina fue analizada utilizando un anticuerpo anti-nitrotirosina (*Millipore*, Estados Unidos, referencia #06-284, dilución 1:1000). Finalmente, la expresión de Cx43 y de sus diferentes grados de fosforilación se analizó usando el anticuerpo C6219 (*Sigma-Aldrich*, dilución 1:8000, formas totales de la proteína). Como control de carga se utilizó anti-succinato-ubiquinol oxidoreductasa humana (Ox-Phos Complex II, *Molecular Probes*, Eugene, OR, Estados Unidos, dilución 1:2500) para todos los casos excepto para el control de carga de Cx43, en cuyo caso se empleó anti-GAPDH (*GeneTex*, Irvine, Estados Unidos, referencia GTX627408, dilución 1:1000). El anticuerpo secundario que fue utilizado para todos los primarios fue *anti-rabbit* (#31460, *Pierce*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos, dilución 1:50000), excepto para p-eNOS y Ox-Phos Complex II, en cuyo caso se utilizó el anticuerpo secundario *anti-mouse* (#1858413, *Pierce*, dilución 1:1000).

2.5 ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Puesto que la inhibición de la respiración mitocondrial puede limitar el daño por isquemia-reperusión (Valls-Lacalle et al., 2016), decidimos analizar la función mitocondrial en muestras obtenidas de los distintos protocolos experimentales, con el objeto de averiguar si existían cambios en la misma que pudiesen explicar la protección observada.

Para ello se aislaron mitocondrias a partir de muestras de tejido miocárdico que habían sido extraídas, rápidamente, a los 5 minutos de reperusión. Se tomaron muestras tanto de miocardio control como del procedente del área en riesgo, que fueron sumergidas en tampón A de aislamiento (en mmol/L: sacarosa 290, MOPS 5, pH 7.4, EGTA 2, suplementado con albúmina 0.1 %), en frío. El tejido fue homogeneizado con el aparato Potter-Elvehjem, y centrifugado a 750 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue recogido y centrifugado otra vez a 5000 g durante 5 minutos. Los “pellets” o precipitados así obtenidos se consideraron como la fracción enriquecida en mitocondrias. El contenido en proteína mitocondrial fue cuantificado mediante un ensayo de Bradford.

El consumo de oxígeno se estableció, a temperatura ambiente, mediante un oxímetro, utilizando un electrodo de oxígeno tipo *Clark* (*Hansatech*, Norfolk, Reino Unido). Las mitocondrias se colocaron en la cámara del electrodo de oxígeno, con tampón de respiración (en mmol/L: KCl 100, MOPS 5, pH 7.4, EGTA 2, KH₂PO₄ 5, MgCl₂ 1, con albúmina 0.1 %). El consumo de oxígeno se monitorizó tras la adición de sustratos de respiración mitocondrial (en mmol/L: malato 2, glutamato 5, y ADP 1), y las tasas de consumo de oxígeno se normalizaron respecto a la actividad de la citrato sintasa, determinada mediante colorimetría (Matsuoka and Srere, 1973; Ruiz-Meana et al., 2014).

2.6 ESTADÍSTICA

Los datos se han expresado como media \pm SEM (SEM, error estándar de la media). Las diferencias en las variables referentes a los mecanismos analizados se evaluaron mediante ANOVA de una vía, mientras que los predictores de la actividad mitocondrial y de los datos de *western blot* fueron determinados mediante análisis de regresión paso a paso. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Para el reconocimiento de patrones a partir de los extractos sometidos a RMN, los espectros se importaron al programa *Simca V13* (*Umetrics*, Umea, Suecia), donde se realizaron métodos de análisis no supervisados (PCA, Análisis de Componentes Principales), y supervisados (OPLS-DA, Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes – Análisis Discriminante).

3 Estudio de los mecanismos humorales implicados en la protección por condicionamiento isquémico remoto

3.1 PROTOCOLO DE RIC EN MODELO PORCINO

Para analizar los mecanismos humorales involucrados en la protección por RIC se utilizaron seis cerdos macho de granja, de raza híbrida (25-30 kg), mantenidos en ayunas desde las 12 horas previas al experimento, que fueron intervenidos en dos ocasiones, con una semana de tiempo de recuperación entre un procedimiento y el siguiente. En ambas intervenciones, los animales fueron premedicados con tiletamina-zolazepam (4-6 mg/Kg, IM) y xilacina (1-2 mg/Kg, IM), anestesiados con propofol-lipuro 1% (1.5-2.5 mg/Kg, IV, seguido de una infusión continua de 11 mg/Kg/h) y con fentanilo (5 µg/Kg, IV, seguido de una infusión continua de 3-6 µg/Kg/h), y ventilados mecánicamente con un sistema ventilador Puritan Bennett 7200 (Puritan Bennett Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos) con una concentración de oxígeno de aproximadamente un 40%. En las dos operaciones se disecó una de las arterias femorales, rodeándola con un lazo de goma elástica. Esta goma se utilizó, posteriormente, para llevar a cabo la maniobra de condicionamiento isquémico remoto (RIC). La vena femoral de la misma extremidad fue canulada y utilizada para la recolección de muestras de sangre.

Los gases arteriales fueron monitorizados durante todo el procedimiento experimental, y mantenidos dentro de los límites normales. Se registró de forma continua la derivación II del electrocardiograma (ECG) para controlar la frecuencia cardíaca y la posible presencia de arritmias ventriculares. Las señales fueron registradas en un ordenador mediante el interfaz *ML119 PowerLab*, conectado al programa *Chart 5.0* (*ADInstruments*, Castle Hill, Australia).

En ambas intervenciones se obtuvieron muestras de sangre (60 mL por extracción) de los animales en estado basal, que fueron extraídas a través de la vena femoral canulada, y recogidas en tubos con heparina (10 UI/mL sangre) en frío. Posteriormente, los cerdos fueron sometidos a 4 ciclos de 5 minutos de isquemia de la extremidad posterior seleccionada seguidos de 5 minutos de reperfusión. Durante los dos últimos minutos de reperfusión del último ciclo del RIC, una segunda muestra de sangre (Post-RIC) volvió a tomarse por cada animal e intervención (Fig. 10-A).

Al finalizar la primera cirugía, los cerdos fueron extubados y tratados con antibióticos (cefazolina (1 g, IV) y amoxicilina - ácido clavulánico (150 mg/10 Kg, IM), antiinflamatorios (meloxicam, 0.2 mg/Kg, IM) y analgésicos

(buprenorfina, 0.05 mg/Kg, IV), volviendo al estabulario para su recuperación. Tras la segunda y última intervención, al término del procedimiento experimental, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentotal sódico (100 mg/Kg, IV).

3.2 OBTENCIÓN DE DIALIZADOS PLASMÁTICOS

Las muestras de sangre basal y post-RIC recogidas en tubos con heparina (10 UI/mL de sangre), fueron centrifugadas (15 minutos, 1800 g), a baja temperatura (4 °C). La fase superior resultante, que contenía el plasma sanguíneo, fue separada. A continuación se llevó a cabo una diálisis estática del plasma. Éste fue introducido en membranas semipermeables de diálisis, con un rango de separación de 12-14 kDa (*Spectra/Por Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories, Inc*, Estados Unidos), que, a su vez, fueron sumergidas en un volumen 10 veces superior de solución de Krebs (en mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2) manteniéndose en agitación durante 12 horas a 4°C. Tras este período se recogió la solución de Krebs conteniendo los dializados plasmáticos, obtenidos gracias al fenómeno de ósmosis por gradiente de concentración. Los dializados fueron conservados a -80°C para preservarlos hasta el día de su utilización (Fig.10-B).

3.3 ANÁLISIS DEL DIALIZADO PLASMÁTICO MEDIANTE ¹H-RMN

Para confirmar el éxito del proceso de diálisis y para estudiar la composición química de los dializados plasmáticos en las muestras obtenidas antes y después de la maniobra de RIC, estos se analizaron mediante resonancia magnética nuclear. Para ello, se partió de 1 mL de cada dializado plasmático porcino (n=12/grupo), tanto de muestra basal como post-RIC. Inicialmente, los dializados fueron liofilizados, y posteriormente, resuspendidos en 600 µL de dióxido de deuterio (*Sigma-Aldrich*), conteniendo 1 mmol/L de TSP (*Sigma-Aldrich*) como estándar interno de concentración y de desplazamiento químico. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) de las muestras fueron adquiridos mediante el espectrómetro *Bruker Advance 400* (*Bruker, Karlsruhe, Alemania*), conectado a un imán vertical de 9.4 T de campo magnético, de la misma manera expuesta en el apartado 2.3 de “Materiales y Métodos”. Los espectros fueron, finalmente, procesados de la forma descrita en el mencionado apartado.

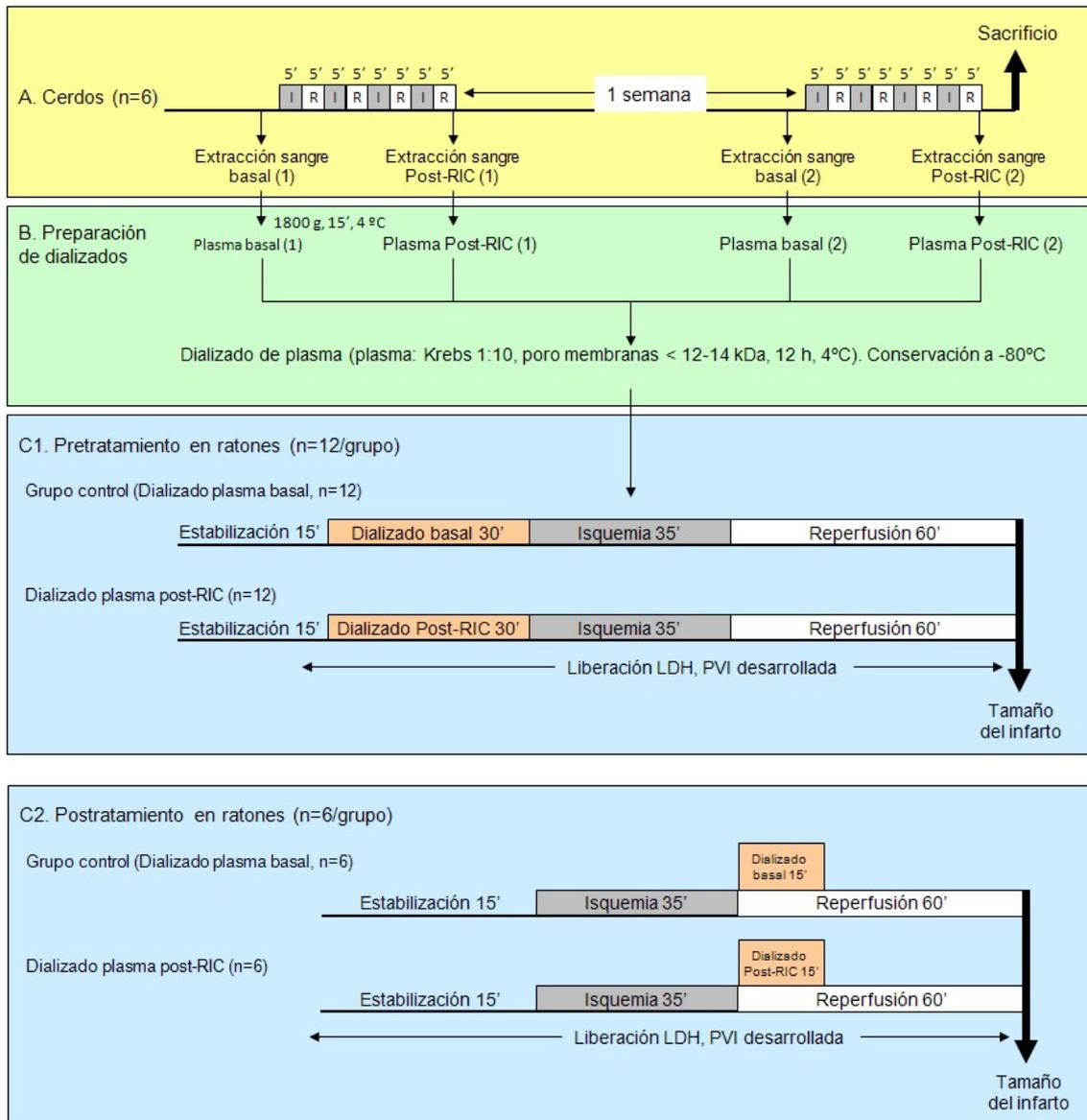


Figura 10. Protocolos experimentales sobre modelo porcino y murino. **A**, Extracción de sangre basal y Post-RIC en cerdo. **B**, Obtención de dializado plasmático. **C1**, Pretratamiento con dializados en corazón aislado de ratón. **C2**, Postratamiento con dializados en corazón aislado de ratón.

3.4 MODELO DE CONDICIONAMIENTO REMOTO EN CORAZÓN AISLADO DE RATÓN UTILIZANDO DIALIZADOS PLASMÁTICOS PORCINOS

Un total de 74 ratones machos (*Mus musculus*, Linneo 1758) de la cepa C57BL/6J (*Charles-River*, Barcelona, España) y 8-10 semanas de vida (25-30 g) fueron utilizados en el procedimiento. Los animales fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos en jaulas, en habitaciones aclimatadas a temperatura constante y condiciones ambientales controladas, hasta el día del experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (1 g/Kg, IP), y sometidos a toracotomía bilateral. Los corazones enteros fueron extraídos rápidamente y colocados en suero frío. A continuación fueron perfundidos, de forma retrógrada a través de la aorta en un sistema Langendorff (Fig. 11), y a la mayor brevedad posible (menos de 3-4 minutos), con una solución de Krebs oxigenada (95% O₂:5% CO₂), a 37 °C (en mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucosa 11, pH 7.4) a un flujo constante (alrededor de 3.5 ml/min). El flujo de la solución se ajustó para producir una presión de perfusión (PP) de 80-90 mmHg en condiciones normóxicas (Sánchez et al., 2013). Dicha presión se monitorizó con un catéter relleno de agua conectado a un transductor de presión y colocado como una vía lateral en el punto de entrada de la solución de Krebs al corazón.

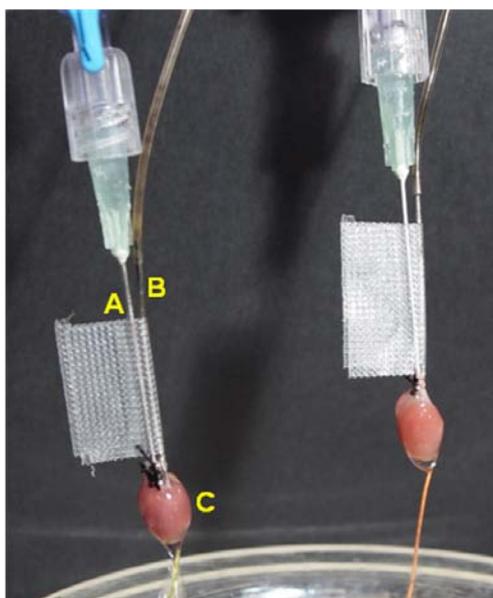


Figura 11. Sistema de Langendorff para corazones aislados y perfundidos de ratón. En la imagen se muestran dos corazones canulados a través de la aorta, junto con el balón situado en el interior del ventrículo izquierdo. **A**, cánula de perfusión. **B**, cánula con el balón de látex, registrando presión ventricular. **C**, corazón de ratón.

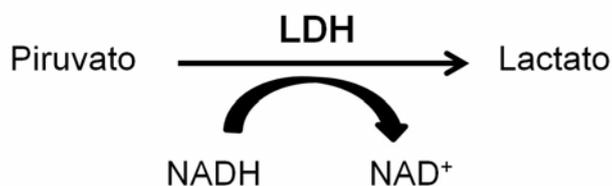
Un balón de látex relleno de agua fue colocado en el interior del ventrículo izquierdo, a fin de monitorizar la presión ventricular (PVI). El balón fue inflado hasta obtener una presión telediastólica de entre 6-8 mmHg. La presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PdesVI) se calculó como la diferencia entre el pico sistólico y la presión telediastólica. Tanto la PP como la PVI fueron monitorizadas mediante catéteres y transductores de presión rellenos de agua (*MLT0699 Disposable BP Transducers, ADInstruments, Australia*). Las señales obtenidas se amplificaron y digitalizaron utilizando el interfaz *ML119 PowerLab (Powerlab/8SP SP9150, ADInstruments, Australia)*, conectado al programa *Chart 5.0 (ADInstruments, Castle Hill, Australia)*. Los datos se almacenaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis.

Todos los corazones fueron sometidos, tras 15 minutos de estabilización, a isquemia global de 35 minutos, seguida de reperfusión de 60 minutos. Durante la isquemia, los corazones fueron sumergidos en una

solución de Krebs hipóxica, a 37°C (en mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, sacarosa 11, pH 7.4), burbujeada con 95% N₂:5% CO₂. Además de los datos funcionales, se evaluó la muerte celular del miocardio mediante liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) durante el periodo de reperfusión, así como determinando el tamaño del infarto.

3.4.1 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

La liberación de LDH es un indicador altamente correlacionado con la tasa de muerte celular. La LDH es un enzima citosólico que sólo es liberado al espacio extracelular, y por tanto, al efluente coronario, cuando el sarcolema de los cardiomiocitos se rompe durante el proceso de necrosis. La determinación de la liberación de LDH se basa en la siguiente reacción:



Para determinar su concentración, se recogieron muestras del efluente coronario a diferentes tiempos durante la reperfusión, a fin de medir su actividad enzimática mediante espectrofotometría. El ensayo se realizó diluyendo 1:10 la muestra del efluente en tampón fosfato (en mM: K₂HPO₄*3H₂O 61.4, KH₂PO₄ 58.6, pH 7.4) a 37°C, en presencia de NADH 310 μM y de piruvato sódico 1mM. La caída en la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (*Multiskan FC, Thermo Scientific*, Estados Unidos) a 320 nm, durante 5 minutos. Se calculó la concentración catalítica utilizando el coeficiente de absorptividad molar del NADH, y los valores fueron normalizados en función del tiempo (según el flujo) y del peso seco (medido tras 24 horas de deshidratación del órgano a 100°C).

3.4.2 Cuantificación del tamaño del infarto

Al final de la reperfusión, los corazones fueron congelados a -4°C, y posteriormente cortados en secciones transversales de 1-1.5 mm de grosor. Las secciones fueron teñidas con TTC tal y como se indica en el apartado 1.5 de "Materiales y Métodos", y fueron pesadas y fotografiadas usando una cámara digital. Una salvedad respecto al modelo porcino explicado en el apartado 1 es que, en este caso, al tratarse de una isquemia global, el tamaño del área en riesgo corresponde con el del área total de la sección, lo cual hace innecesaria la tinción con fluoresceína. En cada sección ventricular se midió el área total y el área necrótica, gracias a un programa informático (*Image-Pro Plus, Media Cybernetics*, Estados Unidos). El tamaño del infarto se expresó como porcentaje del peso total ventricular.

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

3.5.1 Efectos del plasma Post-RIC sobre el daño por isquemia-reperfusión en corazones aislados de ratón

Los dializados plasmáticos obtenidos a partir del modelo porcino de condicionamiento remoto fueron suplementados con glucosa (11 mmol/L) y NaHCO₃ (25 mmol/L), calentados a 37°C y burbujeados con 95% O₂:5% CO₂ el día de su utilización. Para evaluar los efectos del RIC sobre el daño por isquemia-reperfusión en el corazón aislado de ratón, se llevaron a cabo experimentos pareados, donde a un corazón se le administró el dializado plasmático basal procedente de un cerdo, y a otro corazón el dializado plasmático del mismo cerdo obtenido después de haberle sometido a la maniobra de RIC.

Los efectos sobre el daño por isquemia-reperfusión de los dializados plasmáticos procedentes del modelo porcino se analizaron, inicialmente, en un total de 24 ratones, en los que los dializados se administraron antes de la isquemia. Un grupo de corazones fue tratado con el dializado plasmático basal (n=12), y otro grupo fue tratado con el obtenido tras la aplicación de la maniobra de RIC en el cerdo (n=12). Tras los 15 minutos de estabilización, los corazones se perfundieron con los diferentes dializados plasmáticos, suplementados con glucosa y NaHCO₃, durante 30 minutos, seguidos de la isquemia global de 35 minutos y reperfusión de una hora (Fig. 10-C1). En una segunda serie de experimentos, realizada sobre un total de 12 ratones (n=6/grupo), los dializados plasmáticos fueron administrados únicamente durante los primeros 15 minutos de la reperfusión (Fig. 10-C2). En ambos casos se compararon los resultados obtenidos en los corazones tratados con dializado post-RIC con aquellos obtenidos en los tratados con plasma control, valorándose la recuperación funcional, la liberación de LDH y el tamaño del infarto.

Para intentar aumentar la eficacia del tratamiento postisquémico, ocho corazones adicionales de ratón fueron tratados con dializado control o recogido durante el primer minuto de cada una de las reperfusiones de cada ciclo de RIC, realizadas en el modelo porcino. Por otro lado, para tratar de aumentar la eficacia del proceso de diálisis, otros 6 ratones adicionales fueron tratados durante la reperfusión con dializados obtenidos tras un proceso de diálisis dinámica del plasma (en lugar de la diálisis estática utilizada hasta el momento) mediante membranas semipermeables de diálisis, con un rango de separación de 8-10 kDa. En este caso, las membranas estaban incluidas en tubos (*Spectra/Por Tube-A-Lizer, Dynamic Dialysis Device, Spectrum Laboratories, Inc*, Estados Unidos) por los que discurrió un flujo continuo de 500 mL de agua destilada (0.50 mL/min). Posteriormente, el dializado fue liofilizado hasta un

volumen de 100 mL, y congelado hasta el día del experimento, en que se añadieron los componentes de la solución de Krebs.

3.5.2 Influencia del bloqueo de los receptores de glicina sobre el efecto protector del pretratamiento con plasma post-RIC en corazones aislados de ratón

Para establecer los posibles mecanismos responsables del efecto protector del pretratamiento con plasma post-RIC, y en consonancia con los hallazgos obtenidos en nuestros análisis de resonancia magnética nuclear, se realizaron experimentos adicionales en 10 corazones aislados de ratón (n=5/grupo), pretratados con estriquina (10 μ M), un inhibidor selectivo de los receptores de glicina.

Tras la estabilización, los corazones fueron perfundidos, durante 5 minutos con solución de Krebs conteniendo estriquina 10 μ M (*strychnine #s-0532, Sigma-Aldrich*). Una vez finalizado dicho período, los corazones, de forma pareada, fueron tratados, durante otros 30 minutos, con el dializado plasmático basal o el obtenido en los cerdos tras realizarles la maniobra de RIC, adicionados con glucosa (11 mmol/L) y NaHCO₃ (25 mmol/L) y conteniendo así mismo estriquina 10 μ M. La concentración de estriquina se seleccionó en base a estudios previos que demostraron la capacidad de esta concentración para deprimir, de forma reversible, las respuestas despolarizantes inducidas por la glicina en médula espinal aislada de rata (Saitoh et al., 1994). Tras la aplicación de los dializados, los corazones fueron sometidos a isquemia global de 35 minutos seguida de una reperfusión de 1 hora, tal y como se explicó en el apartado anterior (Fig. 12). En todos los casos se compararon los efectos de los tratamientos sobre la recuperación funcional, la liberación de LDH y el tamaño del infarto.

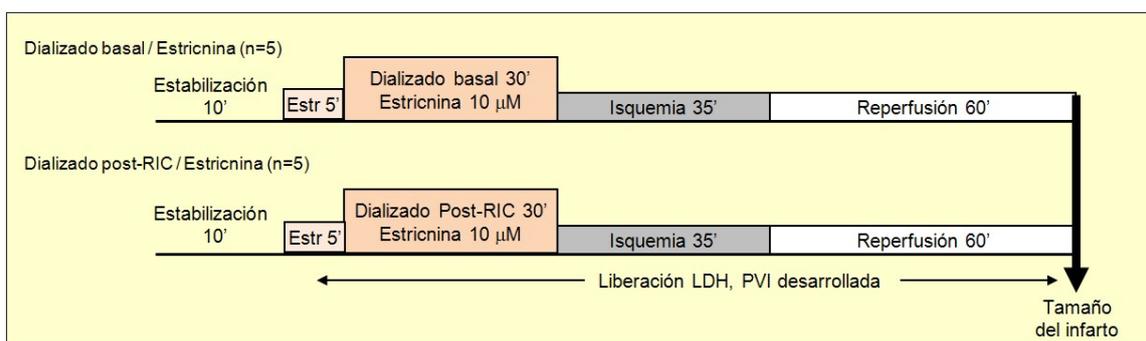


Figura 12. Protocolos experimentales llevados a cabo en corazones aislados de ratón sometidos a 35 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión, y pretratados con estriquina 10 μ M durante la administración de dializados plasmáticos porcinos.

3.5.3 Efecto del pretratamiento con succinato sobre el daño por isquemia-reperfusión en corazones aislados de ratón

Puesto que uno de los metabolitos que aparecieron elevados en los dializados plasmáticos porcinos obtenidos tras la aplicación de la maniobra de RIC fue el succinato, y para tratar de dilucidar en detalle los mecanismos involucrados en la protección por RIC, en un conjunto adicional de 14 ratones ($n=7$ /grupo) decidimos determinar los efectos del pretratamiento con succinato (#S3674, *Sigma-Aldrich*) sobre el daño por isquemia-reperfusión en corazones aislados de ratón.

Tras el período de estabilización de 15 minutos, a un grupo de corazones se le administró la solución de Krebs suplementada con succinato $100 \mu\text{M}$, durante 30 minutos, mientras que al otro grupo se le mantuvo el suministro de Krebs normal. Seguidamente, ambos grupos fueron sometidos a isquemia global de 35 minutos y perfusión de una hora de duración (Fig. 13). En todos los casos se compararon los efectos de los tratamientos sobre la recuperación funcional, la liberación de LDH y el tamaño del infarto.

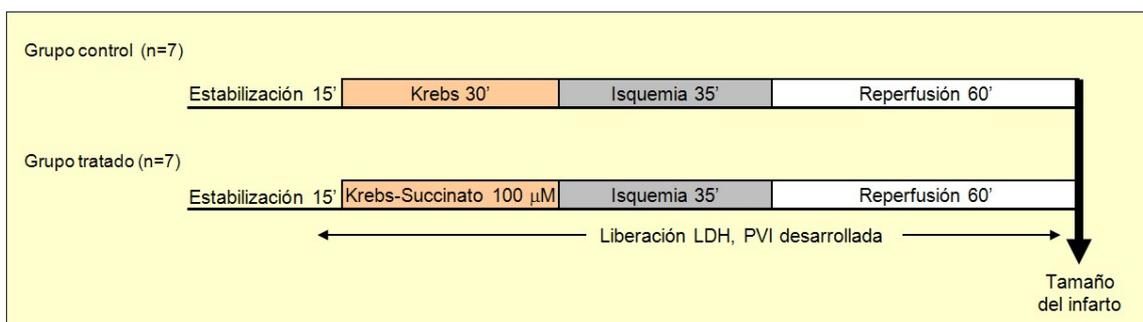


Figura 13. Protocolos experimentales llevados a cabo en corazones aislados de ratón sometidos a 35 minutos de isquemia global y 1 hora de perfusión, y pretratados o no con succinato ($100 \mu\text{M}$).

3.6 ESTADÍSTICA

Los datos se han expresado como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (SEM, error estándar de la media). El análisis del tamaño del infarto, la LDH acumulada y la recuperación funcional, se llevó a cabo mediante pruebas de t-Student. Los cambios a lo largo del tiempo de la frecuencia cardíaca y las presiones desarrolladas, telediastólicas y de perfusión, fueron establecidos mediante ANOVA de medidas repetidas (MANOVA) y un test *post hoc* de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

A partir de los espectros de resonancia magnética nuclear obtenidos de las muestras de dializados plasmáticos se realizó un reconocimiento de patrones. Los espectros se importaron al programa *Simca V13* (*Umetrics*, Umea, Suecia), donde se realizaron métodos de análisis no supervisados (PCA, Análisis de Componentes Principales), y supervisados (OPLS-DA, Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes – Análisis Discriminante).

RESULTADOS

1 Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de corazón porcino *in situ*

1.1 VARIABLES HEMODINÁMICAS

En la figura 14 se muestra un registro representativo obtenido en un cerdo control que evidencia los cambios inducidos por un episodio de oclusión coronaria de 40 minutos seguido de perfusión en las distintas variables analizadas.

La frecuencia cardiaca basal se situó, en todos los casos, entre 70 y 90 latidos por minuto (Tabla 2), manteniéndose relativamente estable durante la isquemia, y aumentando, de forma significativa, durante la perfusión (Fig. 15, Tabla 2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en su evolución a lo largo del tiempo entre los distintos grupos experimentales (Tabla 2, Fig. 15).

De forma similar, tampoco hubo diferencias, entre los distintos grupos, en la evolución de la presión sistólica del ventrículo izquierdo (Fig. 16), así como de sus derivadas positiva (Fig. 17) y negativa (Fig. 18) respecto al tiempo, de la presión telediastólica ventricular y de la presión aórtica, aunque, algunas de estas variables, concretamente la presión ventricular y sus derivadas mostraron, en conjunto, una tendencia a reducirse durante la perfusión (Tabla 2, Figs. 16-18).

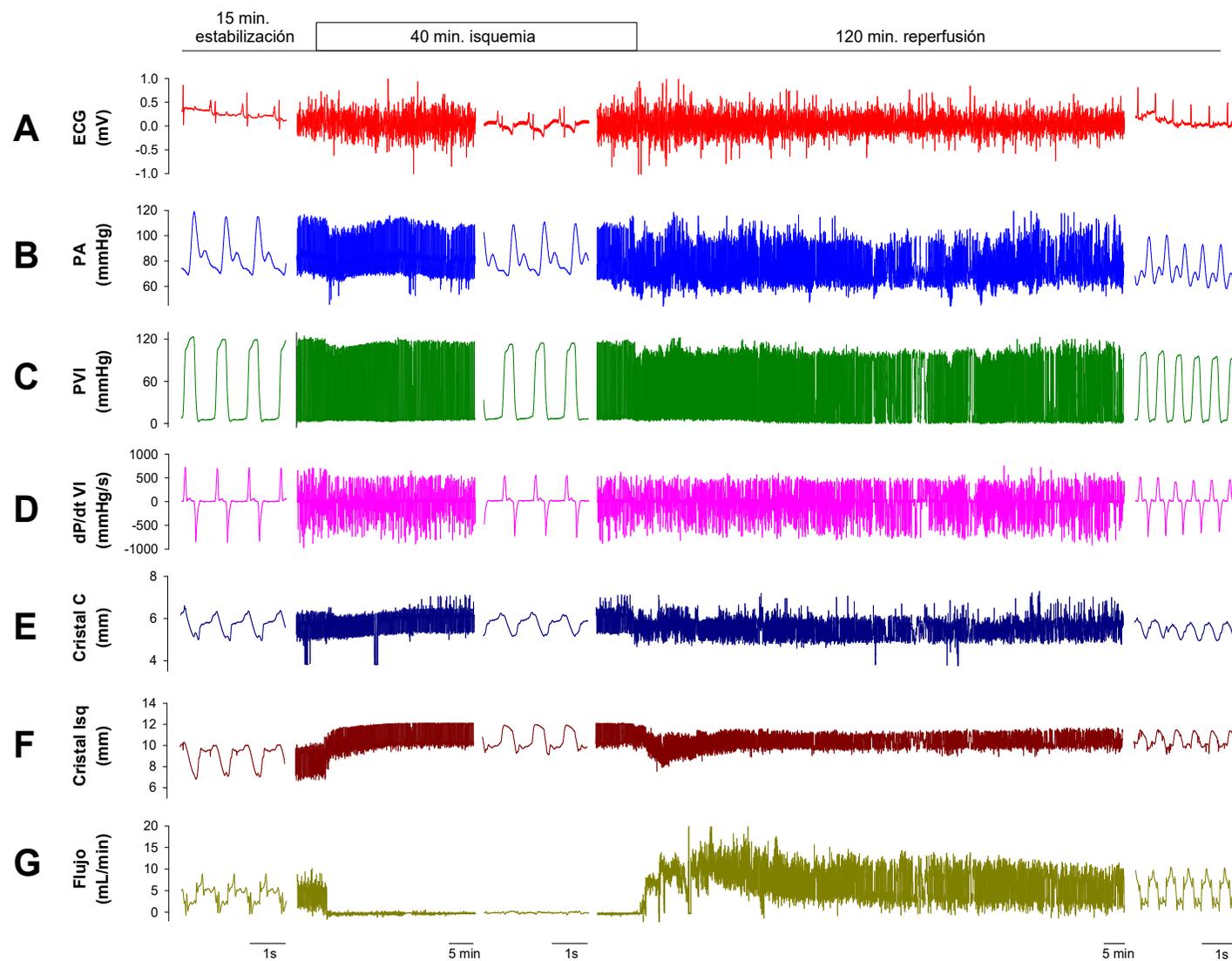


Figura 14. Registro representativo obtenido en un animal incluido en el grupo control, y sometido a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA y 2 horas de reperusión. Electrocardiograma (A), presión arterial (B), presión del ventrículo izquierdo (C), derivada de la presión ventricular (D), cristal control (E), cristal del área en riesgo (F), flujo sanguíneo en la arteria coronaria DA (G).

| | | Frecuencia cardiaca (latidos/min) | Presión aórtica (mmHg) | Presión sistólica VI (mmHg) | Presión telediastólica VI (mmHg) | (+)dP/dt VI (mmHg/s) | (-)dP/dt VI (mmHg/s) | Flujo coronario de DA (ml/min) | AS (control) | AS (isquemia) |
|--------------------------------|------------------------|---|------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------|
| Control (n=10) | <i>Basal</i> | 73.50±5.63 | 100.19±5.14 | 102.45±4.97 | 8.14±1.18 | 1682±121 | 1725±80 | 7.18±1.18 | 0.21±0.03 | 0.27±0.02 |
| | <i>40' isquemia</i> | 90.85±9.42 | 92.50±5.63 | 98.12±5.92 | 10.30±2.21 | 1427±60 * | 1616±117 | 0.00±0.00 * | 0.17±0.02 | -0.04±0.03 * |
| | <i>2 h reperfusión</i> | 119.86±11.09 * | 90.61±7.19 | 100.83±7.79 | 6.24±1.68 | 1305±110 * | 1673±177 | 9.30±2.05 | 0.14±0.02 | 0.01±0.02 * |
| GIK (n=7) | <i>Basal</i> | 74.04±5.21 | 85.21±3.95 | 91.58±3.67 | 5.14±1.25 | 1581±130 | 1523±126 | 5.01±1.15 | 0.23±0.02 | 0.24±0.03 |
| | <i>40' isquemia</i> | 85.71±7.31 | 83.43±4.80 | 94.86±3.99 | 6.04±1.62 | 1465±141 | 1602±100 | 0.00±0.00 * | 0.23±0.03 | -0.04±0.02 * |
| | <i>2 h reperfusión</i> | 133.10±19.39 * | 70.28±10.97 | 82.49±8.06 | 2.90±2.03 | 1381±194 | 1423±139 | 7.56±1.49 | 0.16±0.03 | 0.01±0.02 * |
| RIC (n=7) | <i>Basal</i> | 81.42±4.96 | 92.66±9.61 | 101.45±6.94 | 3.80±0.82 | 1745±114 | 1751±173 | 7.07±1.13 | 0.23±0.03 | 0.19±0.02 |
| | <i>40' isquemia</i> | 92.44±10.57 | 81.28±8.52 | 91.65±6.38 | 3.76±1.12 | 1529±38 | 1438±159 | 0.00±0.00 * | 0.21±0.03 | -0.06±0.02 * |
| | <i>2 h reperfusión</i> | 143.30±11.69 * | 78.14±10.22 | 96.63±7.59 | 4.59±1.17 | 1527±169 | 1607±162 | 14.43±5.41 | 0.17±0.03 | 0.00±0.02 * |
| GIK+RIC (n=7) | <i>Basal</i> | 75.40±3.98 | 97.27±8.86 | 96.26±5.49 | 4.88±0.79 | 1274±126 | 1536±132 | 7.57±1.77 | 0.23±0.04 | 0.23±0.02 |
| | <i>40' isquemia</i> | 89.58±7.40 | 89.21±4.68 | 89.41±3.65 | 4.25±0.64 | 1307±128 | 1368±70 | 0.00±0.00 * | 0.25±0.06 | -0.01±0.03 * |
| | <i>2 h reperfusión</i> | 142.93±13.03 * | 63.57±6.63 * | 79.95±6.25 | 4.52±0.96 | 1295±198 | 1260±155 | 10.29±3.03 | 0.17±0.05 | 0.03±0.03 * |
| Exenatida (n=8) | <i>Basal</i> | 81.19±7.80 | 113.29±7.06 | 112.06±5.46 | 8.67±2.15 | 2085±137 | 1919±97 | 11.47±2.67 | 0.23±0.04 | 0.26±0.03 |
| | <i>40' isquemia</i> | 78.01±9.42 | 102.94±7.78 | 99.29±7.44 | 9.65±2.48 | 1574±120 | 1514±151 * | 0.00±0.00 * | 0.24±0.03 | -0.05±0.02 * |
| | <i>2 h reperfusión</i> | 106.43±13.08 * | 105.64±10.39 | 105.97±9.85 | 7.99±1.96 | 1479±261 * | 1778±207 | 15.50±2.47 | 0.19±0.04 | -0.06±0.03 * |
| Exenatida+RIC (n=7) | <i>Basal</i> | 70.98±3.11 | 106.94±7.14 | 103.54±8.14 | 6.73±1.15 | 1802±278 | 1532±52 | 6.95±1.14 | 0.26±0.03 | 0.24±0.02 |
| | <i>40' isquemia</i> | 79.65±2.10 | 106.90±10.84 | 103.37±8.24 | 7.14±0.98 | 1879±338 | 1511±114 | 0.00±0.00 * | 0.24±0.04 | -0.05±0.01 * |
| | <i>2 h reperfusión</i> | 109.15±7.48 * | 97.42±10.15 | 98.67±9.39 | 5.37±1.30 | 1480±254 | 1613±224 | 10.99±3.05 | 0.22±0.05 | -0.05±0.02 * |

Tabla 2. Valores basales y al final de la isquemia y de la reperfusión de la frecuencia cardiaca, presión aórtica, presión sistólica y telediastólica del ventrículo izquierdo (VI), dP/dt (+) y (-) del VI, flujo coronario en la arteria coronaria DA, y acortamiento sistólico (AS) en las áreas control y en riesgo, en cerdos control y en cerdos tratados con condicionamiento isquémico remoto (RIC), glucosa-insulina-potasio (GIK), exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC. *(p<0.05) Indica diferencias significativas respecto a los datos basales correspondientes (MANOVA y test *post hoc* de Dunnet).

RESULTADOS

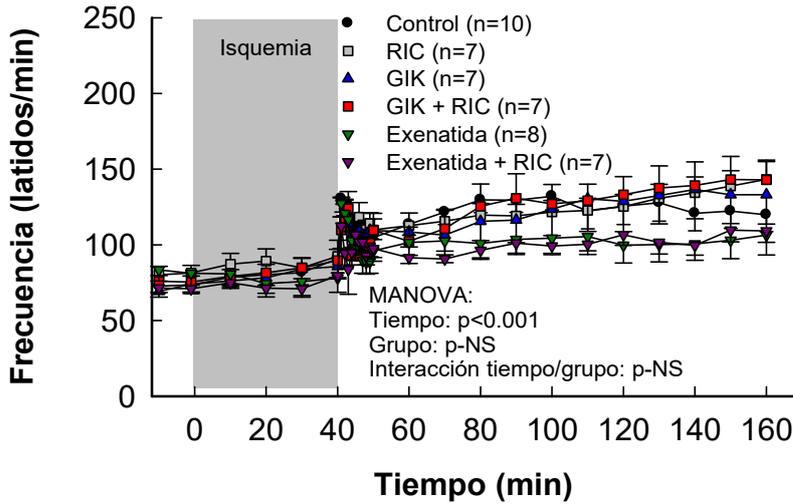


Figura 15. Cambios en la frecuencia cardíaca en cerdos sometidos a 40 minutos de isquemia miocárdica y 2 horas de reperfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

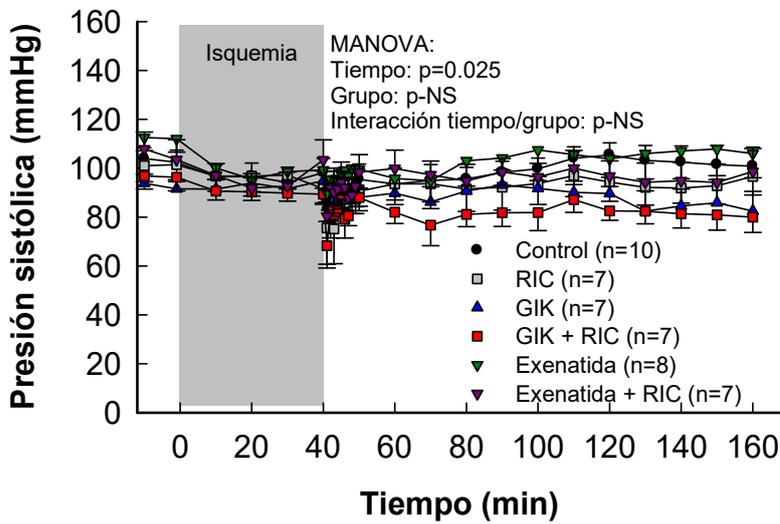


Figura 16. Cambios en la presión sistólica del ventrículo izquierdo en cerdos sometidos a 40 minutos de isquemia miocárdica y 2 horas de reperfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

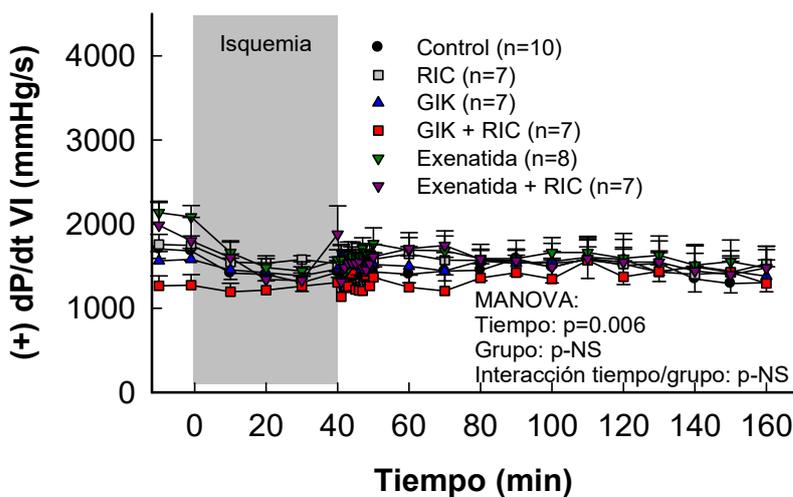


Figura 17. Cambios en la derivada positiva de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo en cerdos sometidos a 40 minutos de isquemia miocárdica y 2 horas de reperfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

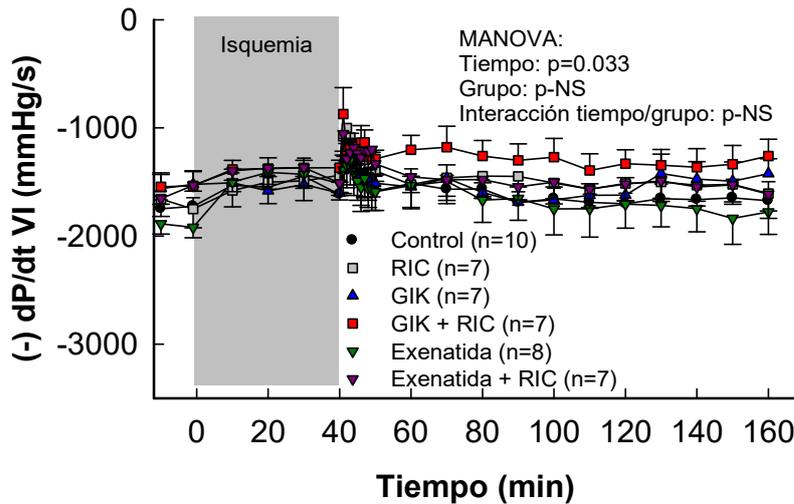


Figura 18. Cambios en la derivada negativa de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo, en cerdos sometidos a 40 minutos de isquemia miocárdica y 2 horas de reperfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

1.2 FLUJO SANGUÍNEO EN LA ARTERIA CORONARIA DA

El flujo sanguíneo coronario basal se situó, en todos los grupos entre 5 y 12 mL/min, sin diferencias entre grupos (Tabla 2). Durante la isquemia, el flujo desapareció por completo, aumentando por encima de los valores iniciales en el momento de la reapertura de la arteria coronaria (fase hiperémica), y estabilizándose posteriormente (Fig. 19). Al igual que ocurrió con las variables hemodinámicas, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución durante la isquemia-reperfusión del flujo sanguíneo coronario entre los distintos grupos de tratamiento (Tabla 2, Fig. 19).

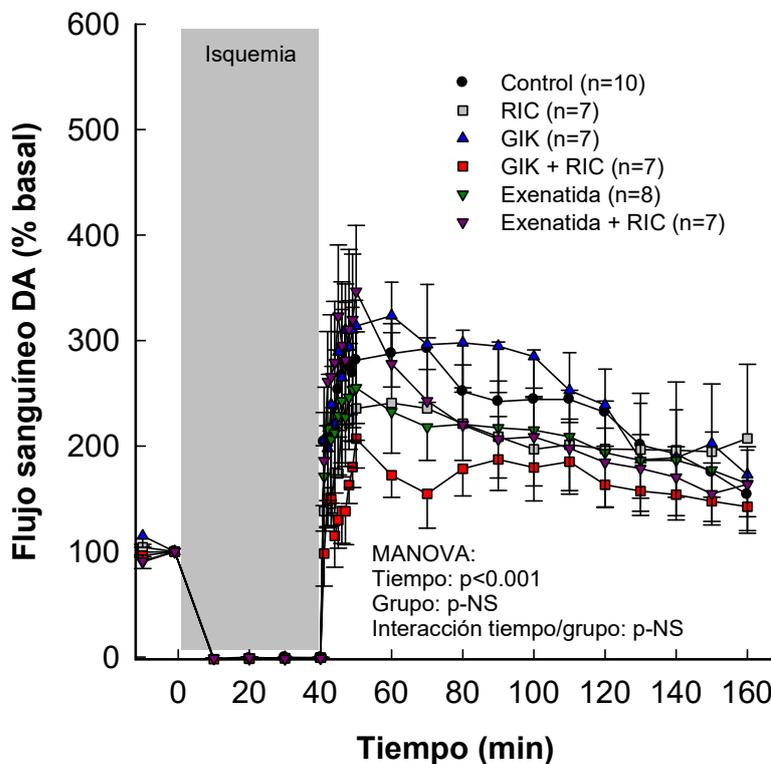


Figura 19. Cambios en el flujo sanguíneo en la arteria coronaria DA en cerdos sometidos a 40 minutos de isquemia miocárdica y 2 horas de reperfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

1.3 FUNCIÓN REGIONAL DEL MIOCARDIO

Tanto la longitud telediastólica (LTD) como la telesistólica (LTS) de la región miocárdica control permanecieron prácticamente invariables a lo largo de todo el experimento (Fig. 20-A/B), dando lugar, por tanto, a un acortamiento sistólico regional prácticamente constante (Fig. 20-C). Por el contrario, tanto la longitud telediastólica como la telesistólica del cristal situado en el área en riesgo sufrieron un aumento durante el periodo de isquemia, que se revirtió durante la reperfusión (Fig. 20-D/E). Estos cambios se tradujeron en un descenso del acortamiento sistólico regional en esta región miocárdica desde el comienzo del periodo isquémico hasta el final del ensayo, con respecto a los valores basales (Fig. 20-F). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas, entre los distintos grupos experimentales, en la evolución ni del acortamiento sistólico regional, ni de las longitudes telesistólica y telediastólica, ni en la región isquémica ni en la control (Tabla 2).

A pesar de la ausencia de diferencias significativas, entre los distintos grupos experimentales, en la evolución de las longitudes telediastólica y telesistólica o del acortamiento sistólico regional en el área en riesgo, la tasa de hipercontractura máxima inducida por la reperfusión en dicha región, y determinada como porcentaje del incremento de la longitud telediastólica observado al final de la isquemia, sí mostró un efecto del tratamiento, siendo máxima en el grupo control (Fig. 21), y reducida significativamente por el RIC (Fig. 21-B).

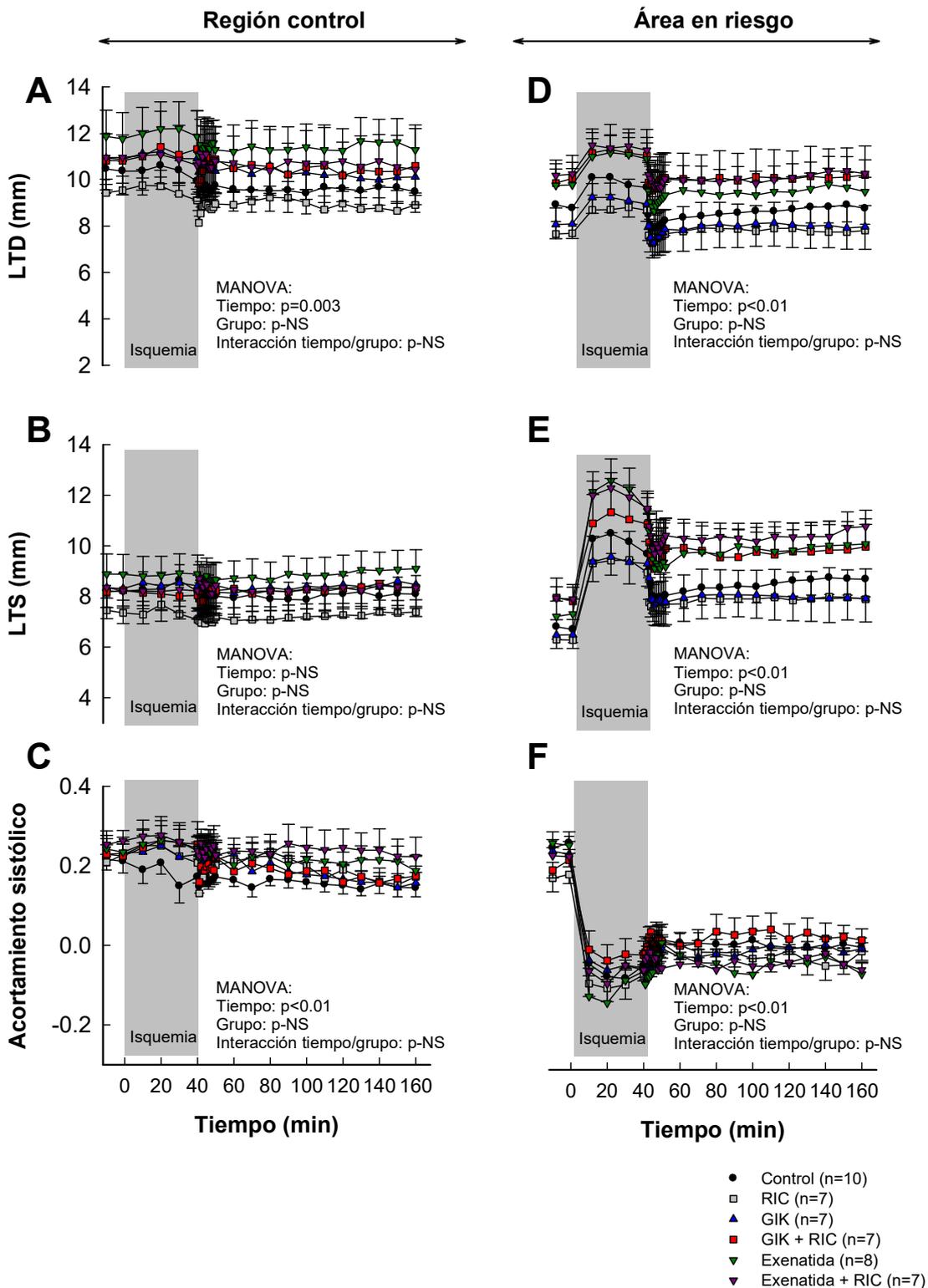


Figura 20. Cambios en la longitud telediastólica (A), telesistólica (B) y en el acortamiento sistólico regional (C), medidos mediante cristales ultrasónicos colocados en el miocardio de la región control y en el área en riesgo (D, E, F), en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 2 horas de reperusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

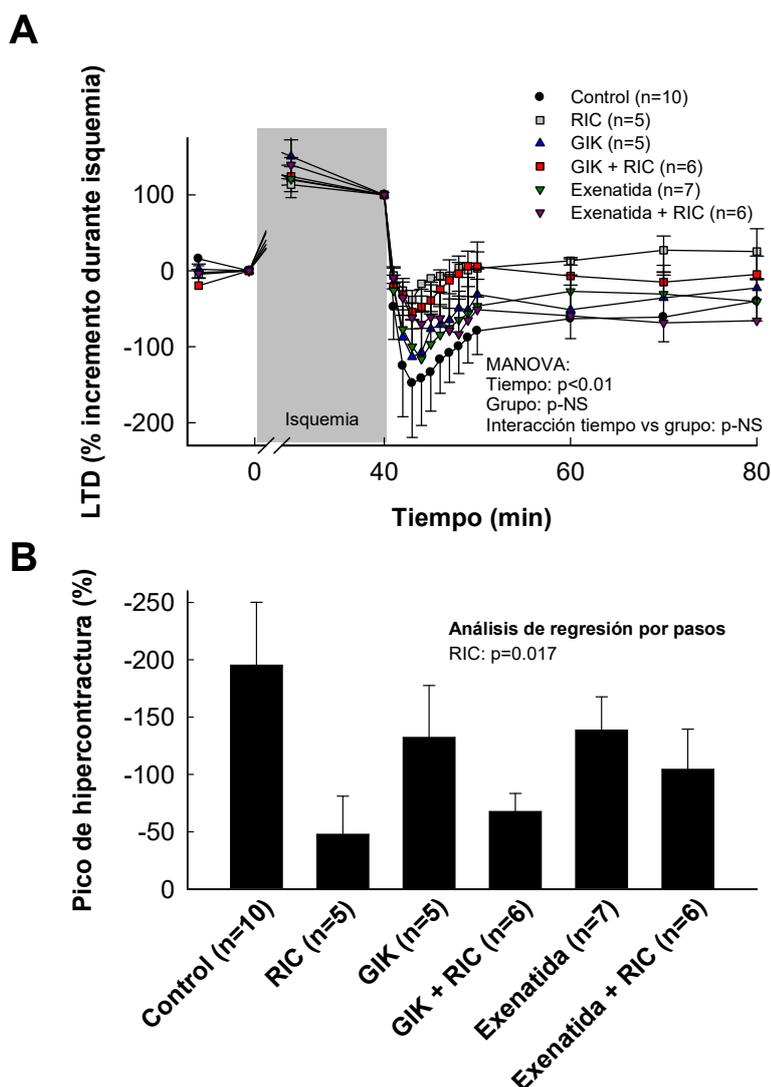


Figura 21. Cambios en la longitud telediastólica (LTD) del área en riesgo, expresados como porcentaje del incremento al final de la isquemia **(A)**, y pico máximo de hipercontractura durante la reperfusión inicial **(B)**, en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 2 horas de reperfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC.

1.4 TAMAÑO DEL INFARTO

Tanto el tamaño del área en riesgo (Fig. 22-A), como la temperatura corporal de los animales durante la isquemia (Fig. 22-B), fue similar en todos los grupos experimentales, no hallándose diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, el tamaño del infarto, que en el grupo control promedió un $59.21 \pm 3.17\%$ del área en riesgo (Figs. 22-C y 23), fue significativamente reducido por todos los tratamientos (Figs. 22-C y 23). Además, el grupo tratado con la combinación de RIC y GIK presentó un efecto aditivo, con un tamaño del infarto significativamente inferior al de los tratamientos individuales por separado ($p < 0.05$, ANOVA) (Fig. 22-C).

Mediante análisis jerarquizado se demostró un efecto significativo del número de tratamientos (ninguno, uno o dos) sobre el tamaño del infarto ($p < 0.001$), sin diferencias significativas entre los distintos tratamientos, siendo la terapia combinada (dos procedimientos) más efectiva reduciendo el tamaño del infarto que los tratamientos individuales ($p = 0.004$) (Fig. 22-D).

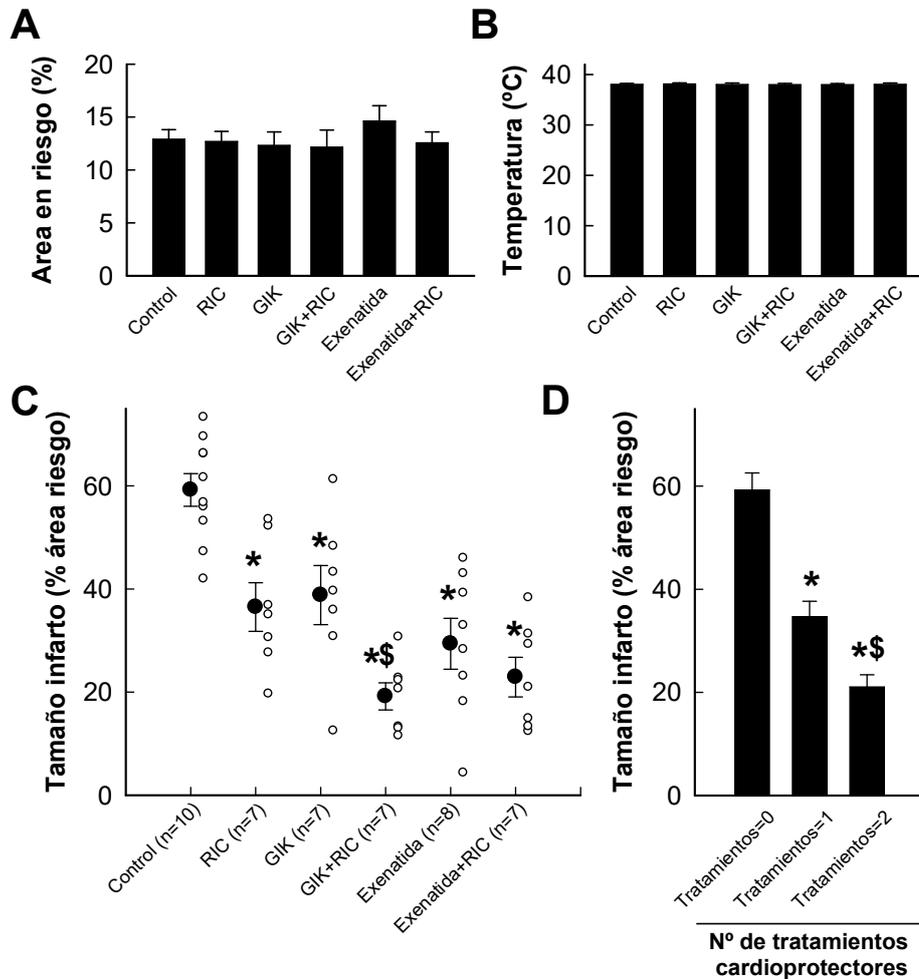


Figura 22. Tamaño del área en riesgo (A) y temperatura corporal durante la isquemia (B), en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 2 horas de perfusión, sin ningún tratamiento adicional (control), o tratados con RIC, GIK, exenatida, GIK+RIC o exenatida+RIC. (C) Tamaño del infarto en los distintos grupos experimentales. * ($p < 0.05$, ANOVA) indica diferencias significativas respecto al grupo control; § ($p < 0.05$, ANOVA) indica diferencias significativas respecto a los grupos tratados con GIK o RIC individualmente. (D) Análisis mediante ANOVA jerarquizado del infarto. * ($p < 0.001$) indica diferencias significativas respecto al grupo control. § ($p < 0.01$) indica diferencias significativas entre los grupos tratados con una o dos maniobras cardioprotectoras.

RESULTADOS

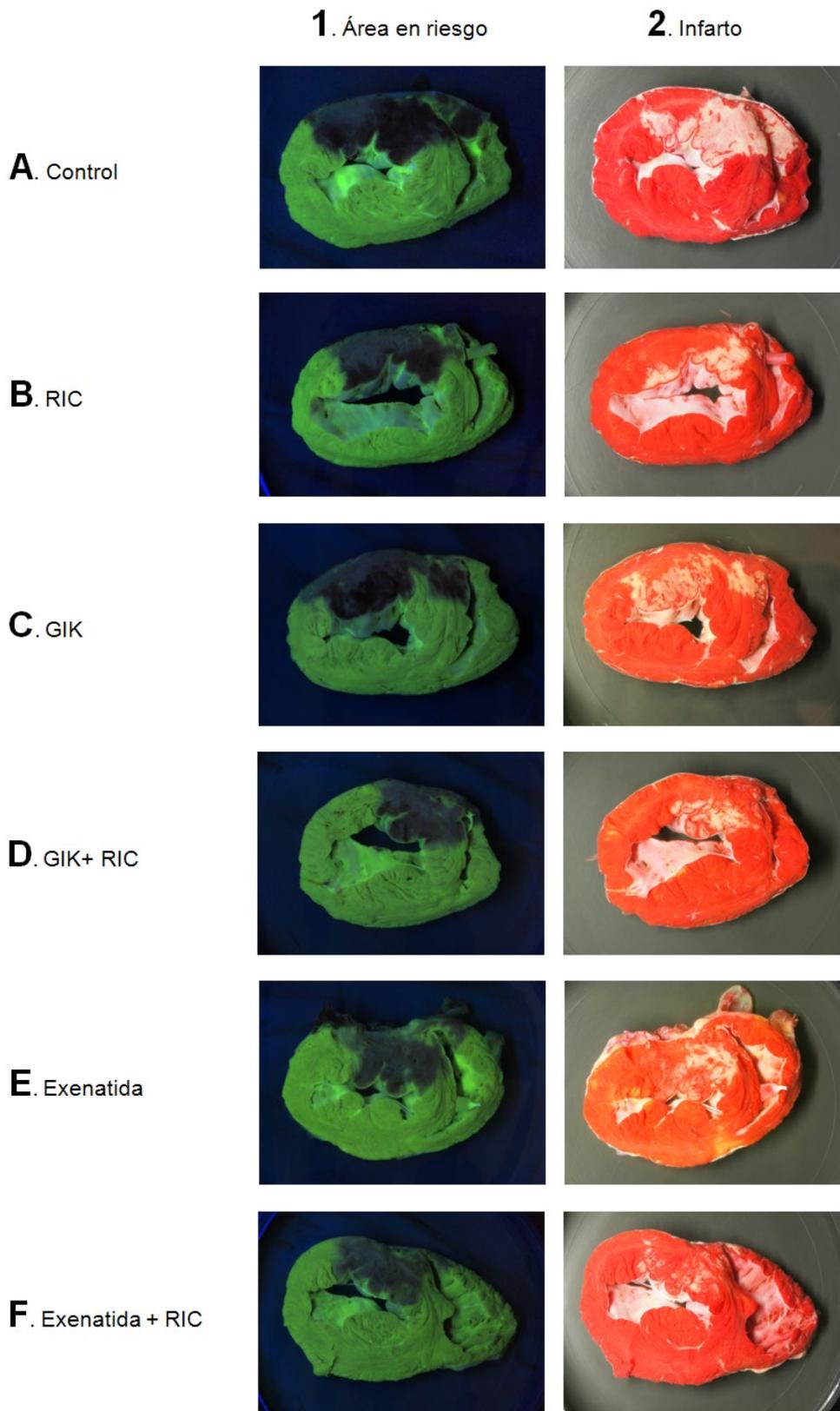


Figura 23. Imágenes representativas de secciones transversales de corazones porcinos mostrando la delimitación del área en riesgo (mediante marcaje con fluoresceína) (1) y del área infartada (tinción de TTC) (2), en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA y 2 horas de reperusión sin intervención adicional (A), o tratados con RIC (B), GIK (C), GIK+RIC (D), exenatida (E) o exenatida+RIC (F).

1.5 ARRITMIAS VENTRICULARES DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

La incidencia de taquicardias ventriculares (TV) durante la isquemia miocárdica fue baja en todos los grupos experimentales. Sin embargo, durante la reperfusión se observó un incremento marcado en su número, hasta un total de 43.30 ± 7.30 TV en el grupo de animales control (Fig. 24). Hay que destacar que ninguno de los tratamientos administrados provocó un efecto proarrítmico. Al contrario, y de forma similar a lo que ocurría con el tamaño del infarto, el tratamiento combinado formado por GIK+RIC consiguió disminuir significativamente el número de TV durante la reperfusión (Fig. 24). Mediante análisis factorial se demostró que la terapia combinada (dos tratamientos) lograba reducir, de forma significativa, la incidencia de TV durante la reperfusión al ser comparada con el resto de grupos (un tratamiento o ninguno) (22.21 ± 4.08 TV vs. 37.27 ± 4.87 y 43.30 ± 7.3 , respectivamente; $p < 0.05$) (Fig. 24).

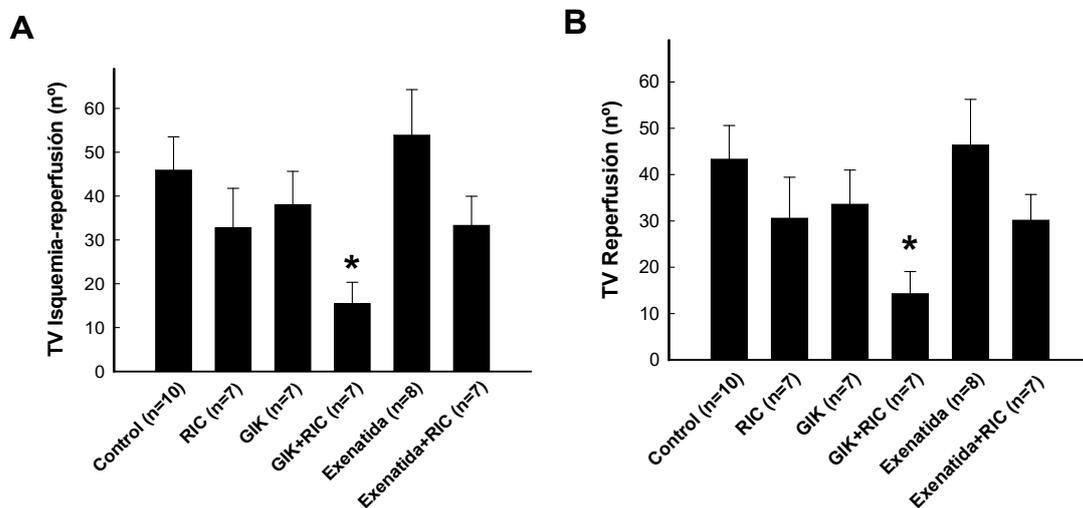


Figura 24. Número total de taquicardias ventriculares durante la isquemia y la reperfusión (A), y sólo durante la reperfusión (B), en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA, seguidos de 2 horas de reperfusión, tratados o no con RIC, GIK o exenatida, solos o en combinación. *($p < 0.05$, test de Kruskal-Wallis) indica diferencias significativas respecto al grupo control.

Además de una reducción en el número de TV durante la reperfusión, el tratamiento combinado compuesto por GIK+RIC disminuyó de forma significativa el tiempo en arritmia (TV o FV) (Fig. 25-A) y el número de arritmias sostenidas (Figs. 25-B y 26), mientras que la duración media de las arritmias fue similar en todos los grupos (Fig. 25-C). A diferencia de las TV, la incidencia de FV fue baja en todos los grupos, tanto durante la isquemia como durante la reperfusión, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 26).

RESULTADOS

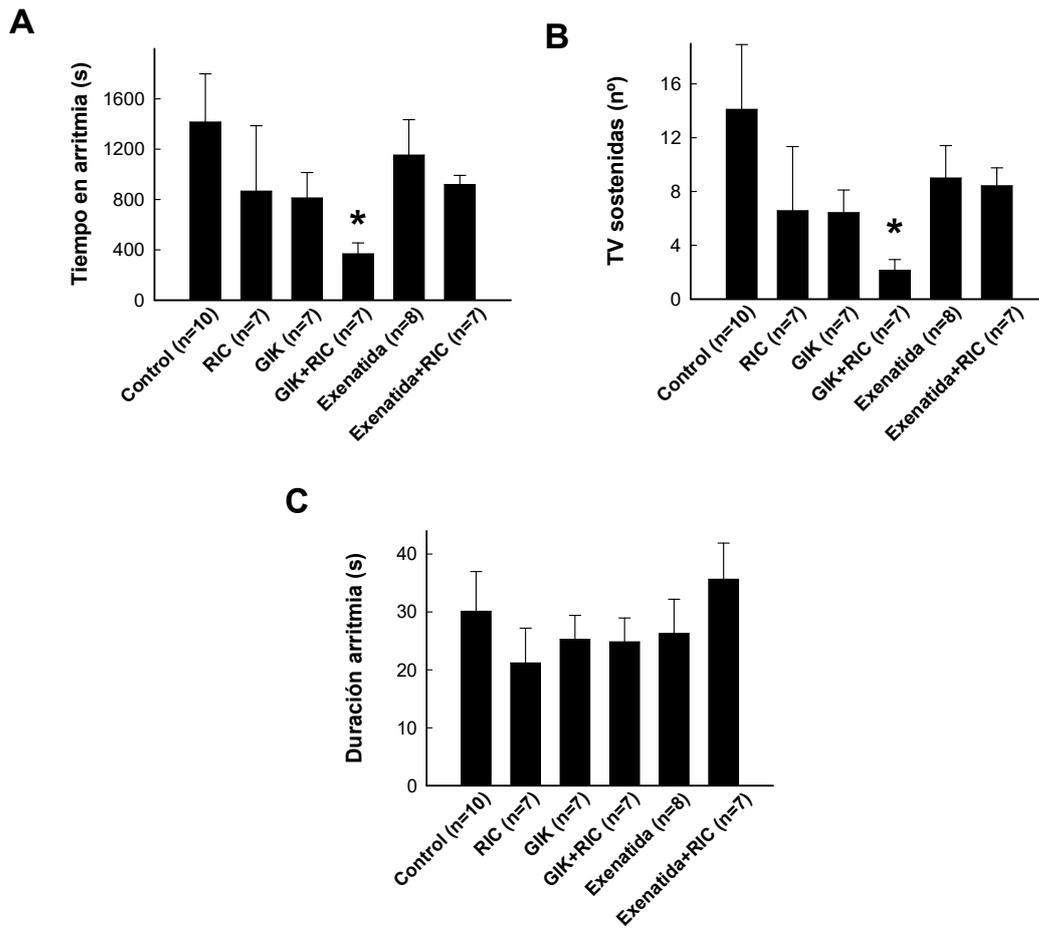


Figura 25. Tiempo en arritmia (TV o FV) (A), número de taquicardias ventriculares sostenidas (>30s) (B), y duración de las arritmias (C) en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA, seguidos de 2 horas de reperusión, tratados o no con RIC, GIK o exenatida, solos o en combinación. *($p < 0.05$, test de Kruskal-Wallis) indica diferencias significativas respecto a los animales control.

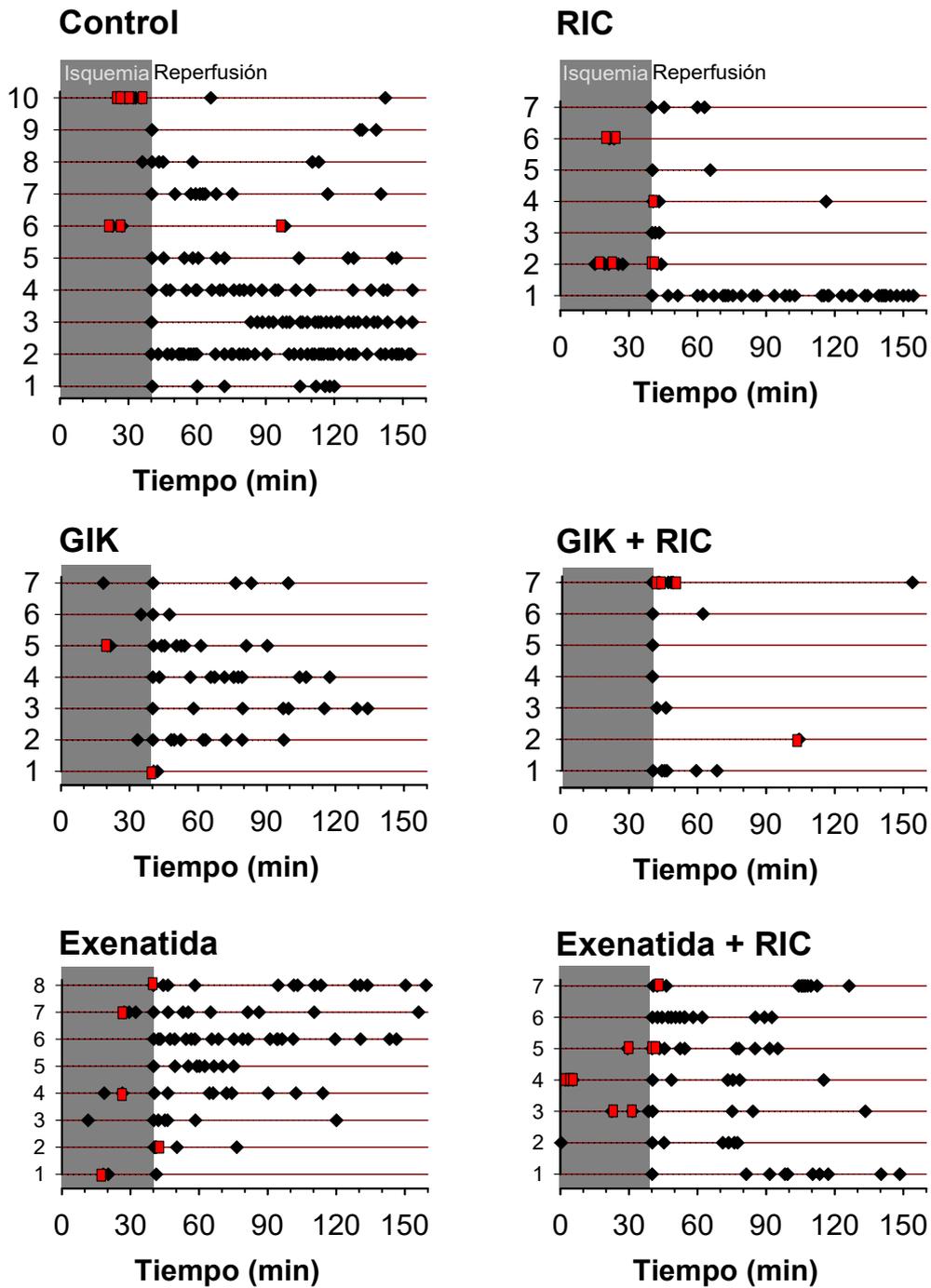


Figura 26. Taquicardias ventriculares sostenidas (TV) (>30s) y fibrilaciones ventriculares (FV) en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA, seguidos de 2 horas de reperfusión, tratados o no con RIC, GIK o exenatida, solos o en combinación. Cada línea horizontal representa un animal. Cada diamante negro indica un episodio de TV sostenida. Los cuadrados rojos representan las FV.

2 Mecanismos implicados en la protección por RIC, GIK o exenatida, y por la terapia combinada, sobre el daño por isquemia-reperfusión

2.1 CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE

La glucemia mostró unos valores basales que oscilaron entre 65 y 80 mg/dL, disminuyendo de forma significativa durante el periodo de oclusión coronaria, sin encontrarse diferencias entre los distintos grupos experimentales (Fig. 27-A). Sin embargo, la concentración de insulina en plasma, medida a los 5 minutos de la reperfusión, estaba incrementada sólo en aquellos animales que habían sido tratados con GIK (Fig. 27-B).

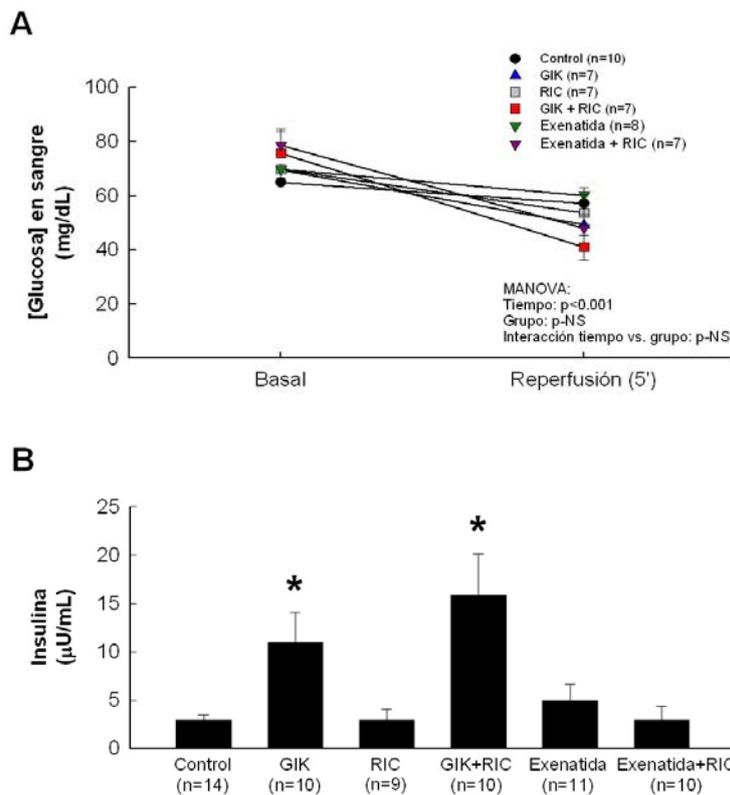


Figura 27. Concentraciones de glucosa en sangre (A) e insulina en plasma (B) medidas basalmente y/o después de 5 minutos de reperfusión en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de reperfusión. *(p<0.05, ANOVA) indica diferencias significativas respecto al grupo control.

2.2 METABOLISMO MIOCÁRDICO

En la figura 28 se muestran unos espectros de ¹H de resonancia magnética nuclear representativos, obtenidos a partir de extractos miocárdicos del área en riesgo (Fig. 28-A) o de la región control (Fig. 28-B) de un corazón porcino sometido a isquemia transitoria seguida de reperfusión. Cada uno de los picos detectados corresponde a un metabolito, mientras que el área bajo la curva de los mismos permite calcular la concentración del metabolito en

RESULTADOS

cuestión. El análisis de resonancia magnética nuclear permitió demostrar que el miocardio del área en riesgo presentaba una disminución notable en las concentraciones de ADP, ATP y glutamato, así como un incremento significativo en las de lactato, succinato y alanina (Fig. 29), aunque sin diferencias entre los distintos grupos experimentales.

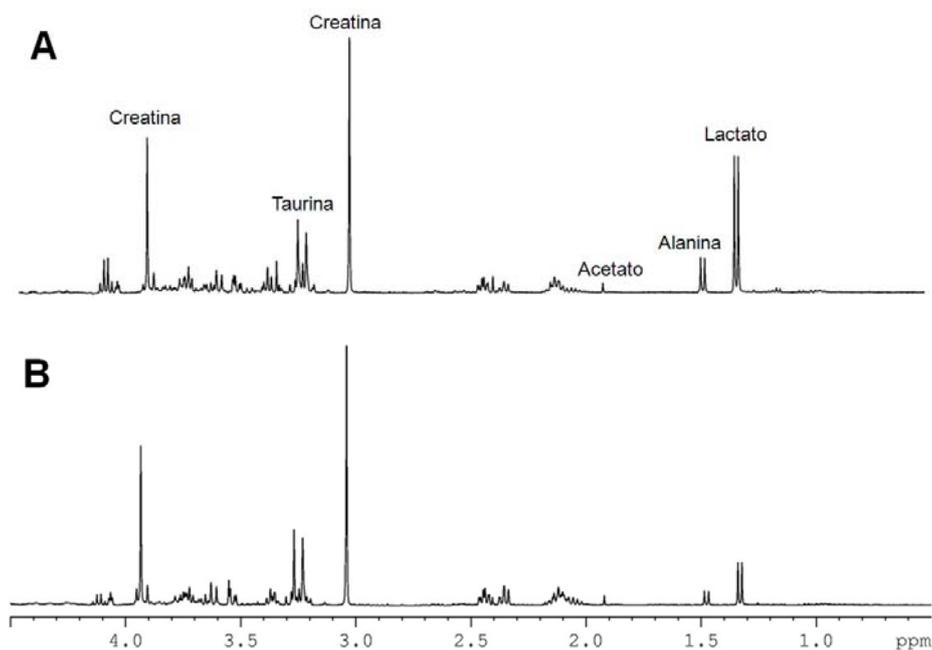


Figura 28. Espectros NOESYPR1D de ^1H -RMN representativos, obtenidos a partir de extractos miocárdicos del área en riesgo (A) o de la región control (B), de un corazón porcino sometido a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA, seguidos de 5 minutos de reperfusión.

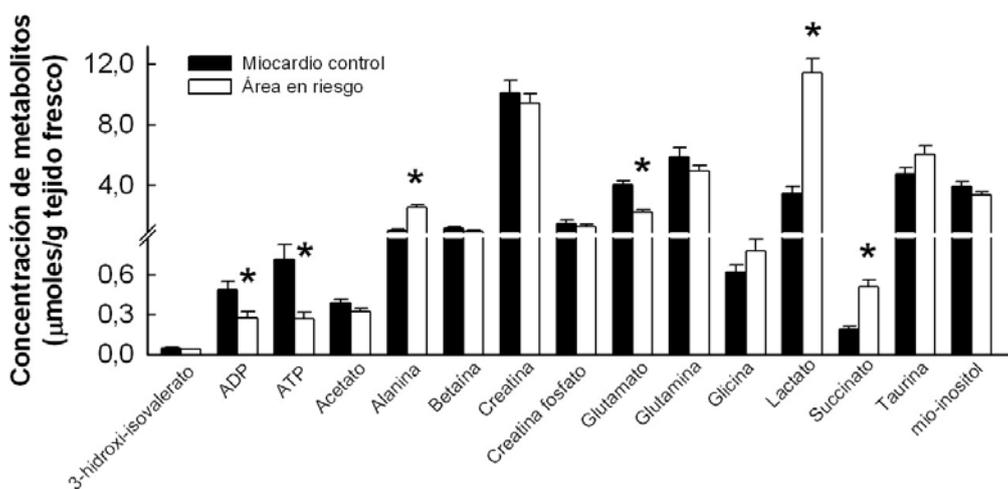


Figura 29. Concentración de los diferentes metabolitos detectados mediante resonancia magnética nuclear en extractos de tejido miocárdico control y del área en riesgo, en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 5 minutos de reperfusión. *($p < 0.05$, test de la t de Student) indica diferencias significativas respecto al miocardio control.

A partir de los espectros, y mediante análisis supervisado (OPLS-DA), se pudo discriminar entre aquellas muestras pertenecientes a los grupos control o RIC de aquellas que habían recibido GIK o exenatida ($p < 0.05$, $Q^2 = 0.129$ y 0.002 , respectivamente). No fue posible discriminar, aún más, entre las muestras que habían recibido tratamiento con GIK de las que recibieron exenatida. Cuando las muestras control o RIC, por un lado, y las tratadas con GIK o exenatida, por otro, fueron agrupadas, el modelo OPLS obtenido tuvo un alto valor predictivo ($Q^2 = 0.421$, Fig. 30-A), sugiriendo que tanto GIK como exenatida tuvieron efectos similares sobre el patrón metabólico cardiaco. Siguiendo este modelo, las muestras asociadas a tratamientos combinados, fueron clasificadas correctamente como las correspondientes a las intervenciones metabólicas en solitario (Fig. 30-B).

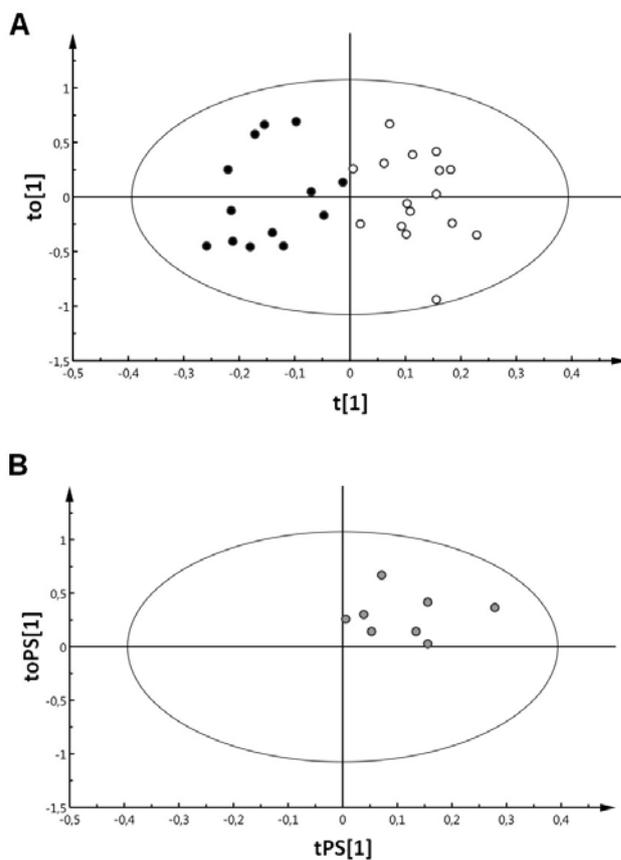


Figura 30. Huella metabólica de los espectros de ^1H -RMN de tejido miocárdico. **(A)** Modelo OPLS-DA capaz de diferenciar las intervenciones metabólicas de las muestras correspondientes a los grupos control o tratados con RIC. GIK y exenatida, (puntos blancos) y controles y RIC (puntos negros). **(B)** Clasificación de la combinación de tratamientos metabólicos con RIC (puntos grises), utilizando el mismo modelo.

Los datos del análisis discriminante indican, por tanto, la existencia de un perfil metabólico distinto entre las muestras control o RIC y aquellas que recibieron tratamiento con GIK o exenatida. Sin embargo, no fue posible detectar un solo metabolito que fuera responsable de las diferencias, sino que éstas se basaron probablemente en una combinación de variables.

2.3 ACTIVACIÓN DE VÍAS CITOSÓLICAS DE SEÑALIZACIÓN

Para analizar si la cardioprotección observada con los distintos tratamientos era debida a la participación de las cascadas citosólicas clásicamente relacionadas con la cardioprotección, como las vías RISK o SAFE, estudiamos el estado de fosforilación (o lo que es lo mismo, de activación) y la expresión total de varias proteínas quinasas involucradas en ambas. Concretamente, para analizar el papel de la vía RISK evaluamos las proteínas Akt, ERK1/2 y GSK3 β , mientras que para la vía SAFE estudiamos STAT3. Además se valoró el grado de activación de p38-MAPK y de AMPK.

El estudio de los datos de *western blot* mediante análisis de regresión paso a paso demostró en el miocardio del área en riesgo, una reducción general en la activación de Akt y STAT3 (Fig. 31, valor de p correspondiente a Región), así como un aumento significativo en el grado de fosforilación de ERK1/2, GSK3 β , y p38 MAPK (Fig. 32), a los 5 minutos de la reperfusión.

Además, mediante ANOVA convencional observamos que el tratamiento con GIK producía un incremento en el grado de fosforilación de Akt y STAT3, tanto en el área en riesgo como en la región control (Fig. 31). El resto de tratamientos utilizados no modificó de forma clara el estado de fosforilación de Akt, ERK1/2, GSK3 β , STAT3, p38-MAPK o AMPK (Figs. 31 y 32).

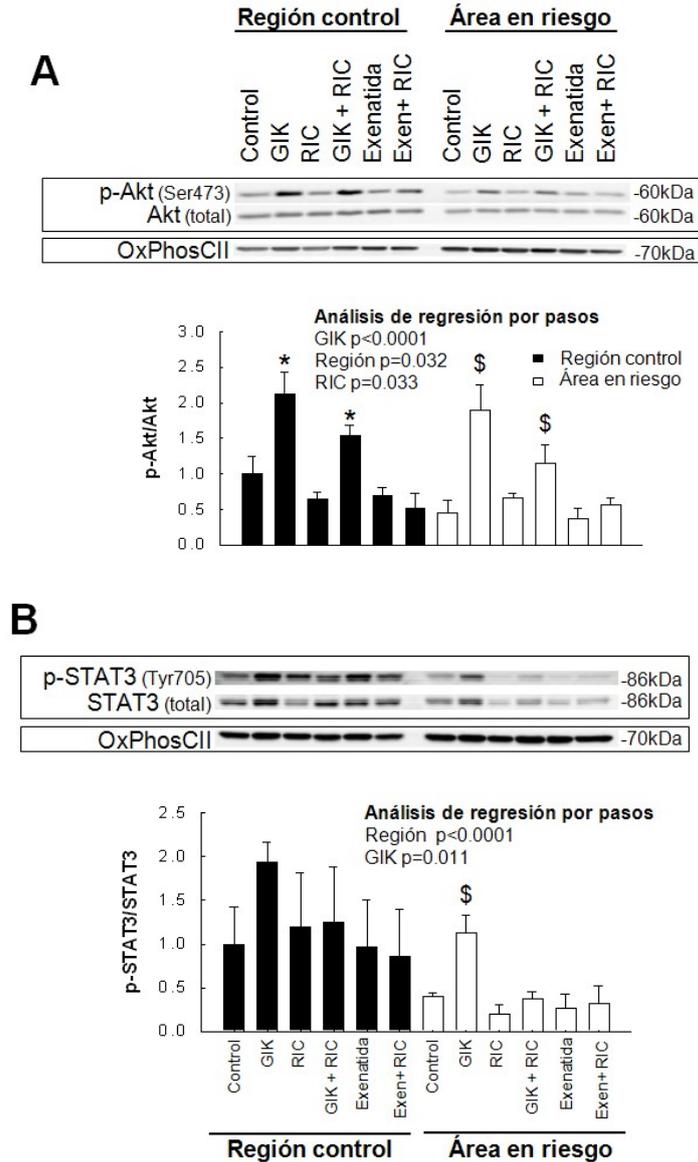


Figura 31. *Western blot* representativos mostrando la expresión total y el estado de fosforilación de Akt (**A**) y de STAT3 (**B**), junto a los niveles de OxPhosCII, en extractos de miocardio obtenidos de 4 cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 5 minutos de reperusión. Las gráficas muestran la cuantificación del grado de fosforilación de cada proteína respecto a su cantidad total, tanto en el miocardio control como en el área en riesgo.* y \$ (p<0.05, ANOVA) indican diferencias significativas respecto a los controles de la región miocárdica correspondiente.

RESULTADOS

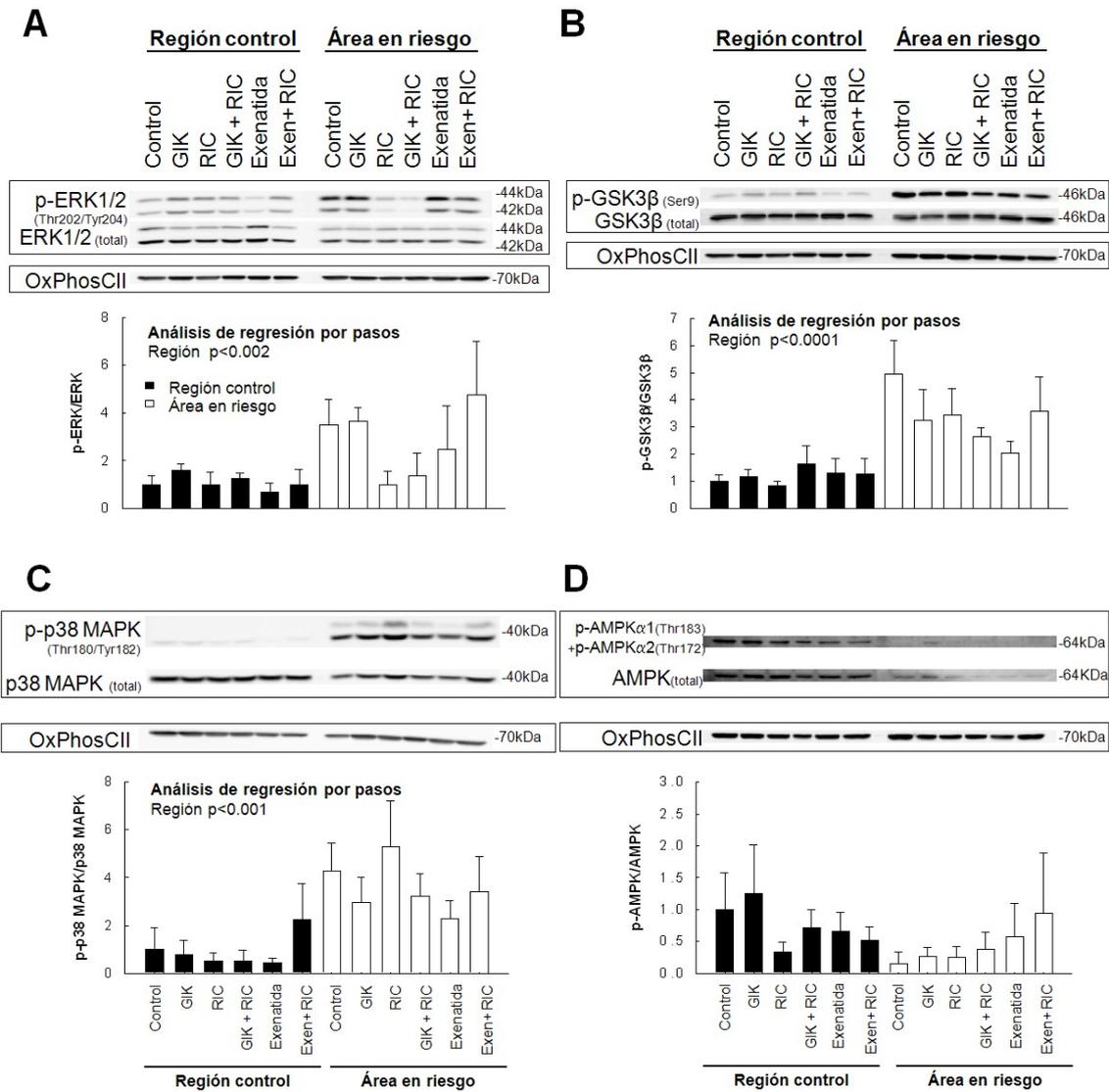


Figura 32. Western blot representativos mostrando la expresión total y el grado de fosforilación de ERK1/2 (A), GSK3β (B), p38 MAPK (C) y AMPK (D) junto a los niveles de OxPhosCII, en extractos de miocardio obtenidos de 4 cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la coronaria DA seguidos de 5 minutos de reperfusión. Las gráficas muestran la cuantificación del grado de fosforilación de cada proteína respecto a su cantidad total, tanto en el miocardio control como en el área en riesgo.

2.4 EXPRESIÓN DE eNOS

Para analizar el papel jugado por la vía del GMPc/PKG, estudiamos el estado de fosforilación de eNOS, junto con su expresión total, además de la relación entre los dímeros y monómeros de eNOS.

El análisis de regresión paso a paso mostró que el grado de fosforilación de eNOS se encontraba reducido, de forma general, en el área en riesgo de todos los grupos, respecto a su región control (Fig. 33-A, valor de p correspondiente a Región).

Respecto al efecto de las estrategias terapéuticas estudiadas, pudimos observar que el tratamiento con GIK incrementaba el grado de fosforilación de eNOS, tanto en el miocardio de la zona control como en el área en riesgo, mientras que la exenatida logró esta misma activación solamente en el miocardio reperfundido (Fig. 33-A).

En ninguno de los casos se observaron cambios en cuanto a la relación dímero:monómero, ni entre regiones, ni entre tratamientos, excepto para el RIC, tratamiento que se asoció, mediante el análisis de regresión paso a paso, con una relación dímero:monómero más alta (Fig. 33-B).

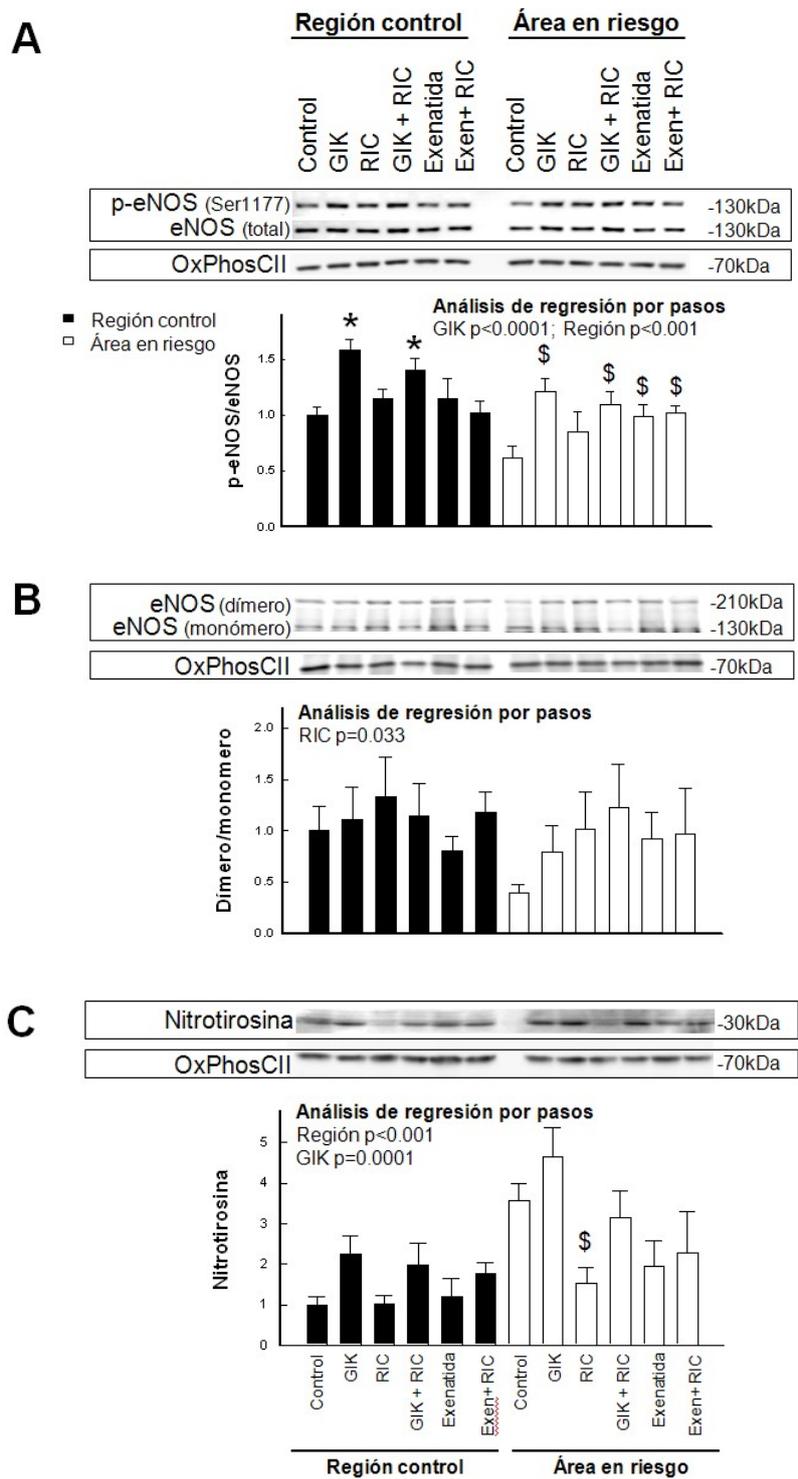


Figura 33. *Western blots* representativos mostrando la expresión total y el grado de fosforilación de eNOS (A), la presencia de dímeros de eNOS (B) y los niveles de nitrotirosina (C), junto a la expresión de OxPhosCII, utilizado como control de carga, en extractos de miocardio obtenidos de 4 cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 5 minutos de perfusión. * y \$ ($p < 0.05$, ANOVA) indican diferencias significativas respecto a los controles de cada área miocárdica.

2.5 EXPRESIÓN DE Cx43

Los análisis de *western blot*, realizados a partir de fracciones totales obtenidas de zonas miocárdicas control y del área en riesgo de cerdos sometidos a ischemia-reperfusión, detectaron, en todos los grupos, y tal y como se ha descrito previamente (Sánchez et al., 2013), 3 bandas inmunorreactivas para Cx43, asociadas a 3 estados de fosforilación diferentes, (Fig. 34). La mayor parte de la Cx43 presente en la región control, fue detectada en las dos bandas de migración más lentas, correspondiéndose con las isoformas fosforiladas P1 y P2, mientras que en el área en riesgo fue detectada principalmente su isoforma no fosforilada (P0) (Fig. 34). Como consecuencia, la relación entre la isoforma no fosforilada respecto a la Cx43 total mostró un aumento significativo en el área en riesgo respecto a la región control. Sin embargo, este incremento en la expresión de las isoformas no fosforiladas de Cx43 no fue modificado por los tratamientos con RIC, GIK o exenatida, solos o en combinación. De igual manera, tampoco se hallaron cambios en la expresión total de Cx43 en ninguno de los casos.

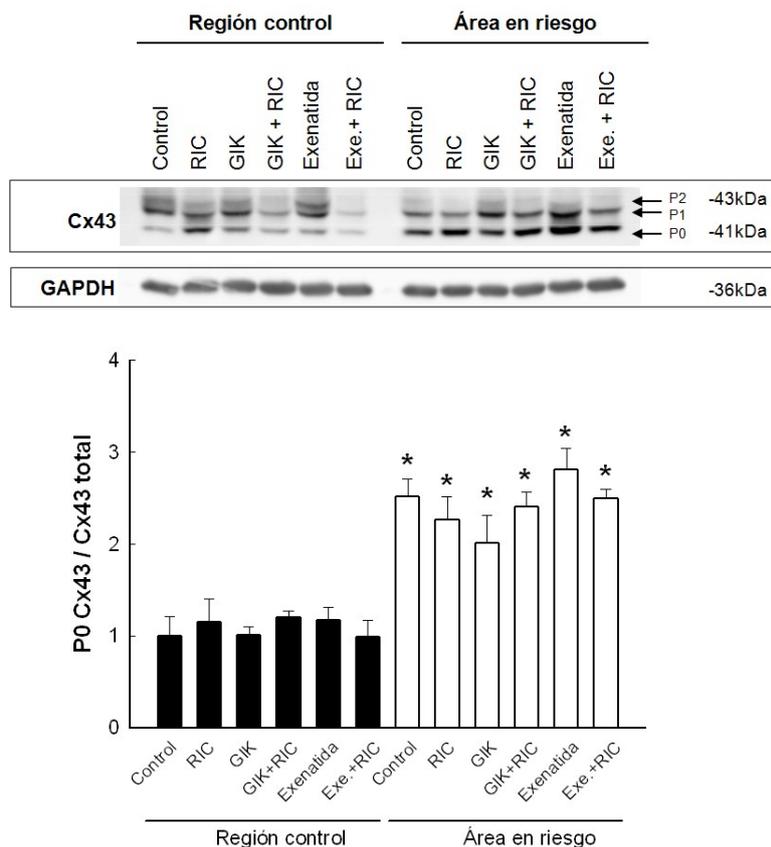


Figura 34. *Western blot* representativo mostrando la expresión de Cx43, junto al control de carga GAPDH, en la región control y en el área en riesgo, en cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 5 minutos de reperfusión, tratados o no con RIC, GIK o exenatida, solos o en combinación. *($p < 0.05$, ANOVA) indica un incremento significativo en la expresión de las isoformas no fosforiladas de Cx43, cuantificadas en relación a la cantidad de Cx43 total, respecto a su correspondiente región control.

2.6 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Puesto que la inhibición de la respiración mitocondrial puede limitar el daño por isquemia-reperusión (Valls-Lacalle et al., 2016), decidimos obtener mitocondrias aisladas a partir de tejido miocárdico porcino, para averiguar si existían cambios en el consumo de oxígeno que pudiesen explicar la cardioprotección observada con los distintos tratamientos.

Así, se observó que las tasas de consumo de oxígeno, estimuladas por ADP, en mitocondrias aisladas del área en riesgo de cerdos control, se encontraban reducidas respecto a las obtenidas en el miocardio control (reducción del $29.3 \pm 9.2\%$, Fig. 35). Sin embargo, esta depresión de la respiración mitocondrial fue similar en todos los grupos experimentales, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 35, panel inferior).

Por otro lado, mediante análisis de regresión paso a paso se observó que el tratamiento con GIK producía, únicamente en el miocardio control, una reducción significativa en el consumo de oxígeno estimulado por ADP.

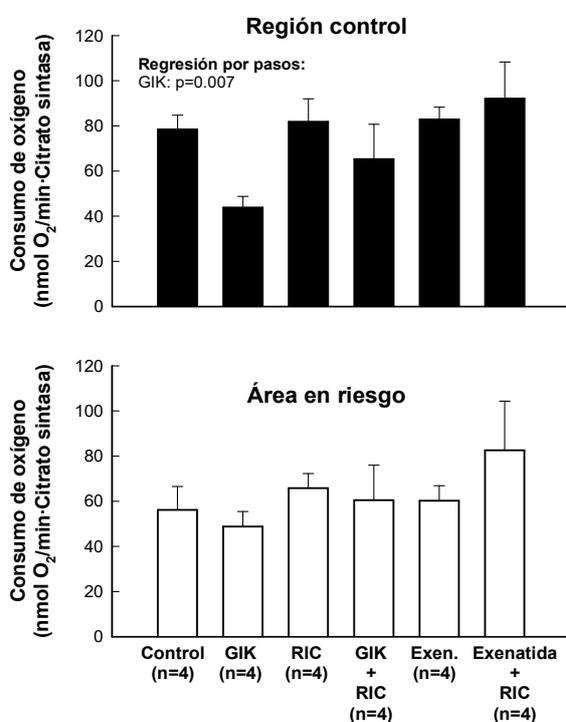


Figura 35. Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas, obtenidas de la región miocárdica control y del área en riesgo, en 4 cerdos sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria DA seguidos de 5 minutos de reperusión.

2.7 NIVELES DE NITROTIROSINA EN MIOCARDIO

Para analizar el posible papel que podía jugar el estrés oxidativo en la cardioprotección inducida por los distintos tratamientos, analizamos los niveles tisulares de nitrotirosina.

El análisis de regresión paso a paso permitió demostrar que los niveles de nitrotirosina estaban elevados, de forma general, en el área en riesgo (Fig. 33-C, valor de p correspondiente a Región), siendo significativamente reducidos por el tratamiento con RIC (Fig. 33-C), terapia que anteriormente ya se había asociado con una relación dímero:monómero más alta (Fig. 33-B).

3 Estudio de los mecanismos humorales implicados en la protección por condicionamiento isquémico remoto

3.1 ESPECTROSCOPIA DE ¹H-RMN DE DIALIZADOS PLASMÁTICOS

En la figura 36 se muestra un espectro de ¹H de resonancia magnética nuclear representativo, obtenido a partir de los dializados plasmáticos procedentes de sangre extraída de un cerdo en situación basal. Al igual que ocurría en los extractos tisulares, cada uno de los picos detectados corresponde a un metabolito, mientras que el área bajo de curva de los mismos permite calcular la concentración del metabolito en cuestión.

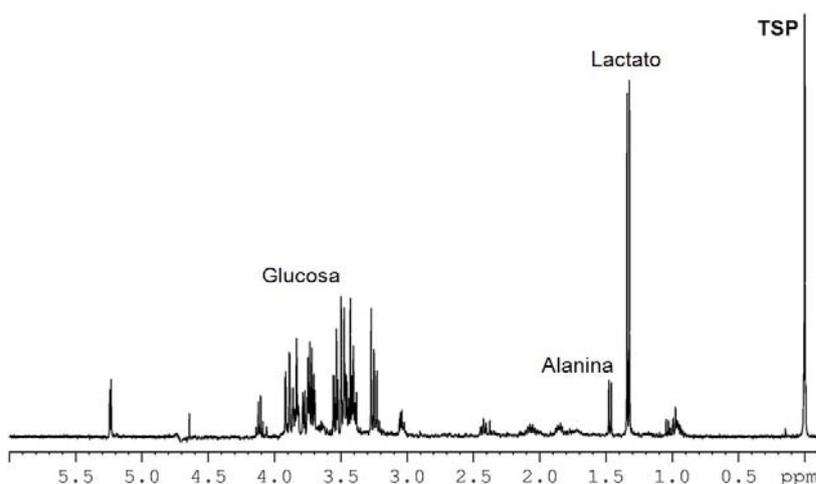


Figura 36. Espectro NOESYPR1D de ¹H-RMN representativo de dializado plasmático porcino tomado a partir de una muestra basal de sangre. **TSP** añadido como estándar interno de concentración y de desplazamiento químico.

El análisis supervisado (OPLS-DA) de los espectros fue capaz de discriminar ($Q^2=0.126$) entre las muestras plasmáticas obtenidas antes y después de la maniobra de RIC. Además, el test de probabilidad de Fisher permitió establecer que el análisis clasificaba de forma correcta un total del 78% de las muestras ($p=0.0095$, Tabla 3). Los datos del análisis discriminante indican, por tanto, la existencia de diferencias metabólicas claras entre ambos tipos de muestras plasmáticas.

| | Casos | Correctos | RIC | Control |
|------------------------|--------|-----------|-----|---------|
| RIC | 12 | 75% | 9 | 3 |
| Control | 11 | 81.82% | 2 | 9 |
| Total | 23 | 78.26 | 11 | 12 |
| Probabilidad de Fisher | 0.0095 | | | |

Tabla 3. Test de probabilidad de Fisher ($p=0.0095$) para la correcta clasificación de los casos (control o RIC).

RESULTADOS

El análisis posterior de los espectros de ^1H -RMN de los dializados plasmáticos basales y post-RIC determinó la presencia y concentración de distintos metabolitos (Tabla 4). El análisis estadístico de esta cuantificación, determinó un incremento significativo en la concentración plasmática de lactato ($p=0.02$), succinato ($p=0.035$) y glicina ($p=0.015$) en las muestras post-RIC respecto a las muestras porcinas obtenidas en situación basal (Tabla 4; Fig. 37).

| | Control | RIC |
|------------|-------------|--------------|
| Acetato | 0.031±0.002 | 0.040±0.005 |
| Alanina | 0.575±0.047 | 0.650±0.047 |
| Betaina | 0.318±0.032 | 0.337±0.036 |
| Creatina | 0.079±0.014 | 0.110±0.012 |
| Creatinina | 0.186±0.021 | 0.208±0.020 |
| Glucosa | 5.512±0.562 | 4.681±0.428 |
| Glutamato | 0.487±0.134 | 0.428±0.092 |
| Glutamina | 0.535±0.047 | 0.498±0.085 |
| Glicina | 0.055±0.009 | 0.471±0.151* |
| Isoleucina | 0.094±0.007 | 0.117±0.016 |
| Lactato | 2.671±0.294 | 3.666±0.291* |
| Leucina | 0.184±0.018 | 0.194±0.022 |
| Succinato | 0.062±0.005 | 0.082±0.008* |
| Treonina | 0.177±0.023 | 0.188±0.018 |
| Valina | 0.238±0.040 | 0.259±0.041 |

Tabla 4. Concentraciones de los metabolitos detectados mediante ^1H -RMN ($\mu\text{mol/mL}$) en el plasma obtenido de cerdos en situación basal y tras la maniobra de RIC. *($p<0.05$, test de la t de Student) indica diferencias significativas respecto al grupo control.

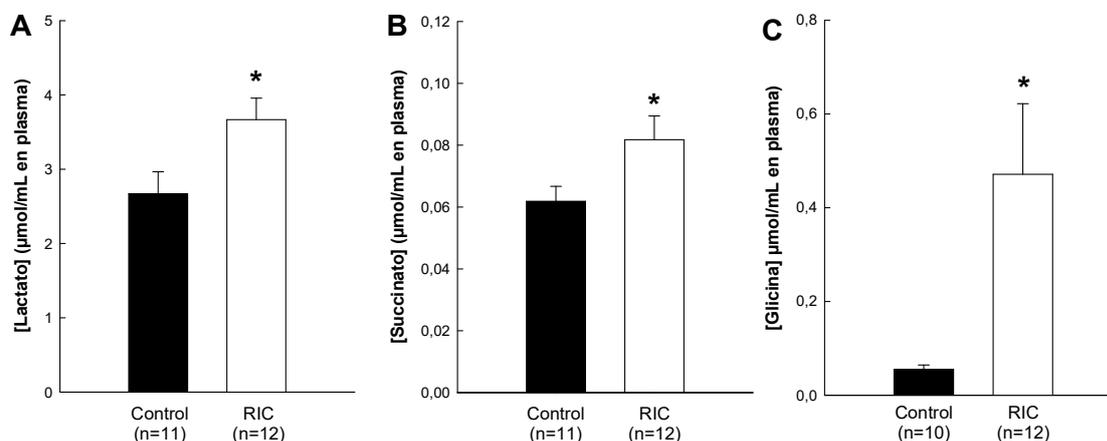


Figura 37. Concentraciones ($\mu\text{mol/mL}$) de lactato (A), succinato (B) y glicina (C) en plasma porcino obtenido en situación basal o tras la maniobra de RIC, determinadas mediante ^1H -RMN. *($p<0.05$, test de la t de Student) indica diferencias significativas respecto al grupo control.

3.2 EFECTOS DEL PLASMA POST-RIC SOBRE EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN CORAZONES AISLADOS DE RATÓN

3.2.1 Función del ventrículo izquierdo

Los corazones aislados de ratón presentaron, en situación basal, una presión desarrollada del ventrículo izquierdo entre 80 y 120 mmHg (Fig. 38) y una frecuencia cardiaca entre 300 y 400 latidos por minuto, que se mantuvieron estables durante todo el período de perfusión normóxica. Las presiones telediastólicas del ventrículo izquierdo y de perfusión oscilaron entre 0 y 10 mmHg y entre 80 y 100 mm Hg, respectivamente. La inducción de isquemia global provocó, en todos los casos, que la presión desarrollada del ventrículo izquierdo se redujera notablemente, alcanzando un mínimo a los 2-3 minutos de su comienzo. El rigor isquémico, detectado como un incremento brusco en la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (Fig. 38) tuvo lugar durante los primeros minutos de la isquemia, sin diferencias entre los grupos de corazones de ratón tratados con dializados plasmáticos basales o post-RIC, tanto cuando el tratamiento se realizó antes de la isquemia (Fig. 39), como en los tratados tras la misma. La reperfusión indujo un nuevo incremento en la presión telediastólica del ventrículo izquierdo, correspondiéndose con la hipercontractura (Fig. 38), cuyos valores tampoco mostraron diferencias significativas entre los mencionados grupos.

En cuanto a la recuperación funcional, expresada en porcentaje de la presión desarrollada basal, los corazones de ratón que habían sido tratados con los dializados plasmáticos obtenidos tras la maniobra del RIC, administrados antes de la isquemia, mostraron una tendencia a una mejor recuperación funcional hacia el final de la reperfusión que los tratados con el dializado control, aunque sin alcanzar significancia estadística (Fig. 40-A). Por el contrario, en el caso de los corazones tratados posteriormente a la isquemia, esta tendencia de mejora desapareció (Fig. 40-B).

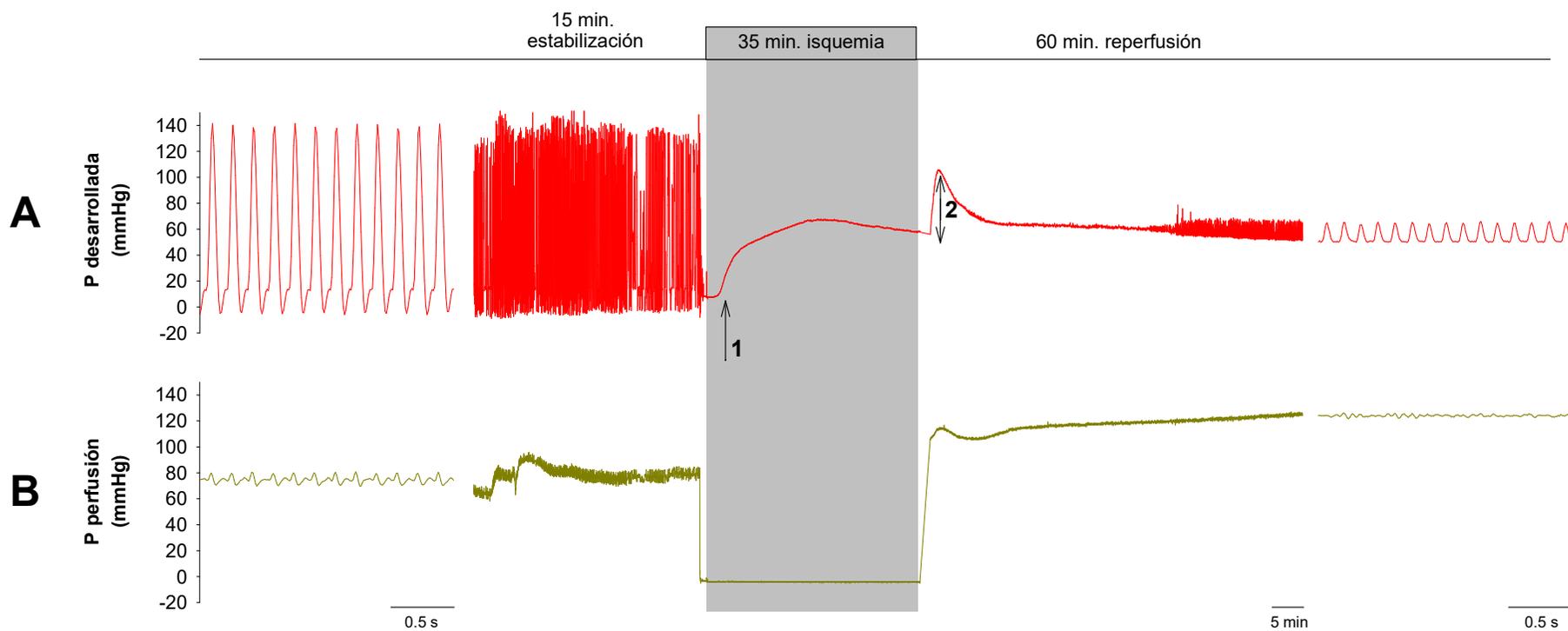


Figura 38. Registro representativo obtenido a partir de un corazón aislado de ratón en el sistema de Langendorff, sometido a 15 minutos de estabilización, 35 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperusión. Presión desarrollada (**A**), inicio del rigor isquémico (**A-1**), hipercontractura máxima (**A-2**), presión de perfusión (**B**).

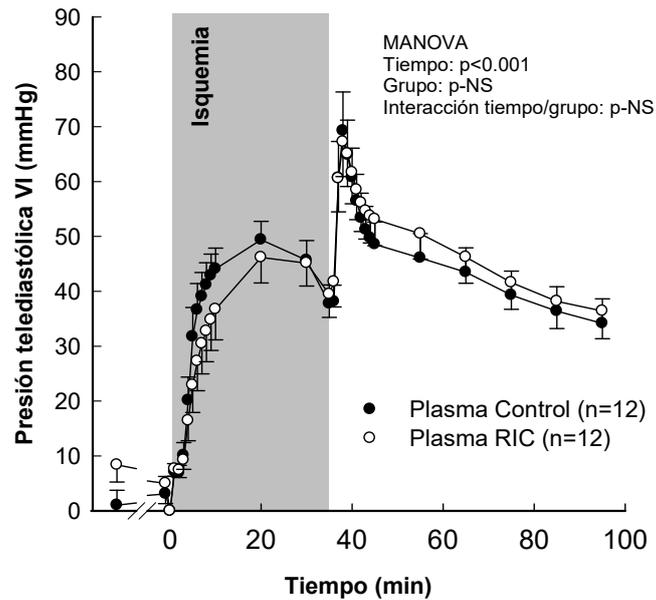


Figura 39. Cambios en la presión telediastólica del ventrículo izquierdo observados en corazones aislados de ratón, tratados, durante 30 minutos, con dializados plasmáticos porcinos obtenidos en situación basal o tras la maniobra de RIC, y posteriormente sometidos a 35 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión.

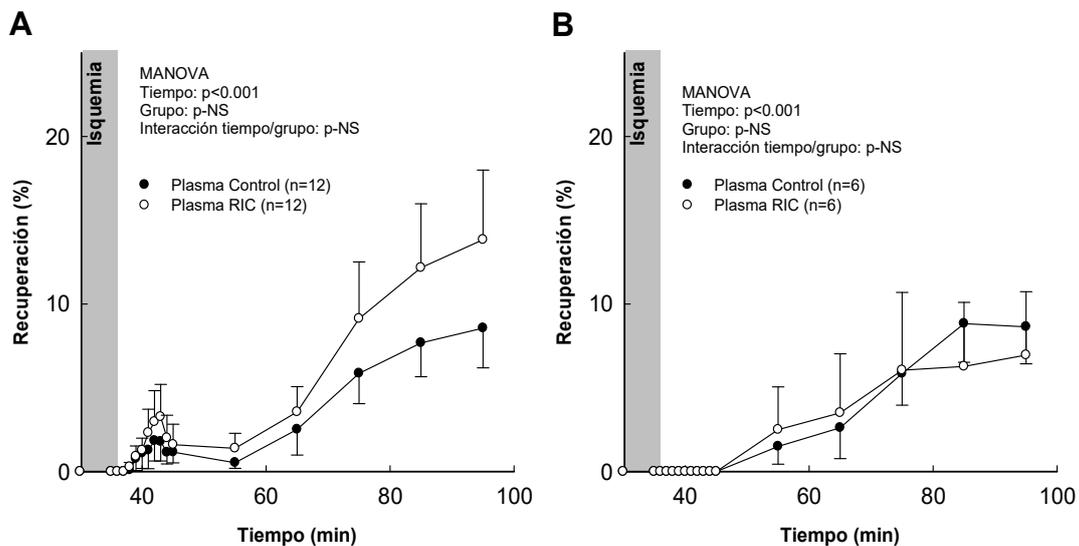


Figura 40. Recuperación funcional del ventrículo izquierdo (expresada en porcentaje de la presión desarrollada basal) en corazones aislados de ratón tratados antes (A) o después (B) de un insulto isquémico global de 35 minutos y 60 minutos de reperfusión, con dializados plasmáticos porcinos obtenidos en condiciones basales o tras la maniobra de RIC.

3.2.2 Liberación de LDH y tamaño del infarto

Durante el período de estabilización la liberación de LDH de los corazones aislados de ratón fue prácticamente despreciable, indicando la

RESULTADOS

práctica ausencia de muerte celular. Por el contrario, tras la isquemia se produjo, en los corazones tratados con dializado plasmático control, un aumento marcado en su liberación, con un pico en los primeros minutos de la reperfusión, cayendo progresivamente a lo largo de los 60 minutos (Fig. 41). El pretratamiento con el dializado post-RIC fue, sin embargo, capaz de reducir, de forma significativa, dicha liberación de enzimas, tanto cuando se analizó la curva completa, como al determinar la liberación de LDH acumulada durante los primeros 15 minutos de la reperfusión (Figs. 41 y 42-A). Desafortunadamente, este efecto beneficioso del dializado post-RIC desapareció en los grupos tratados tras la isquemia (Fig. 42-B).

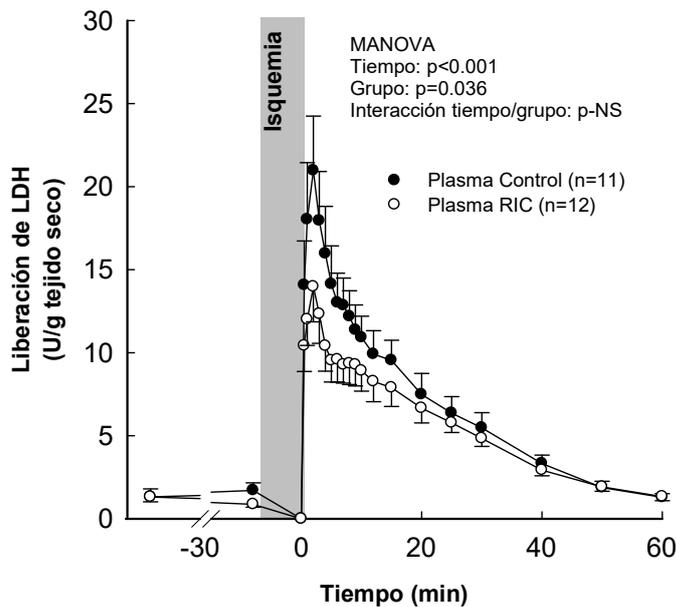


Figura 41. Liberación de LDH al efluente coronario durante la reperfusión en corazones aislados de ratón. Al inicio de la reperfusión se produce un pico de liberación que decae progresivamente con el tiempo. Los corazones fueron tratados, durante los 30 minutos anteriores a la isquemia, con dializados plasmáticos porcinos obtenidos en situación basal o tras la maniobra de RIC, y posteriormente sometidos a 35 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión. El tratamiento con plasma post-RIC redujo la liberación de LDH de forma significativa ($p=0.036$, MANOVA).

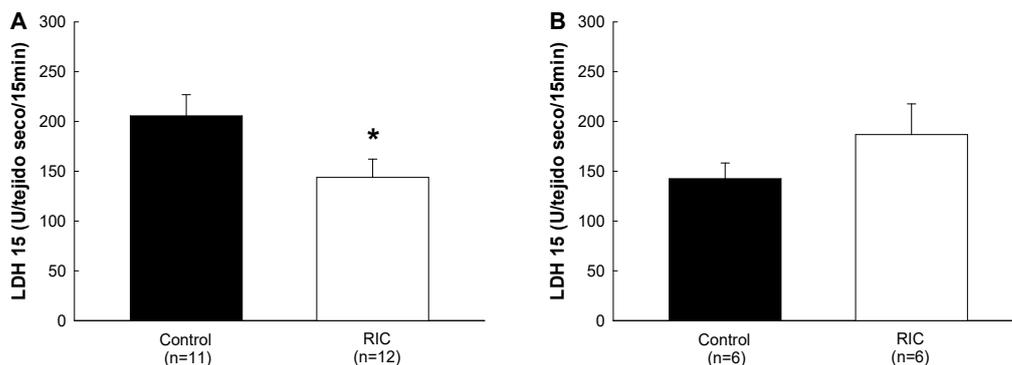


Figura 42. LDH acumulada durante los primeros 15 minutos de la reperfusión en corazones aislados de ratón sometidos a 35 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión. Los corazones fueron tratados con dializado plasmático porcino obtenido en situación basal o tras la maniobra de RIC, antes (A) o después (B) del insulto isquémico. *($p<0.05$, test de la t de Student) indica diferencias significativas respecto al grupo control.

En lo referente al tamaño del infarto, los corazones control pretratados con dializados plasmáticos porcinos obtenidos en situación basal presentaron un tamaño del infarto del $55.55 \pm 2.53\%$ del volumen ventricular, siendo significativamente inferior en el grupo pretratado con el plasma obtenido tras la maniobra de RIC (Fig. 43-A). Sin embargo, en aquellos corazones tratados tras la isquemia, no hubo diferencias en el tamaño del infarto entre ambos grupos (Fig. 43-B). En un intento de aumentar la eficacia protectora de los dializados plasmáticos post-RIC cuando se administraban tras la isquemia global del modelo de órgano aislado, a un subgrupo de 8 corazones de ratón ($n=4$ /grupo) se les suministró dializado procedente de plasma porcino recogido en situación basal o durante el primer minuto de cada uno de los cuatro ciclos de la maniobra de RIC. Desafortunadamente, esta estrategia tampoco logró reducir de forma significativa el tamaño del infarto ($54.5 \pm 9.9\%$ vs. $49.5 \pm 9.1\%$, en los corazones tratados con dializados plasmáticos obtenidos en situación basal o post-RIC, respectivamente, p -NS). Adicionalmente, se estableció un subgrupo más con 6 corazones de ratón ($n=3$ /grupo) a los que se les administró plasma tratado con un sistema de diálisis dinámica. En este caso tampoco observamos diferencias entre ambos grupos ($57.34 \pm 16.8\%$ vs. $76.39 \pm 5.4\%$, en los corazones tratados con dializados plasmáticos obtenidos en situación basal o post-RIC, respectivamente, p -NS).

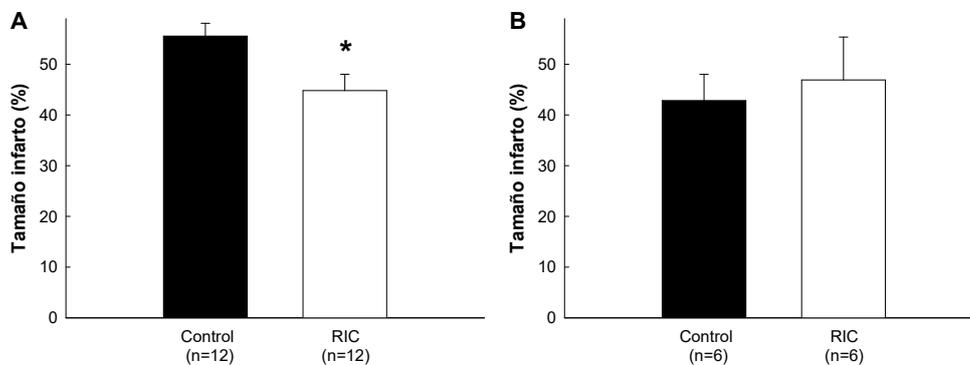


Figura 43. Tamaño del infarto en corazones aislados de ratón, sometidos a 35 minutos de isquemia global seguidos de 60 minutos de reperfusión. Los corazones fueron tratados con dializados plasmáticos porcinos obtenidos en estado basal o tras la maniobra de RIC, previamente a la isquemia (A) o posteriormente a la misma (B). *($p < 0.05$, test de la t de Student) indica diferencias significativas respecto al grupo control correspondiente.

3.3 INFLUENCIA DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE GLICINA SOBRE EL EFECTO PROTECTOR DEL PRETRATAMIENTO CON PLASMA POST-RIC EN CORAZONES AISLADOS DE RATÓN

En base a los resultados de los análisis de $^1\text{H-RMN}$, que sugerían un papel para la glicina en el efecto protector, observado en corazones aislados de ratón, del dializado plasmático obtenido tras la maniobra de RIC, decidimos

RESULTADOS

estudiar si la reducción del infarto persistía tras la inhibición de los receptores de este aminoácido y neurotransmisor. El suplemento con estricnina ($10\mu\text{M}$), un potente inhibidor de los receptores de glicina, a los dializados plasmáticos porcinos basales y post-RIC, administrados antes de la isquemia, fue capaz de abolir tanto la disminución en la liberación de LDH (Fig. 44-A), como la reducción del tamaño del infarto previamente descritas (Fig. 44-B).

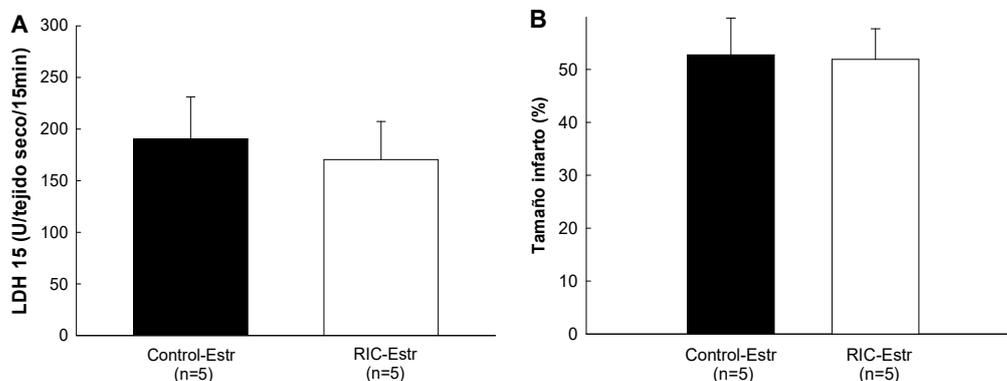


Figura 44. LDH acumulada durante los primeros 15 minutos de la reperfusión (A) y tamaño del infarto (B) en corazones aislados de ratón, sometidos a 35 minutos de isquemia global seguidos de 60 minutos de reperfusión. Los corazones fueron tratados con dializado plasmático porcino obtenido en condiciones basales o tras la maniobra de RIC, suplementados con estricnina $10\mu\text{M}$, durante los 30 minutos previos a la isquemia.

3.4 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON SUCCINATO SOBRE EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN CORAZONES AISLADOS DE RATÓN

Al igual que sucedía con la glicina, el succinato también se encontró elevado en los dializados plasmáticos porcinos obtenidos tras la maniobra de RIC. Por ello, pretratamos algunos corazones aislados de ratón, durante 30 minutos, con succinato $100\mu\text{M}$ (concentración similar a la hallada por RMN), para analizar si este metabolito era capaz de producir protección en este modelo. Sin embargo, el pretratamiento con succinato no se tradujo en diferencias en cuanto a la liberación de LDH (Fig. 45-A) o en el tamaño del infarto (Fig. 45-B), respecto al grupo control.

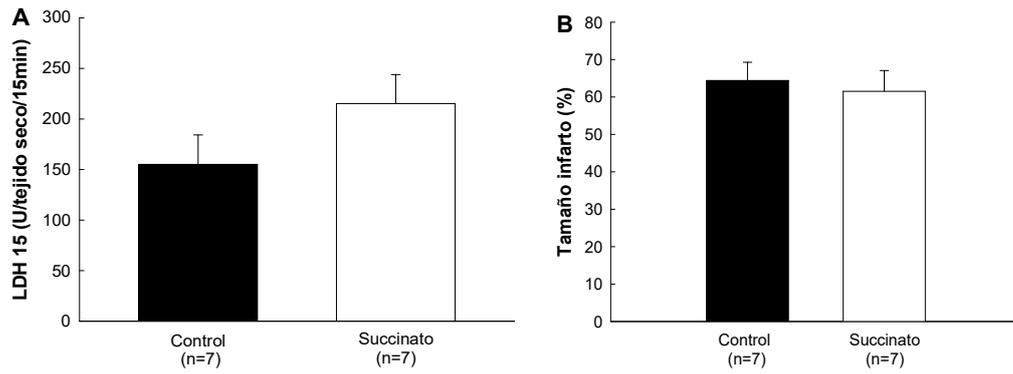


Figura 45. LDH acumulada durante los primeros 15 minutos de la reperfusión (**A**) y tamaño del infarto (**B**) en corazones aislados de ratón, sometidos a 35 minutos de isquemia global seguidos de 60 minutos de reperfusión. Los corazones fueron pretratados con Krebs normal o con Krebs conteniendo succinato 100 μ M, durante los 30 minutos anteriores al insulto isquémico.

DISCUSIÓN

1 Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de corazón porcino *in situ*

En la primera parte de este estudio se ha analizado la posible existencia de efectos cardioprotectores aditivos frente al daño por isquemia-reperfusión entre la maniobra de RIC y los tratamientos metabólicos con GIK o exenatida, en un modelo porcino de oclusión coronaria transitoria *in situ*. Los datos obtenidos han permitido demostrar que la terapia combinada (RIC con GIK o exenatida) fue más efectiva que los tratamientos individuales limitando el tamaño del infarto y disminuyendo la incidencia de arritmias. Además, estos resultados muestran como RIC, GIK y exenatida inciden de forma distinta sobre diferentes vías cardioprotectoras. Por un lado, RIC reduce de forma notable el nivel de estrés oxidativo, determinado mediante el grado de nitrotirosinación de las proteínas tisulares. Por otro lado, GIK comparte con exenatida sus efectos moduladores del metabolismo miocárdico de la glucosa, y además ejerce un efecto destacado sobre el eje Akt-eNOS (vía RISK). Estos resultados sugerirían, por tanto, que la terapia combinada propuesta podría resultar ventajosa respecto a los tratamientos individuales, previniendo el daño por perfusión en pacientes con SCAEST.

1.1 LA TERAPIA COMBINADA ES SUPERIOR A LAS INDIVIDUALES LIMITANDO EL TAMAÑO DEL INFARTO

La maniobra de condicionamiento isquémico remoto ha demostrado ser efectiva, reduciendo el tamaño del infarto de miocardio, en un amplio número de estudios, incluyendo diversos ensayos clínicos (Botker et al., 2010; Crimi et al., 2013; Prunier et al., 2014). Además, la ausencia de los efectos secundarios habitualmente asociados a los tratamientos farmacológicos, convierte al RIC en un candidato ideal para ser combinado con otras estrategias terapéuticas. Sin embargo, pocos han sido los estudios realizados hasta ahora que han analizado los efectos de las terapias combinadas sobre el tamaño del infarto, tras una oclusión coronaria transitoria. Xin y colaboradores observaron la existencia de un efecto protector aditivo entre el RIC y el postcondicionamiento isquémico local, reduciendo el tamaño del infarto en un modelo de isquemia miocárdica transitoria *in vivo* en rata (Xin et al., 2010). Igualmente, Schmidt y colaboradores identificaron un efecto cardioprotector aditivo frente al tamaño del infarto entre el tratamiento con una solución conteniendo glucosa e insulina y el preconditionamiento isquémico remoto, en corazones de cerdo neonatales, donde, sorprendentemente, ambos tratamientos no tuvieron efectos, o incluso estos fueron deletéreos, al administrarse en solitario (Schmidt et al., 2014b). Sin embargo, nuestros datos en corazón porcino maduro indican, claramente,

que la combinación de RIC con GIK o exenatida es más efectiva reduciendo el tamaño del infarto que cualquiera de dichas intervenciones por separado.

1.2 LA TERAPIA COMBINADA ES SUPERIOR A LAS INDIVIDUALES REDUCIENDO LA INCIDENCIA DE ARRITMIAS VENTRICULARES DURANTE LA REPERFUSIÓN

Ninguno de los tratamientos investigados, ni administrados individualmente, ni en combinación, ha mostrado ningún tipo de efecto proarrítmico en corazones de cerdo *in situ* sometidos a isquemia-reperfusión miocárdica. Por contra, nuestros datos muestran que la combinación de RIC con los tratamientos metabólicos (especialmente con GIK) pero no los tratamientos individuales, tiene un efecto protector frente a la aparición de arritmias ventriculares durante la reperfusión.

Pocos han sido los trabajos que han analizado los efectos del RIC sobre la arritmogénesis. Así, un estudio reciente, realizado en un modelo de isquemia-reperfusión en corazón de rata *in situ*, demostró una reducción en la incidencia de arritmias ventriculares durante la reperfusión temprana en el grupo tratado con la maniobra de RIC, aplicada en ambas extremidades posteriores (Zhu et al., 2013), aunque con menos potencia que en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico local (Ahmed et al., 2012). Un efecto protector semejante se observó durante la isquemia en el mismo modelo animal (Li et al., 2010). Por el contrario, nuestros propios datos, obtenidos en un modelo porcino, no permiten confirmar que la maniobra de RIC, por si sola, tenga tal efecto protector contra las arritmias ventriculares.

En cuanto a los tratamientos metabólicos, GIK había demostrado, en un modelo canino, ser capaz de reducir la incidencia de fibrilación ventricular durante la isquemia, pero no durante la reperfusión, en parte debido a una acción antagonizante de la actividad adrenérgica (Brooks et al., 1981). De igual forma, estudios posteriores también observaron una reducción en la incidencia de arritmias ventriculares en cerdos sometidos a paro cardioplégico y reperfusión, y tratados con GIK (Lazar et al., 1995). Sin embargo, un reciente meta-análisis de 38 ensayos clínicos no fue capaz de observar diferencias en la incidencia de fibrilación auricular o ventricular, tras la administración de GIK, en pacientes sometidos a cirugía coronaria de *bypass* o a intervenciones coronarias percutáneas (Ali-Hassan-Sayegh et al., 2015). Estos últimos datos estarían en concordancia con nuestros resultados, en los que la administración únicamente de GIK fue incapaz de modificar la incidencia de arritmias ventriculares malignas. Finalmente, y que nosotros conozcamos, un único estudio ha sugerido que el pretratamiento con exendina-4, un agonista de los receptores para GLP-1, es capaz de reducir la incidencia, gravedad y duración de las arritmias ventriculares durante la isquemia en ratas anestesiadas (Kai et al., 2013). Por el contrario, en nuestro trabajo, cuando únicamente se

administró exenatida, ésta no modificó la aparición de arritmias ni durante la isquemia, ni durante la reperfusión.

Como hemos discutido anteriormente, ninguno de los tres tratamientos individuales testados fue capaz de modificar, en nuestro modelo porcino, la incidencia de arritmias ventriculares durante un episodio de isquemia-reperfusión miocárdico. Por el contrario, fue cuando estos fueron combinados, especialmente en el caso de RIC+GIK, cuando observamos una reducción en el número de TV durante la reperfusión, en el tiempo en arritmia y en el número de TV sostenidas. Además, el análisis jerarquizado demostró que la terapia combinada fue más efectiva reduciendo la incidencia de arritmias durante la reperfusión que los grupos restantes (administración de un único tratamiento o de ninguno). Este hecho indicaría que sólo cuando los tratamientos son combinados es posible alcanzar el umbral necesario para obtener protección antiarrítmica, lo cual apoyaría la utilidad de esta combinación de tratamientos en el entorno clínico. Puesto que la protección contra el infarto no se traduce necesariamente en protección contra las arritmias ventriculares malignas, sino que incluso puede dar lugar a efectos proarrítmicos (Rodríguez-Sinovas et al., 2009; Sánchez et al., 2011), siempre debería considerarse como una prioridad, de cara a la posible traslación de cualquier estrategia terapéutica investigada, el análisis de sus efectos sobre esta importante variable clínica.

1.3 GIK Y EXENATIDA TIENEN EFECTOS SIMILARES SOBRE EL METABOLISMO DEL MIOCARDIO

Tanto la insulina como el GLP-1 desempeñan papeles clave en varios aspectos del metabolismo cardiovascular, promoviendo la captación de glucosa y su utilización mediante la glucólisis (Nikolaidis et al., 2004; Bertrand et al., 2008), y ambos se han asociado con efectos cardioprotectores (Maroko et al., 1972b; Bose et al., 2005; Zhang et al., 2006a). En el caso de la insulina, estos efectos beneficiosos se han relacionado con un incremento en los niveles de ATP miocárdico, así como del contenido de creatina fosfato y glucógeno (Bertrand et al., 2008). Por otro lado, la protección inducida por GLP-1 ha resultado ser sensible a yodoacetato, lo que sugiere estimulación de la glucólisis, y se ha asociado con la activación de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa-2 (Huisamen et al., 2008). Los datos obtenidos mediante RMN en nuestro estudio confirman que tanto GIK como exenatida actúan sobre el metabolismo cardiaco, y que comparten una huella metabólica común, distinta a aquella que presentan las muestras obtenidas de cerdos control y de los tratados con RIC.

1.4 GIK SEÑALIZA A TRAVÉS DE AKT Y STAT3

La unión de la insulina a sus receptores induce la activación de la actividad tirosina quinasa de las subunidades β , lo que lleva a la

autotransfosforilación del receptor y a la fosforilación de determinadas dianas posteriores, incluyendo las vías PI3K-Akt y MAPK (Bertrand et al., 2008). PI3K y Akt son los componentes principales de la cascada prosupervivencia RISK, que incluye proteínas quinasas como Akt, ERK1/2 o GSK3 β , con efectores finales a nivel mitocondrial (Bertrand et al., 2008). La activación de Akt también puede conducir a un incremento en el acoplamiento y activación de eNOS, con la consiguiente activación de la vía del GMPc/PKG (Abdallah et al., 2006; Bertrand et al., 2008), que a su vez puede actuar sobre el retículo sarcoplasmático, reduciendo la hipercontractura (Abdallah et al., 2006). Así pues, nuestra presente investigación está en concordancia con estas posibilidades, ya que los estudios de *western blot* han mostrado un incremento en la activación tanto de Akt como de eNOS en aquellos grupos tratados con GIK, tanto en el área en riesgo como en el miocardio control. Asimismo, no se puede descartar la intervención de la vía SAFE, ya que la activación de STAT3 también se halló incrementada en el área en riesgo tras el tratamiento con GIK. Por otro lado, se ha sugerido que la unión de GLP-1 a sus receptores activaría vías de supervivencia, incluyendo quinasas como PI3K y p22/44 MAPK (Bose et al., 2005), o PI3K y AMPK (Huisamen et al., 2008). Sin embargo, los datos extraídos a partir de nuestros *western blot* parecen descartar un papel relevante de estas vías en los efectos cardioprotectores de la exenatida en nuestro modelo, ya que sólo se observó un ligero aumento en la fosforilación de eNOS en el área en riesgo de los grupos tratados con exenatida.

Como hemos mencionado, el análisis de los datos de los *western blot* indicó que las vías de señalización activadas por ambos tratamientos metabólicos son diferentes, al menos en parte, ya que la exenatida no incrementó la fosforilación de Akt. A pesar de todo, estas diferencias en la señalización celular no son contradictorias con efectos metabólicos similares, ya que se ha descrito que la exenatida es capaz de estimular la captación de glucosa y el metabolismo por mecanismos independientes de Akt (Seufert and Gallwitz, 2014). Por otro lado, el aumento del grado de fosforilación de eNOS, sin fosforilación previa de Akt, en el área en riesgo de los grupos tratados con exenatida, no es tarea fácil de explicar. Una posibilidad es que eNOS pueda ser activado también independientemente de Akt, como se ha sugerido en cardiomiocitos hipertrofiados, donde su activación implicaba a AMPK y a SIRT1 (Hernandez et al., 2014). Otra posibilidad es que ocurra una disociación temporal entre la activación de Akt y la fosforilación de eNOS, en el caso de la exenatida. Nuestras muestras fueron tomadas a los 5 minutos de reperfusión, pero no se puede descartar la activación transitoria de Akt antes de ese tiempo.

Por otra parte, y dado que las intervenciones dirigidas a incrementar la captación de glucosa pueden tener un efecto sobre la función mitocondrial (Parra et al., 2014), y puesto que la inhibición de la respiración mitocondrial

puede limitar el daño por reperfusión en el miocardio (Chouchani et al., 2013), en nuestro estudio decidimos examinar la tasa de respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas obtenidas a partir de miocardio control y en riesgo de los distintos grupos experimentales. Nuestros datos muestran que la infusión de GIK, pero no la de exenatida, tuvo un efecto inhibitor sobre la respiración mitocondrial, a pesar de que ambos tratamientos compartían huellas metabólicas similares. Los efectos de la administración de GIK se manifestaron específicamente en la actividad respiratoria mediada por el complejo I y a nivel de la región miocárdica control.

Uno de los mecanismos potenciales que podría explicar la depresión del consumo de oxígeno mitocondrial en los grupos tratados con GIK es la nitrosación postraducciona de las proteínas respiratorias (Chouchani et al., 2013). La S-nitrosación tiene lugar en un residuo de cisteína clave dentro de la subunidad ND3 del complejo I, o a través de una reacción directa del complejo IV con NO (Sarti et al., 2012). En concordancia con esta hipótesis, nuestros resultados muestran un claro incremento en el estado fosforilado de eNOS secundariamente al tratamiento con GIK, tanto en el área en riesgo como en la región control. El complejo I es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno en la reperfusión, y su inhibición transitoria reduce el daño por reperfusión (Chouchani et al., 2013). En particular, se ha observado que la S-nitrosación del complejo I mitocondrial aminora el daño oxidativo y la necrosis *in vivo*, al enlentecer la reactivación de la respiración mitocondrial durante los primeros minutos de la reperfusión (Chouchani et al., 2013).

1.5 RIC, PERO NO GIK NI EXENATIDA, REDUCE NOTABLEMENTE EL NIVEL DE NITROTIROSINACIÓN PROTEICA EN EL TEJIDO MIOCÁRDICO

Estudios previos han demostrado que el superóxido generado durante los primeros minutos de la reperfusión se combina con NO a gran velocidad, generando peroxinitrito (ONOO⁻) (Wang and Zweier, 1996). El peroxinitrito puede reaccionar con diferentes dianas biológicas de la célula y, además, reducir la disponibilidad del NO libre y la actividad de la enzima NOS, al actuar sobre su grupo hemo y al oxidar su cofactor tetrahidrobiopterina (Chen et al., 2010). La inhibición de la síntesis de peroxinitrito, y el uso de sequestradores del mismo o de catalizadores de su descomposición, se han asociado con una reducción del daño por reperfusión en diferentes modelos experimentales (Yang et al., 2012). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la atenuación del estrés oxidativo durante la reperfusión, con la subsiguiente preservación de la vía GMPc/PKG, representa un mecanismo cardioprotector primario del postcondicionamiento isquémico (Inserte et al., 2013). En este trabajo se demuestra que RIC, pero no GIK ni exenatida, reduce marcadamente el estrés nitro-oxidativo. Estos resultados son consistentes con

DISCUSIÓN

el incremento del acoplamiento de eNOS observado en el grupo que recibió RIC, indicativo de una atenuación en la oxidación de eNOS y tetrahidrobiopterina.

Por otra parte, estudios previos han asociado la protección por RIC con la activación de la vía RISK. Así, Hausenloy y colaboradores demostraron un incremento en la fosforilación de Akt, 5 minutos después de la reperfusión, en el grupo de cerdos sometidos a 60 minutos de isquemia tratados con RIC, siendo la protección inducida por esta maniobra abolida por wortmanina, un inhibidor de PI3K (Hausenloy et al., 2012). Sin embargo, en el presente estudio no fuimos capaces de detectar ningún tipo de activación de la vía RISK (ni de la vía SAFE) en las muestras de los animales tratados con RIC. En cualquier caso, sí fuimos capaces de detectar diferencias importantes en los mecanismos de acción de los distintos tratamientos, que pueden explicar la aparición de efectos protectores aditivos. Tomado todo ello en consideración, el análisis de nuestros resultados sugiere que los mecanismos responsables de la cardioprotección inducida por los tratamientos investigados son los que aparecen en la figura 46.

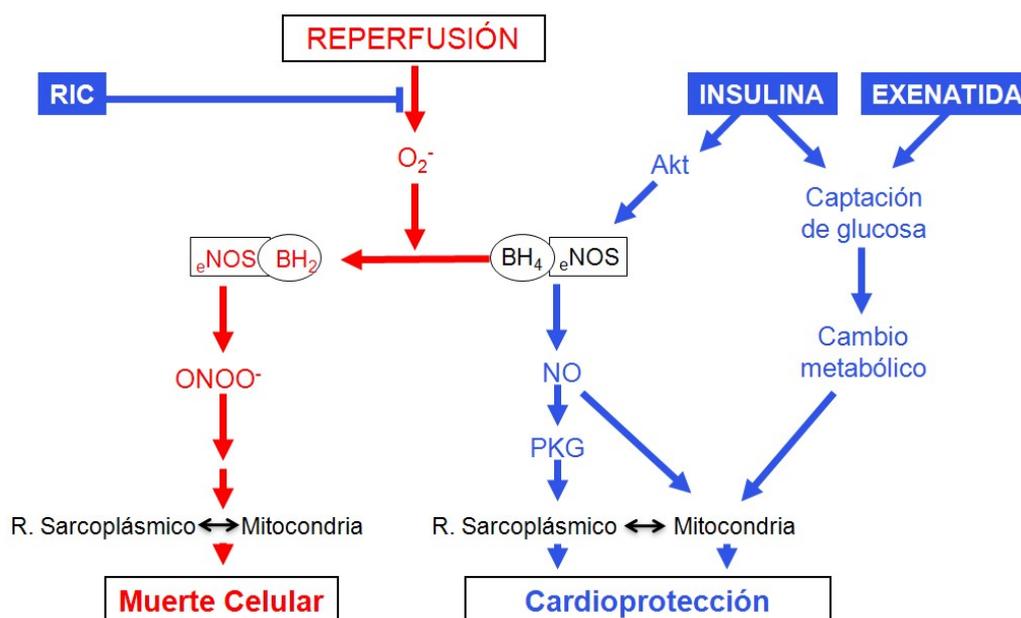


Figura 46. Efectos de RIC, GIK y exenatida sobre diferentes vías de cardioprotección. RIC reduce de forma notable el nivel de estrés oxidativo, determinado mediante el grado de nitrotirosinación de las proteínas tisulares. Por otro lado, GIK comparte con exenatida sus efectos moduladores del metabolismo miocárdico de la glucosa, y además ejerce un efecto destacado sobre el eje Akt-eNOS (vía RISK). BH₄, tetrahidrobiopterina. eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial. NO, óxido nítrico. ONOO⁻, peroxinitrito. PKG, proteína quinasa G. RIC, condicionamiento isquémico remoto. Tomado de (Albuquerque-Béjar et al., 2015).

1.6 FOSFORILACIÓN DE LA Cx43 MIOCÁRDICA

La Cx43 miocárdica desarrolla un papel clave en la propagación del impulso cardíaco y en la arritmogénesis. Así, la deficiencia de esta proteína en diferentes modelos de ratón transgénicos, bien sea mediante una reducción en el número total de canales que forman las *gap junctions*, bien mediante una reducción en su conductancia, se ha asociado con una alta incidencia de arritmias ventriculares durante la isquemia-reperusión (Sánchez et al., 2011). La regulación de la conexina no es del todo conocida pero se sabe que depende, entre otros factores, de su estado de fosforilación (Solan and Lampe, 2009). Además, se ha demostrado que la Cx43 es desfosforilada durante la isquemia miocárdica, un efecto que se ha correlacionado con la aparición del desacoplamiento eléctrico (Beardslee et al., 2000), uno de los mecanismos propuestos como responsables de la fase Ib de arritmias de la isquemia (Harris and Rojas, 1943; Rodríguez-Sinovas and Cinca, 1999). Hipotéticamente, por tanto, una mejor preservación de la fosforilación de la Cx43, que incrementaría el acoplamiento eléctrico, podría explicar la menor incidencia de arritmias en los grupos que recibieron tratamiento combinado. Sin embargo, el análisis de nuestros *western blot* indica que la Cx43 no mostró ningún tipo de atenuación en su desfosforilación tras la isquemia, en ninguno de los grupos de tratamiento, excluyéndose, por tanto, que una mejora en la comunicación intercelular mediada por Cx43 pueda jugar un papel en la protección contra las arritmias ventriculares observada en nuestro estudio. Sin embargo, los análisis de los niveles de Cx43 y su estado de activación se realizaron en muestras obtenidas a los 5 minutos de la reperusión, lo cual no permite descartar que, a tiempos de reperusión más largos, el nivel de fosforilación de la Cx43 se recupere antes en los grupos con menos arritmias. De hecho, así se ha visto en un reciente estudio *in vivo* realizado en corazón de rata, dónde el RIC logró conservar la fosforilación de Cx43 a las 2 horas de la reperusión (Brandenburger et al., 2014). En cualquier caso, muchas de las arritmias ventriculares aparecieron, en nuestro estudio, mucho antes de ese plazo.

1.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En muchas situaciones que se dan en el contexto clínico, la aplicación de tratamientos al inicio de la reperusión es más factible que su aplicación antes de la reperusión, en particular en pacientes con SCAEST. Sin embargo, varios estudios previos han demostrado que es posible la aplicación de estrategias cardioprotectoras durante el transporte del paciente en la ambulancia, o durante procedimientos previos a la revascularización de la arteria coronaria. De hecho, en este trabajo, hemos utilizado protocolos idénticos a los de aquellos ensayos clínicos piloto que mostraron protección. En el estudio de Botker y colaboradores, la maniobra de RIC se aplicó pronto tras el inicio de los síntomas, durante el periodo del transporte hacia el hospital en la ambulancia, y antes de la reperusión (Botker et al., 2010). De una forma

similar, y para asegurar la administración del fármaco lo más tempranamente posible, en el ensayo IMMEDIATE, la solución de GIK se suministró durante el transporte hacia el hospital, mucho antes de la reperfusión (Selker et al., 2012), mientras que la exenatida se dio 15 minutos antes de la reperfusión (Lonborg et al., 2012b). Así, las intervenciones y combinaciones que nosotros hemos testado son claramente viables en pacientes con SCAEST. En este sentido, y aunque no podemos descartar que parte de los efectos observados se deban a acciones de los tratamientos durante el periodo de isquemia, parece poco probable que una cantidad significativa de los fármacos administrados pueda alcanzar el tejido isquémico en nuestro protocolo experimental.

Por otra parte, en este trabajo no podemos excluir que los efectos aditivos de las intervenciones detectados pudieran ser atenuados al incrementar las dosis de las intervenciones individuales. Sin embargo, el aumento del número de ciclos de RIC más allá de 4, no se ha asociado previamente con un incremento significativo en el miocardio salvado en ratas sometidas a oclusión coronaria transitoria (Xin et al., 2010). Del mismo modo, las dosis y protocolos de la administración de GIK y exenatida fueron aquellas halladas seguras y efectivas en estudios con pacientes (Selker et al., 2012; Lonborg et al., 2012b).

Finalmente, nuestro protocolo experimental realizado en el modelo porcino, implicó el uso de propofol como anestésico, un fármaco que se ha descrito que interfiere con la cardioprotección ejercida por RIC, en pacientes sometidos a cirugía de *bypass* coronario (Kottenberg et al., 2014). A pesar de ello, en este trabajo hemos sido capaces de observar un efecto protector de la terapia combinada, tanto reduciendo el tamaño del infarto como las incidencias de taquiarritmias ventriculares malignas. Por este motivo, podríamos esperar un mayor efecto cardioprotector de RIC en ausencia de propofol. Los efectos del RIC observados en este estudio están, en cualquier caso, en línea con los encontrados en ensayos clínicos (Botker et al., 2010).

2 Mecanismos humorales del condicionamiento isquémico remoto

La segunda fase del presente trabajo tuvo por objeto la investigación de los mecanismos humorales desencadenados por la maniobra de RIC. Para ello, sometimos a nuestro modelo porcino al protocolo de RIC (cuatro ciclos de 5 minutos de oclusión de una arteria femoral seguidos de reperfusión), adquiriendo muestras sanguíneas en situación basal y tras la maniobra. A partir de las mismas se obtuvieron dializados plasmáticos que se administraron en un modelo de corazón aislado de ratón, que fue, a su vez, sometido a isquemia global seguida de reperfusión. Así, observamos que los dializados post-RIC consiguieron reducir el tamaño del infarto respecto a los corazones control, tratados con dializados basales, cuando se administraron previamente a la isquemia global, pero no cuando se administraron al inicio de la reperfusión. En un intento de averiguar cuál era el mecanismo de la protección observada, analizamos las muestras plasmáticas mediante espectroscopía de ^1H -RMN. Así, el análisis discriminante de los espectros obtenidos permitió demostrar que las muestras basales y post-RIC podían diferenciarse entre sí, siendo los principales metabolitos responsables de dichas diferencias el lactato, la glicina y el succinato.

Para investigar la importancia cardioprotectora de los metabolitos que aparecieron elevados en las muestras de plasma post-RIC, llevamos a cabo dos nuevas pruebas experimentales sobre corazones aislados de ratón en el modelo de Langendorff. Algunos corazones fueron pretratados, antes de la isquemia, con los dializados plasmáticos conteniendo, además, estricnina, un antagonista del receptor de glicina. La estricnina fue capaz de abolir el efecto cardioprotector de los dializados post-RIC sobre el tamaño del infarto, lo cual sugeriría, por tanto, que la glicina estaría involucrada, al menos en parte, en la cardioprotección por RIC. Por el contrario, la administración de succinato, añadido a la solución de Krebs, durante los 30 minutos previos a la isquemia global, no imitó el efecto protector del plasma post-RIC, indicando que este metabolito no participa en los efectos observados.

2.1 LOS DIALIZADOS PLASMÁTICOS PORCINOS POST-RIC SON METABÓLICAMENTE DISTINTOS A LOS BASALES

A pesar de que todavía se desconocen los mecanismos por los que el RIC es capaz de proteger al corazón frente al daño por isquemia-reperfusión, sí se conoce la implicación, al menos en parte, de una vía humoral (Heusch et al., 2015). Estudios previos han demostrado que la cardioprotección podría deberse a moléculas circulantes, termosensibles y de peso molecular menor de

15 kDa, que mantendrían su efecto protector incluso entre especies diferentes. Así, el tratamiento con plasma dializado obtenido en una especie es capaz de proteger en otra distinta (Shimizu et al., 2009; Merlocco et al., 2014).

La RMN es una técnica capaz de contribuir al análisis de los cambios metabólicos miocárdicos asociados a la protección contra el daño por isquemia-reperfusión (Valls-Lacalle et al., 2016). En nuestro trabajo hemos utilizado esta técnica para tratar de esclarecer qué factores humorales podrían estar desempeñando un papel protector. Así, tras dializar las muestras de plasma obtenidas, las analizamos mediante espectroscopía de ^1H -RMN. Además de observar que, efectivamente, las muestras plasmáticas basales y post-RIC son metabólicamente distintas, pudimos averiguar que estas diferencias eran debidas a un incremento, en las muestras post-RIC, en las concentraciones de lactato, glicina y succinato.

2.2 EL DIALIZADO PLASMÁTICO PORCINO OBTENIDO TRAS LA MANIOBRA DE RIC REDUCE EL TAMAÑO DEL INFARTO EN CORAZONES AISLADOS DE RATÓN CUANDO SE ADMINISTRA PREVIAMENTE A LA ISQUEMIA, PERO NO AL INICIO DE LA REPERFUSIÓN

Estudios experimentales previos han demostrado que ciertos factores presentes en la circulación, cuya liberación es producida por la maniobra de RIC, son capaces de ejercer cardioprotección sobre otros corazones sometidos a isquemia-reperfusión, de la misma o de diferentes especies (Dickson et al., 1999; Shimizu et al., 2009). Así, Merlocco y colaboradores describieron que la administración de dializado plasmático procedente de conejos y de humanos voluntarios sanos, sometidos al estímulo de RIC, resultó en una reducción del tamaño del infarto en corazones aislados de ratón, cuando estos dializados se administraban durante los 30 minutos previos a la isquemia (Merlocco et al., 2014). Nuestros datos actuales confirman, por tanto, los obtenidos en estos trabajos previos, ya que el pretratamiento (30 minutos) con dializado plasmático proveniente de cerdos sometidos a la maniobra de RIC fue capaz de reducir el tamaño del infarto y la liberación de LDH en corazones aislados de ratón, perfundidos en un sistema de Langendorff.

Hasta el momento, todos los estudios realizados sobre la capacidad de transferir la protección por RIC entre órganos y especies distintas se habían realizado administrando los dializados plasmáticos previamente a la isquemia del órgano receptor (Dickson et al., 1999; Shimizu et al., 2009; Merlocco et al., 2014). Ahora bien, desde el punto de vista clínico, en pacientes con infarto agudo de miocardio sería más interesante aplicar cualquier tratamiento en el momento de la reperfusión. Sin embargo, hasta ahora no se había investigado la eficacia de la administración de los dializados plasmáticos post-RIC en el momento de la restauración del flujo. En el presente trabajo hemos demostrado que la administración de dializados plasmáticos post-RIC durante los primeros

minutos de la reperfusión no es capaz de ejercer ningún efecto beneficioso sobre el daño por isquemia-reperfusión, cuando los resultados se comparan con los obtenidos en el grupo control, tratado con dializado plasmático basal. Estos datos podrían sugerir que, en el caso de la administración durante la reperfusión, o bien la concentración necesaria para alcanzar un efecto protector habría de ser más alta (hay que recordar que al dializar el plasma en un volumen 10 veces mayor, los metabolitos quedan diluidos respecto a su concentración en la sangre), o bien que el mecanismo protector observado en estudios previos (Andreka et al., 2007; Schmidt et al., 2007) no sería de tipo humoral. De hecho, en un reciente estudio realizado en un modelo de rata *in vivo*, Mastitskaya y colaboradores proponen que la inervación vagal del corazón desempeñaría un papel crítico en la cardioprotección mediada por RIC, y que la producción y liberación de un factor protector circulante estaría bajo control del sistema parasimpático (Mastitskaya et al., 2016). Aún más, ambos mecanismos, humoral y nervioso, podrían estar, en realidad, interconectados. Así, Jensen y colaboradores demostraron que el efecto protector frente al daño por isquemia-reperfusión del dializado plasmático post-RIC obtenido de voluntarios sanos, y observado en corazones aislados de conejo, cuando se administraba antes de la isquemia, desaparecía si los pacientes presentaban neuropatía periférica (Jensen et al., 2012).

2.3 MECANISMOS HUMORALES IMPLICADOS EN LA CARDIOPROTECCIÓN POR PRETRATAMIENTO CON DIALIZADOS PLASMÁTICOS POST-RIC

Como hemos mencionado anteriormente, el análisis de los dializados plasmáticos mediante ^1H -RMN desveló una elevación significativa en los niveles de ciertos metabolitos, como la glicina o el succinato, en aquellas muestras plasmáticas porcinas tomadas con posterioridad a la maniobra de RIC. Estudios previos han demostrado que el aminoácido glicina puede ejercer un efecto protector frente al daño por isquemia-reperfusión, en diferentes tipos celulares, desarrollados en diversos modelos animales. Así, un estudio de Sommer y colaboradores demostró que la infusión de glicina, previa a un protocolo de isquemia-reperfusión, producía una mejora en la viabilidad mitocondrial en pulmón de rata (Sommer et al., 2012). Así mismo, el pretratamiento con glicina aumenta el flujo sanguíneo portal y la producción de bilis, y mantiene la actividad citocromo oxidasa en un modelo de isquemia lobular hepática realizado en conejos (Sheth et al., 2011). Los efectos beneficiosos parecen persistir incluso cuando la glicina se administra a dosis bajas, que resultan sólo en una concentración plasmática ligeramente por encima de lo normal, como se ha observado en un modelo de isquemia-reperfusión intestinal en rata (Petrat et al., 2011). En cuanto al tejido miocárdico, la glicina también logró reducir la muerte celular en cardiomiocitos HL-1 y en corazones aislados de rata sometidos a hipoxia y reoxigenación

(Ruiz-Meana et al., 2004), al ser administrada durante esta última fase. Por todo ello, tratamos de investigar si la glicina podía estar involucrada en los efectos protectores de los dializados post-RIC cuando se administraban antes de la isquemia a corazones aislados de ratón. Así, el bloqueo de sus receptores con estricnina abolió el efecto protector observado, no detectándose diferencias ni en el tamaño del infarto ni en la liberación de LDH entre los corazones control y los tratados. Estos datos sugieren, por tanto, que la cardioprotección observada tras el pretratamiento con dializados plasmáticos post-RIC puede ser debida, en parte, a la activación de los receptores de glicina.

Por otra parte, los niveles de succinato tras los ciclos de RIC también se encontraron aumentados en el plasma sanguíneo porcino. Con el fin de encontrar una relación entre este aumento en su concentración y la cardioprotección ejercida por los dializados plasmáticos, realizamos un experimento adicional en corazones aislados de ratón. Durante los 30 minutos previos a la isquemia-reperfusión global, a un grupo de corazones (control) les administramos la solución de Krebs habitual, mientras que en el grupo de tratamiento el Krebs fue suplementado con una concentración de succinato igual a la hallada en los estudios de ^1H -RMN en el plasma post-RIC. Desafortunadamente no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos, con lo que la cardioprotección, al menos a este nivel, no pareció implicar la presencia de succinato. Estudios previos han descrito que el succinato es un marcador universal de isquemia (al igual que ocurriría con el lactato), y que sus concentraciones aumentan de forma marcada en todos los tejidos sometidos a esta condición (Chouchani et al., 2014; Valls-Lacalle et al., 2016). Los resultados de este trabajo apoyarían que el succinato es, simplemente, una consecuencia de la propia isquemia tisular (Chouchani et al., 2014), que se ve reflejada a nivel plasmático.

2.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Gracias a la técnica de RMN, hemos sido capaces de cuantificar un número limitado de metabolitos. Sin embargo, la capacidad de distinguir un número mayor de moléculas viene delimitada por el campo magnético del imán utilizado (en nuestro caso 9.4 T) y por la propia naturaleza de esta técnica, donde todo metabolito que se encuentre por debajo de una concentración de 0.1 mM en la muestra no será detectado. De hecho, la espectroscopía de masas es, por ejemplo, una técnica mucho más sensible que la RMN (hasta un rango de picomolar), lo cual hace de ella una herramienta muy útil para la detección de metabolitos individuales que podrían actuar como biomarcadores (Crutchfield et al., 2016). Así mismo, la RMN no permite detectar moléculas como los nitritos, descritos como posibles candidatos a mediar la respuesta humoral de RIC (Rassaf et al., 2014), debido a que su estructura molecular

carece de protones susceptibles de ser identificados de esta forma. La ventaja que aporta la RMN es su alta reproducibilidad y especificidad, y menor dependencia de la manipulación. Por otra parte, al haber utilizado membranas de dializado que permiten el paso de moléculas por debajo de los 12-14 KDa, todas aquellas de mayor tamaño no habremos sido capaces de observarlas, como es el caso de las vesículas extracelulares (exosomas), que podrían contener señales cardioprotectoras de distinta naturaleza (péptidos, microRNA, etc.) (Giricz et al., 2014).

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Efectos del tratamiento con RIC, GIK y exenatida, solos o en combinación, sobre el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de corazón porcino *in situ*

1.1 El tratamiento con RIC, GIK o exenatida, o sus combinaciones (RIC+GIK o RIC+Exenatida), es capaz de disminuir el tamaño del infarto en un modelo porcino *in situ* de oclusión transitoria de la arteria coronaria DA.

1.2 La combinación de RIC y tratamiento metabólico es más eficaz limitando el tamaño del infarto y la incidencia de arritmias que los tratamientos individuales por separado.

1.3 RIC, GIK o exenatida no provocan efectos proarritmogénicos en un modelo porcino *in situ* de oclusión transitoria de la arteria coronaria DA.

2. Mecanismos implicados en la protección por RIC, GIK o exenatida, y por la terapia combinada, sobre el daño por isquemia-reperfusión

2.1 La protección por exenatida no está relacionada con una mayor liberación de la insulina.

2.2 El perfil metabólico de los extractos de miocardio obtenidos de los grupos control y RIC es diferente al de los extractos de los grupos GIK y exenatida. Los tratamientos combinados comparten una huella metabólica similar a la de los grupos GIK y exenatida.

2.3 El área en riesgo presenta una menor activación de Akt, STAT3 y eNOS, y un incremento en la fosforilación de ERK1/2, GSK3 β y p38 MAPK, con respecto al miocardio control.

2.4 El tratamiento con GIK, sólo o en combinación, incrementa el grado de activación de la proteína quinasa Akt y de eNOS, tanto en el área en riesgo como en la región control. Así mismo, GIK induce una mayor activación de STAT3 en el área en riesgo.

2.5 El tratamiento con GIK produce, en la zona control del miocardio, una reducción significativa en el consumo de oxígeno estimulado por ADP.

2.6 El tratamiento con RIC disminuye el estado de nitrotirosinación de las proteínas, lo cual indica una reducción en el estrés nitro-oxidativo.

2.7 Ninguno de los tratamientos testados consigue mejorar el estado de fosforilación de Cx43 en el área en riesgo.

3. Estudio de los mecanismos humorales implicados en la protección por condicionamiento isquémico remoto

3.1 El dializado plasmático procedente de muestras sanguíneas porcinas tomadas en estado basal es metabólicamente distinto al dializado obtenido tras aplicar un protocolo de RIC.

3.2 La cardioprotección por RIC es humoralmente transferible a un modelo de isquemia-reperfusión en corazón aislado de ratón, siempre y cuando se administre con anterioridad al insulto isquémico prolongado, pero no si se administra durante la perfusión.

3.3 La protección inducida por el pretratamiento con dializado plasmático porcino, obtenido tras la maniobra de RIC, en corazones aislados de ratón es dependiente, al menos en parte, de la activación de receptores de glicina.

3.4 El succinato no participa en la protección por RIC en corazones aislados de ratón.

CONCLUSIONES

La terapia que combina RIC con tratamientos que actúan sobre el metabolismo cardiaco de la glucosa (GIK y exenatida) otorga protección aditiva frente al daño por reperfusión (tanto sobre el infarto como sobre las arritmias de la reperfusión), en un modelo porcino *in situ* de oclusión transitoria de la arteria coronaria descendente anterior. Estos efectos aditivos se deben, probablemente, a que RIC, GIK y exenatida inciden sobre diferentes vías cardioprotectoras: RIC, reduciendo el estrés nitro-oxidativo; GIK, aumentando la activación de Akt y eNOS, y tanto GIK como exenatida, provocando un cambio metabólico. Por otro lado, la maniobra de RIC libera un factor humoral capaz de ser transferido y de ejercer cardioprotección, cuando se administra antes de la isquemia, pero no durante la reperfusión, en un modelo de isquemia-reperfusión en corazón aislado de ratón. La glicina es, al menos en parte, responsable de esta cardioprotección ejercida por el RIC.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, Y., Gkatzoflia, A., Gligorievski, D., Kasseckert, S., Euler, G., Schluter, K.D. et al. (2006) Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* **70**: 346-353.
- Abdallah, Y., Kasseckert, S.A., Iraqi, W., Said, M., Shahzad, T., Erdogan, A. et al. (2011) Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J Cell Mol Med* **15**: 2478-2485.
- Ahmad, K. (2014) Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *J Tradit. Chin Med* **34**: 234-237.
- Ahmed, L.A., Salem, H.A., Attia, A.S., and Agha, A.M. (2012) Comparative study of the cardioprotective effects of local and remote preconditioning in ischemia/reperfusion injury. *Life Sci* **90**: 249-256.
- Aimo, A., Borrelli, C., Giannoni, A., Pastormerlo, L.E., Barison, A., Mirizzi, G. et al. (2015) Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences. *World J Cardiol* **7**: 621-632.
- Akita, T., Abe, T., Kato, S., Kodama, I., and Toyama, J. (1993) Protective effects of diltiazem and ryanodine against ischemia-reperfusion injury in neonatal rabbit hearts. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **106**: 55-66.
- Albuquerque-Béjar, J.J., Barba, I., Inserte, J., Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Poncelas, M. et al. (2015) Combination therapy with remote ischaemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs. *Cardiovasc Res* **107**: 246-254.
- Ali-Hassan-Sayegh, S., Mirhosseini, S.J., Zeriuoh, M., Dehghan, A.M., Shahidzadeh, A., Karimi-Bondarabadi, A.A. et al. (2015) Safety and efficacy of glucose-insulin-potassium treatment in coronary artery bypass graft surgery and percutaneous coronary intervention. *Interact. Cardiovasc Thorac. Surg.* **21**: 667-676.
- An, J., Varadarajan, S.G., Camara, A., Chen, Q., Novalija, E., Gross, G.J., and Stowe, D.F. (2001) Blocking Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange reduces [Na⁽⁺⁾]_i and [Ca⁽²⁺⁾]_i load after ischemia and improves function in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H2398-H2409.
- Andreka, G., Vertesaljai, M., Szantho, G., Font, G., Piroth, Z., Fontos, G. et al. (2007) Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* **93**: 749-752.
- Angelos, M.G., Murray, H.N., Gorsline, R.T., and Klawitter, P.F. (2002) Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics. *Resuscitation* **55**: 329-336.
- Aravindhan, K., Bao, W., Harpel, M.R., Willette, R.N., Lepore, J.J., and Jucker, B.M. (2015) Cardioprotection Resulting from Glucagon-Like Peptide-1 Administration Involves Shifting Metabolic Substrate Utilization to Increase Energy Efficiency in the Rat Heart. *PLoS. One.* **10**: e0130894.
- Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Muntean, D., Chalabreysse, L., Loufouat, J., Robert, D., and Ovize, M. (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **38**: 367-374.
- Avellanal, M., Rodríguez, P., and Barrigon, S. (1998) Protective effects of cyclopiazonic acid on ischemia-reperfusion injury in rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* **32**: 845-851.

BIBLIOGRAFÍA

Azzolin,L., Antolini,N., Calderan,A., Ruzza,P., Sciacovelli,M., Marin,O. et al. (2011) Antamanide, a derivative of *Amanita phalloides*, is a novel inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *PLoS. One.* **6**: e16280.

Bao,W., Aravindhan,K., Alsaid,H., Chendrimada,T., Szapacs,M., Citerone,D.R. et al. (2011) Albiglutide, a long lasting glucagon-like peptide-1 analog, protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury: evidence for improving cardiac metabolic efficiency. *PLoS. One.* **6**: e23570.

Bar,F.W., Tzivoni,D., Dirksen,M.T., Fernandez-Ortiz,A., Heyndrickx,G.R., Brachmann,J. et al. (2006) Results of the first clinical study of adjunctive CALdaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study. *Eur. Heart J* **27**: 2516-2523.

Barba,I., Jaimez-Auguets,E., Rodríguez-Sinovas,A., and García-Dorado,D. (2007) 1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA.* **20**: 265-271.

Basso,E., Fante,L., Fowlkes,J., Petronilli,V., Forte,M.A., and Bernardi,P. (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* **280**: 18558-18561.

Beardslee,M.A., Lerner,D.L., Tadros,P.N., Laing,J.G., Beyer,E.C., Yamada,K.A. et al. (2000) Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* **87**: 656-662.

Becker,L.B. (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* **61**: 461-470.

Bell,R.M. and Yellon,D.M. (2003a) Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll. Cardiol* **41**: 508-515.

Bell,R.M. and Yellon,D.M. (2003b) Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* **35**: 185-193.

Bellows,S.D. and Kloner,R.A. (1998) Glucose-Insulin-Potassium Does Not Reduce Myocardial Infarct Size in an Ischemic/Reperfusion Rabbit Model. *J Thromb. Thrombolysis.* **5**: 25-27.

Bender,A.T. and Beavo,J.A. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev* **58**: 488-520.

Bernardi,P. and Di Lisa,F. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **78**: 100-106.

Bernink,F.J., Timmers,L., Diamant,M., Scholte,M., Beek,A.M., Kamp,O. et al. (2013) Effect of additional treatment with EXenatide in patients with an Acute Myocardial Infarction: the EXAMI study. *Int. J Cardiol* **167**: 289-290.

Bertrand,L., Horman,S., Beauloye,C., and Vanoverschelde,J.L. (2008) Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res* **79**: 238-248.

Birnbaum,G.D., Birnbaum,I., Ye,Y., and Birnbaum,Y. (2015) Statin-Induced Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury: Potential Drug-Drug Interactions. Lesson to be Learnt by Translating Results from Animal Models to the Clinical Settings. *Cardiovasc Drugs Ther.* **29**: 461-467.

Boateng,S. and Sanborn,T. (2013) Acute myocardial infarction. *Dis. Mon.* **59**: 83-96.

- Bodendiek,S.B. and Raman,G. (2010) Connexin modulators and their potential targets under the magnifying glass. *Curr Med Chem.* **17**: 4191-4230.
- Boengler,K., Hilfiker-Kleiner,D., Heusch,G., and Schulz,R. (2010) Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* **105**: 771-785.
- Bolli,R. (2007) Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: H19-H27.
- Bond,J.M., Herman,B., and Lemasters,J.J. (1991) Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **179**: 798-803.
- Borel,J.F., Feurer,C., Magnee,C., and Stahelin,H. (1977) Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* **32**: 1017-1025.
- Bose,A.K., Mocanu,M.M., Carr,R.D., Brand,C.L., and Yellon,D.M. (2005) Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* **54**: 146-151.
- Botker,H.E., Kharbanda,R., Schmidt,M.R., Bottcher,M., Kaltoft,A.K., Terkelsen,C.J. et al. (2010) Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* **375**: 727-734.
- Bowers,K.C., Allshire,A.P., and Cobbold,P.H. (1992) Bioluminescent measurement in single cardiomyocytes of sudden cytosolic ATP depletion coincident with rigor. *J Mol Cell Cardiol* **24**: 213-218.
- Boyce,S.W., Bartels,C., Bolli,R., Chaitman,B., Chen,J.C., Chi,E. et al. (2003) Impact of sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide on death or myocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **126**: 420-427.
- Brack,K.E., Narang,R., Winter,J., and Ng,G.A. (2013) The mechanical uncoupler blebbistatin is associated with significant electrophysiological effects in the isolated rabbit heart. *Exp. Physiol* **98**: 1009-1027.
- Braet,K., Vandamme,W., Martin,P.E., Evans,W.H., and Leybaert,L. (2003) Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium* **33**: 37-48.
- Brandenburger,T., Huhn,R., Galas,A., Pannen,B.H., Keitel,V., Barthel,F. et al. (2014) Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *J Transl. Med* **12**: 228.
- Braunwald,E. and Kloner,R.A. (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* **76**: 1713-1719.
- Brooks,W.W., Verrier,R.L., and Lown,B. (1981) Extra-adrenergic mechanisms responsible for the effects of glucose-insulin-potassium solution on vulnerability to ventricular fibrillation. *Am J Cardiol* **47**: 251-257.
- Brown,D.A., Hale,S.L., Baines,C.P., del Rio,C.L., Hamlin,R.L., Yueyama,Y. et al. (2014) Reduction of early reperfusion injury with the mitochondria-targeting peptide bendavia. *J Cardiovasc Pharmacol. Ther.* **19**: 121-132.

BIBLIOGRAFÍA

- Budas,G.R., Churchill,E.N., and Mochly-Rosen,D. (2007) Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol. Res* **55**: 523-536.
- Bunger,R. and Mallet,R.T. (2013) Cyclosporine A cardioprotection: mechanisms and potential for clinical application. *Crit Care Med* **41**: 1156-1158.
- Cave,A.C., Ingwall,J.S., Friedrich,J., Liao,R., Saupé,K.W., Apstein,C.S., and Eberli,F.R. (2000) ATP synthesis during low-flow ischemia: influence of increased glycolytic substrate. *Circulation* **101**: 2090-2096.
- Ceremuzynski,L., Budaj,A., Czepiel,A., Burzykowski,T., Achremczyk,P., Smielak-Korombel,W. et al. (1999) Low-dose glucose-insulin-potassium is ineffective in acute myocardial infarction: results of a randomized multicenter Pol-GIK trial. *Cardiovasc Drugs Ther.* **13**: 191-200.
- Cerra,M.C. and Pellegrino,D. (2007) Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. *Curr Med Chem.* **14**: 585-599.
- Chen,Q., Moghaddas,S., Hoppel,C.L., and Lesnefsky,E.J. (2008) Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**: C460-C466.
- Chen,R.H. (1996) The scientific basis for hypocalcemic cardioplegia and reperfusion in cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* **62**: 910-914.
- Chen,S. and Li,S. (2012) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit.* **18**: RA161-RA165.
- Chen,W., Druhan,L.J., Chen,C.A., Hemann,C., Chen,Y.R., Berka,V. et al. (2010) Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. *Biochemistry* **49**: 3129-3137.
- Chen,Z.M., Pan,H.C., Chen,Y.P., Peto,R., Collins,R., Jiang,L.X. et al. (2005) Early intravenous then oral metoprolol in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **366**: 1622-1632.
- Chiari,P.C., Bienengraeber,M.W., Pagel,P.S., Krolikowski,J.G., Kersten,J.R., and Wartier,D.C. (2005) Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* **102**: 102-109.
- Chinda,K., Palee,S., Surinkaew,S., Phornphutkul,M., Chattipakorn,S., and Chattipakorn,N. (2013) Cardioprotective effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor during ischemia-reperfusion injury. *Int. J Cardiol* **167**: 451-457.
- Chouchani,E.T., Methner,C., Nadtochiy,S.M., Logan,A., Pell,V.R., Ding,S. et al. (2013) Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med* **19**: 753-759.
- Chouchani,E.T., Pell,V.R., Gaude,E., Aksentijevic,D., Sundier,S.Y., Robb,E.L. et al. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**: 431-435.
- Christensen,C.W., Rieder,M.A., Silverstein,E.L., and Gencheff,N.E. (1995) Magnesium sulfate reduces myocardial infarct size when administered before but not after coronary reperfusion in a canine model. *Circulation* **92**: 2617-2621.

- Chung,C.S., Mechas,C., and Campbell,K.S. (2015) Myocyte contractility can be maintained by storing cells with the myosin ATPase inhibitor 2,3 butanedione monoxime. *Physiol Rep.* **3**: e12445.
- Clarke,S.J., McCormick,L.M., and Dutka,D.P. (2014) Optimising cardioprotection during myocardial ischaemia: targeting potential intracellular pathways with glucagon-like peptide-1. *Cardiovasc Diabetol.* **13**: 12.
- Clarke,S.J., McStay,G.P., and Halestrap,A.P. (2002) Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem.* **277**: 34793-34799.
- Cohen,D.J., Loertscher,R., Rubin,M.F., Tilney,N.L., Carpenter,C.B., and Strom,T.B. (1984) Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann. Intern. Med* **101**: 667-682.
- Cohen,M.V. and Downey,J.M. (2011) Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**: 821-831.
- Cohen,P. and Frame,S. (2001) The renaissance of GSK3. *Nat. Rev Mol Cell Biol* **2**: 769-776.
- Costa,M.A., Elesgaray,R., Balaszczuk,A.M., and Arranz,C. (2006) Role of NPR-C natriuretic receptor in nitric oxide system activation induced by atrial natriuretic peptide. *Regul. Pept.* **135**: 63-68.
- Crepaldi,G., Carruba,M., Comaschi,M., Del Prato,S., Frajese,G., and Paolisso,G. (2007) Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitors and their role in Type 2 diabetes management. *J Endocrinol. Invest* **30**: 610-614.
- Crimi,G., Pica,S., Raineri,C., Bramucci,E., De Ferrari,G.M., Klersy,C. et al. (2013) Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JACC Cardiovasc Interv.* **6**: 1055-1063.
- Crompton,M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J* **341 (Pt 2)**: 233-249.
- Crutchfield,C.A., Thomas,S.N., Sokoll,L.J., and Chan,D.W. (2016) Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clin Proteomics.* **13**: 1.
- Cung,T.T., Morel,O., Cayla,G., Rioufol,G., García-Dorado,D., Angoulvant,D. et al. (2015) Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J Med* **373**: 1021-1031.
- Das,D.K., Maulik,N., Sato,M., and Ray,P.S. (1999) Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem.* **196**: 59-67.
- Das,U.N. (2001) Can glucose-insulin-potassium regimen suppress inflammatory bowel disease? *Med Hypotheses* **57**: 183-185.
- Das,U.N. (2002) Is insulin an endogenous cardioprotector? *Crit Care* **6**: 389-393.
- Davies,W.R., Brown,A.J., Watson,W., McCormick,L.M., West,N.E., Dutka,D.P., and Hoole,S.P. (2013) Remote ischemic preconditioning improves outcome at 6 years after elective percutaneous coronary intervention: the CRISP stent trial long-term follow-up. *Circ Cardiovasc Interv.* **6**: 246-251.

BIBLIOGRAFÍA

Deacon,C.F. (2004) Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes* **53**: 2181-2189.

DeNicola,M., Du,J., Wang,Z., Yano,N., Zhang,L., Wang,Y. et al. (2014) Stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor through exendin-4 preserves myocardial performance and prevents cardiac remodeling in infarcted myocardium. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* **307**: E630-E643.

Dhillon,P.S., Gray,R., Kojodjojo,P., Jabr,R., Chowdhury,R., Fry,C.H., and Peters,N.S. (2013) Relationship between gap-junctional conductance and conduction velocity in mammalian myocardium. *Circ Arrhythm. Electrophysiol.* **6**: 1208-1214.

Di Lisa,F. and Bernardi,P. (1998) Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem.* **184**: 379-391.

Di Lisa,F., Menabo,R., Canton,M., Barile,M., and Bernardi,P. (2001) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* **276**: 2571-2575.

Diaz,A., Humeres,C., Gonzalez,V., Gomez,M.T., Montt,N., Sánchez,G. et al. (2015) Insulin/NFkappaB protects against ischemia-induced necrotic cardiomyocyte death. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **467**: 451-457.

Diaz,R., Paolasso,E.A., Piegas,L.S., Tajer,C.D., Moreno,M.G., Corvalan,R. et al. (1998) Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA (Estudios Cardiologicos Latinoamerica) Collaborative Group. *Circulation* **98**: 2227-2234.

Dickson,E.W., Lorbar,M., Porcaro,W.A., Fenton,R.A., Reinhardt,C.P., Gysembergh,A., and Przyklenk,K. (1999) Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* **277**: H2451-H2457.

Dirksen,M.T., Laarman,G.J., Simoons,M.L., and Duncker,D.J. (2007) Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res* **74**: 343-355.

Donato,M., Buchholz,B., Rodríguez,M., Perez,V., Inserte,J., García-Dorado,D., and Gelpi,R.J. (2013) Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp. Physiol* **98**: 425-434.

Dou,Y., Arlock,P., and Arner,A. (2007) Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**: C1148-C1153.

Downey,J.M. and Cohen,M.V. (2006) Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog. Cardiovasc Dis.* **48**: 363-371.

du Toit,E.F. and Opie,L.H. (1994) Antiarrhythmic properties of specific inhibitors of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in the isolated perfused rat heart after coronary artery ligation. *J Am Coll. Cardiol* **23**: 1505-1510.

Eitel,I., Stiermaier,T., Rommel,K.P., Fuernau,G., Sandri,M., Mangner,N. et al. (2015) Cardioprotection by combined intrahospital remote ischaemic preconditioning and postconditioning in ST-elevation myocardial infarction: the randomized LIPSIA CONDITIONING trial. *Eur. Heart J* **36**: 3049-3057.

Elias,C.L., Lukas,A., Shurraw,S., Scott,J., Omelchenko,A., Gross,G.J. et al. (2001) Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by KB-R7943: transport mode selectivity and antiarrhythmic consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H1334-H1345.

- Eng,J., Kleinman,W.A., Singh,L., Singh,G., and Raufman,J.P. (1992) Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem.* **267**: 7402-7405.
- Ertracht,O., Malka,A., Atar,S., and Binah,O. (2014) The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia. *Pharmacol. Ther.* **142**: 33-40.
- Evans,CL., Grande,F., and Musu,F.J. (1935) The glucose and lactate consumption of the dog's heart. *Q J Exp Physiol* **24**: 347-352.
- Evans,W.H. and Boitano,S. (2001) Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 606-612.
- Fantinelli,J.C., Cingolani,H.E., and Mosca,S.M. (2006) Na⁺/H⁺ exchanger inhibition at the onset of reperfusion decreases myocardial infarct size: role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Pathol.* **15**: 179-184.
- Fauconnier,J., Roberge,S., Saint,N., and Lacampagne,A. (2013) Type 2 ryanodine receptor: a novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacol. Ther.* **138**: 323-332.
- Fedorov,V.V., Lozinsky,I.T., Sosunov,E.A., Anyukhovskiy,E.P., Rosen,M.R., Balke,C.W., and Efimov,I.R. (2007) Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm.* **4**: 619-626.
- Ferdinandy,P., Schulz,R., and Baxter,G.F. (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol. Rev* **59**: 418-458.
- Fischer,G., Wittmann-Liebold,B., Lang,K., Kiefhaber,T., and Schmid,F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**: 476-478.
- Flaherty,J.T., Pitt,B., Gruber,J.W., Heuser,R.R., Rothbaum,D.A., Burwell,L.R. et al. (1994) Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* **89**: 1982-1991.
- Fordyce,C.B., Gersh,B.J., Stone,G.W., and Granger,C.B. (2015) Novel therapeutics in myocardial infarction: targeting microvascular dysfunction and reperfusion injury. *Trends Pharmacol. Sci* **36**: 605-616.
- Frohlich,G.M., Meier,P., White,S.K., Yellon,D.M., and Hausenloy,D.J. (2013) Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur. Heart J* **34**: 1714-1722.
- Fukuhiro,Y., Wowk,M., Ou,R., Rosenfeldt,F., and Pepe,S. (2000) Cardioplegic strategies for calcium control: low Ca(2+), high Mg(2+), citrate, or Na(+)/H(+) exchange inhibitor HOE-642. *Circulation* **102**: III319-III325.
- Gajarsa,J.J. and Kloner,R.A. (2011) Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail. Rev* **16**: 13-21.
- Ganame,J., Messalli,G., Dymarkowski,S., Rademakers,F.E., Desmet,W., Van de,W.F., and Bogaert,J. (2009) Impact of myocardial haemorrhage on left ventricular function and remodelling in patients with reperfused acute myocardial infarction. *Eur. Heart J* **30**: 1440-1449.
- Ganote,C.E. (1983) Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* **15**: 67-73.

BIBLIOGRAFÍA

Gao,F., Gao,E., Yue,T.L., Ohlstein,E.H., Lopez,B.L., Christopher,T.A., and Ma,X.L. (2002) Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* **105**: 1497-1502.

García-Dorado,D., Agullo,L., Sartorio,C.L., and Ruiz-Meana,M. (2009) Myocardial protection against reperfusion injury: the cGMP pathway. *Thromb. Haemost.* **101**: 635-642.

García-Dorado,D., García-del-Blanco,B., Otaegui,I., Rodríguez-Palomares,J., Pineda,V., Gimeno,F. et al. (2014a) Intracoronary injection of adenosine before reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a randomized controlled clinical trial. *Int. J Cardiol* **177**: 935-941.

García-Dorado,D., Gonzalez,M.A., Barrabes,J.A., Ruiz-Meana,M., Solares,J., Lidon,R.M. et al. (1997a) Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na(+)-H+ exchange. *Cardiovasc Res* **35**: 80-89.

García-Dorado,D., Inserte,J., Ruiz-Meana,M., Gonzalez,M.A., Solares,J., Julia,M. et al. (1997b) Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **96**: 3579-3586.

García-Dorado,D. and Piper,H.M. (2006) Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. *Cardiovasc Res* **69**: 1-3.

García-Dorado,D., Rodríguez-Sinovas,A., and Ruiz-Meana,M. (2004) Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* **61**: 386-401.

García-Dorado,D., Rodríguez-Sinovas,A., Ruiz-Meana,M., and Inserte,J. (2014b) Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl. Ed)* **67**: 394-404.

García-Dorado,D., Rodríguez-Sinovas,A., Ruiz-Meana,M., Inserte,J., Agullo,L., and Cabestrero,A. (2006) The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* **70**: 274-285.

García-Dorado,D., Theroux,P., Duran,J.M., Solares,J., Alonso,J., Sanz,E. et al. (1992a) Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* **85**: 1160-1174.

García-Dorado,D., Theroux,P., Elizaga,J., Galiñanes,M., Solares,J., Riesgo,M. et al. (1987a) Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* **21**: 537-544.

García-Dorado,D., Theroux,P., Fernandez-Aviles,F., Elizaga,J., Solares,J., and Galiñanes,M. (1987b) Diltiazem and progression of myocardial ischemic damage during coronary artery occlusion and reperfusion in porcine hearts. *J Am Coll. Cardiol* **10**: 906-911.

García-Dorado,D., Theroux,P., Munoz,R., Alonso,J., Elizaga,J., Fernandez-Aviles,F. et al. (1992b) Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol* **262**: H17-H22.

Genova-Maleras,R., Alvarez-Martin,E., Morant-Ginestar,C., Fernandez,d.L.-B., and Catala-Lopez,F. (2012) Measuring the burden of disease and injury in Spain using disability-adjusted life years: an updated and policy-oriented overview. *Public Health* **126**: 1024-1031.

- Gerczuk,P.Z. and Kloner,R.A. (2012) An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. *J Am Coll. Cardiol* **59**: 969-978.
- Gho,B.C., Schoemaker,R.G., van den Doel,M.A., Duncker,D.J., and Verdouw,P.D. (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* **94**: 2193-2200.
- Ghosh,S. and Galiñanes,M. (2003) Protection of the human heart with ischemic preconditioning during cardiac surgery: role of cardiopulmonary bypass. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **126**: 133-142.
- Ginks,W.R., Sybers,H.D., Maroko,P.R., Covell,J.W., Sobel,B.E., and Ross,J., Jr. (1972) Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest* **51**: 2717-2723.
- Giricz,Z., Varga,Z.V., Baranyai,T., Sipos,P., Paloczi,K., Kittel,A. et al. (2014) Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J Mol Cell Cardiol* **68**: 75-78.
- Goke,R., Fehmann,H.C., Linn,T., Schmidt,H., Krause,M., Eng,J., and Goke,B. (1993) Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem.* **268**: 19650-19655.
- Goulston,A. (1912) West Indian cane sugar in treatment of certain forms of heart diseases. *British Medical Journal* **2**: 693-695.
- Griffiths,E.J. and Halestrap,A.P. (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* **25**: 1461-1469.
- Griffiths,E.J. and Halestrap,A.P. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J* **307 (Pt 1)**: 93-98.
- Grober,U., Schmidt,J., and Kisters,K. (2015) Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients.* **7**: 8199-8226.
- Groeneveld,A.B.J., Beishuizen,A., and Visser,F.C. (2002) Insulin: a wonder drug in the critically ill? *Crit Care* **6**: 102-105.
- Gross,E.R., Hsu,A.K., and Gross,G.J. (2004) Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* **94**: 960-966.
- Grossman,A.N., Opie,L.H., Beshansky,J.R., Ingwall,J.S., Rackley,C.E., and Selker,H.P. (2013) Glucose-insulin-potassium revived: current status in acute coronary syndromes and the energy-depleted heart. *Circulation* **127**: 1040-1048.
- Gumina,R.J., Daemmgen,J., and Gross,G.J. (2000) Inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger attenuates phase 1b ischemic arrhythmias and reperfusion-induced ventricular fibrillation. *Eur. J Pharmacol.* **396**: 119-124.
- Gupta,V. (2013) Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian J Endocrinol. Metab* **17**: 413-421.
- Hahn,J.Y., Kim,H.J., Choi,Y.J., Jo,S.H., Kim,H.J., Lee,S. et al. (2011) Effects of atorvastatin pretreatment on infarct size in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* **162**: 1026-1033.

BIBLIOGRAFÍA

Hahn,J.Y., Song,Y.B., Kim,E.K., Yu,C.W., Bae,J.W., Chung,W.Y. et al. (2013) Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation* **128**: 1889-1896.

Haider,W., Benzer,H., Schutz,W., and Wolner,E. (1984) Improvement of cardiac preservation by preoperative high insulin supply. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **88**: 294-300.

Halestrap,A.P. (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* **46**: 821-831.

Halestrap,A.P., Clarke,S.J., and Javadov,S.A. (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**: 372-385.

Halestrap,A.P., Connern,C.P., Griffiths,E.J., and Kerr,P.M. (1997) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* **174**: 167-172.

Halestrap,A.P. and Richardson,A.P. (2015) The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **78**: 129-141.

Harris,A.S. and Rojas,A.G. (1943) The initiation of ventricular fibrillation due to coronary occlusion. *Exp Med Surg* **1**: 105-122.

Hausenloy,D.J., Botker,H.E., Engstrom,T., Erlinge,D., Heusch,G., Ibañez,B. et al. (2016) Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations. *Eur. Heart J.* pii: ehw145.

Hausenloy,D.J., Candilio,L., Evans,R., Ariti,C., Jenkins,D.P., Kolvekar,S. et al. (2015) Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N. Engl. J Med* **373**: 1408-1417.

Hausenloy,D.J., Duchon,M.R., and Yellon,D.M. (2003) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **60**: 617-625.

Hausenloy,D.J., Erik,B.H., Condorelli,G., Ferdinandy,P., García-Dorado,D., Heusch,G. et al. (2013a) Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **98**: 7-27.

Hausenloy,D.J., Iliodromitis,E.K., Andreadou,I., Papalois,A., Gritsopoulos,G., Anastasiou-Nana,M. et al. (2012) Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovasc Drugs Ther.* **26**: 87-93.

Hausenloy,D.J., Maddock,H.L., Baxter,G.F., and Yellon,D.M. (2002) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* **55**: 534-543.

Hausenloy,D.J., Mwamure,P.K., Venugopal,V., Harris,J., Barnard,M., Grundy,E. et al. (2007) Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* **370**: 575-579.

Hausenloy,D.J., Whittington,H.J., Wynne,A.M., Begum,S.S., Theodorou,L., Riksen,N. et al. (2013b) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and GLP-1 reduce myocardial infarct size in a glucose-dependent manner. *Cardiovasc Diabetol.* **12**: 154.

- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* **61**: 448-460.
- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2007) Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail. Rev* **12**: 217-234.
- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2008) Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* **79**: 377-386.
- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2009) Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* **204**: 334-341.
- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* **123**: 92-100.
- Hawat,G., Benderdour,M., Rousseau,G., and Baroudi,G. (2010) Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury. *Pflugers Arch.* **460**: 583-592.
- Hayashi,M., Tsutamoto,T., Wada,A., Maeda,K., Mabuchi,N., Tsutsui,T. et al. (2001) Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction. *J Am Coll. Cardiol* **37**: 1820-1826.
- Hearse,D.J. and Tosaki,A. (1987) Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ Res* **60**: 375-383.
- Hepponstall,M., Ignjatovic,V., Binos,S., Monagle,P., Jones,B., Cheung,M.H. et al. (2012) Remote ischemic preconditioning (RIPC) modifies plasma proteome in humans. *PLoS. One.* **7**: e48284.
- Hernandez,J.S., Barreto-Torres,G., Kuznetsov,A.V., Khuchua,Z., and Javadov,S. (2014) Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria. *J Cell Mol Med* **18**: 709-720.
- Hernando,V., Inserte,J., Sartorio,C.L., Parra,V.M., Poncelas-Nozal,M., and García-Dorado,D. (2010) Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **49**: 271-279.
- Herve,J.C. and Derangeon,M. (2013) Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res* **352**: 21-31.
- Herzog,W.R., Schlossberg,M.L., MacMurdy,K.S., Edenbaum,L.R., Gerber,M.J., Vogel,R.A., and Serebruany,V.L. (1995) Timing of magnesium therapy affects experimental infarct size. *Circulation* **92**: 2622-2626.
- Heusch,G. (2013) Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* **381**: 166-175.
- Heusch,G. (2015) Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* **116**: 674-699.
- Heusch,G., Boengler,K., and Schulz,R. (2008) Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* **118**: 1915-1919.
- Heusch,G., Botker,H.E., Przyklenk,K., Redington,A., and Yellon,D. (2015) Remote Ischemic Conditioning. *J Am Coll. Cardiol* **65**: 177-195.

BIBLIOGRAFÍA

Heusch,G., Kleinbongard,P., Bose,D., Levkau,B., Haude,M., Schulz,R., and Erbel,R. (2009) Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation* **120**: 1822-1836.

Higginson,L., Tang,A., Knoll,G., and Calvin,J. (1991) Effect of intracoronary diltiazem on infarct size and regional myocardial function in the ischemic reperfused canine heart. *J Am Coll. Cardiol* **18**: 868-875.

Hoche,B., Sharkovska,Y., Mark,M., Klein,T., and Pfab,T. (2013) The novel DPP-4 inhibitors linagliptin and BI 14361 reduce infarct size after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Int. J Cardiol* **167**: 87-93.

Holmuhamedov,E.L., Wang,L., and Terzic,A. (1999) ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* **519 Pt 2**: 347-360.

Hombach,V., Grebe,O., Merkle,N., Waldenmaier,S., Hoher,M., Kochs,M. et al. (2005) Sequelae of acute myocardial infarction regarding cardiac structure and function and their prognostic significance as assessed by magnetic resonance imaging. *Eur. Heart J* **26**: 549-557.

Honda,H.M., Korge,P., and Weiss,J.N. (2005) Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann. N. Y Acad. Sci* **1047**: 248-258.

Huisamen,B., Genade,S., and Lochner,A. (2008) Signalling pathways activated by glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat heart and their role in protection against ischaemia. *Cardiovasc J Afr.* **19**: 77-83.

Ibañez,B., Cimmino,G., Prat-Gonzalez,S., Vilahur,G., Hutter,R., García,M.J. et al. (2011) The cardioprotection granted by metoprolol is restricted to its administration prior to coronary reperfusion. *Int. J Cardiol* **147**: 428-432.

Ibañez,B., Heusch,G., Ovize,M., and Van de,W.F. (2015) Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll. Cardiol* **65**: 1454-1471.

Ibañez,B., Macaya,C., Sánchez-Brunete,V., Pizarro,G., Fernandez-Friera,L., Mateos,A. et al. (2013) Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation* **128**: 1495-1503.

Ibañez,B., Prat-Gonzalez,S., Speidl,W.S., Vilahur,G., Pinero,A., Cimmino,G. et al. (2007) Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* **115**: 2909-2916.

Imura,H., Lin,H., Griffiths,E.J., and Suleiman,M.S. (2011) Controlled hyperkalemic reperfusion with magnesium rescues ischemic juvenile hearts by reducing calcium loading. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **141**: 1529-1537.

Inserte,J., Barba,I., Hernando,V., Abellan,A., Ruiz-Meana,M., Rodríguez-Sinovas,A., and García-Dorado,D. (2008) Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res* **77**: 782-790.

Inserte,J., Barba,I., Hernando,V., and García-Dorado,D. (2009) Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc Res* **81**: 116-122.

Inserte,J., Barba,I., Poncelas-Nozal,M., Hernando,V., Agullo,L., Ruiz-Meana,M., and García-Dorado,D. (2011a) cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat

- hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **50**: 903-909.
- Inserte,J. and García-Dorado,D. (2015) The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism. *Br. J Pharmacol.* **172**: 1996-2009.
- Inserte,J., García-Dorado,D., Hernando,V., and Soler-Soler,J. (2005) Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res* **97**: 465-473.
- Inserte,J., García-Dorado,D., Ruiz-Meana,M., Agullo,L., Pina,P., and Soler-Soler,J. (2004) Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* **64**: 105-114.
- Inserte,J., García-Dorado,D., Ruiz-Meana,M., Padilla,F., Barrabes,J.A., Pina,P. et al. (2002) Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* **55**: 739-748.
- Inserte,J., Hernando,V., and García-Dorado,D. (2012) Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **96**: 23-31.
- Inserte,J., Hernando,V., Ruiz-Meana,M., Poncelas-Nozal,M., Fernandez,C., Agullo,L. et al. (2014) Delayed phospholamban phosphorylation in post-conditioned heart favours Ca²⁺ normalization and contributes to protection. *Cardiovasc Res* **103**: 542-553.
- Inserte,J., Hernando,V., Vilardosa,U., Abad,E., Poncelas-Nozal,M., and García-Dorado,D. (2013) Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling. *J Am Heart Assoc.* **2**: e005975.
- Inserte,J., Ruiz-Meana,M., Rodríguez-Sinovas,A., Barba,I., and García-Dorado,D. (2011b) Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**: 923-939.
- Ito,H. (2006) No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat. Clin Pract. Cardiovasc Med* **3**: 499-506.
- Iwamoto,T., Miura,T., Adachi,T., Noto,T., Ogawa,T., Tsuchida,A., and Iimura,O. (1991) Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free-radical scavengers in the rabbit. *Circulation* **83**: 1015-1022.
- Iwamoto,T., Watanabe,Y., Kita,S., and Blaustein,M.P. (2007) Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *Cardiovasc Hematol. Disord. Drug Targets.* **7**: 188-198.
- Jain,A.K., Mehra,N.K., and Swarnakar,N.K. (2015) Role of Antioxidants for the Treatment of Cardiovascular Diseases: Challenges and Opportunities. *Curr Pharm. Des* **21**: 4441-4455.
- Jang,I.K., Weissman,N.J., Picard,M.H., Zile,M.R., Pettigrew,V., Shen,S. et al. (2008) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of intravenous MCC-135 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction: Evaluation of MCC-135 for left ventricular salvage in acute myocardial infarction (EVOLVE). *Am Heart J* **155**: 113-118.
- Jensen,R.V., Stottrup,N.B., Kristiansen,S.B., and Botker,H.E. (2012) Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol* **107**: 285.

BIBLIOGRAFÍA

Jonassen,A.K., Aasum,E., Riemersma,R.A., Mjos,O.D., and Larsen,T.S. (2000) Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther.* **14**: 615-623.

Jonassen,A.K., Sack,M.N., Mjos,O.D., and Yellon,D.M. (2001) Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* **89**: 1191-1198.

Kai,Z., Yongbo,W., Lin,Z., Jie,G., Daoqun,J., and Zhiqiang,C. (2013) Exendin-4 attenuates ischemia-induced ventricular arrhythmias in rats. *Cardiol J* **20**: 29-33.

Kantor,P.F., Lucien,A., Kozak,R., and Lopaschuk,G.D. (2000) The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res* **86**: 580-588.

Kaplan,S.H., Yang,H., Gilliam,D.E., Shen,J., Lemasters,J.J., and Cascio,W.E. (1995) Hypercapnic acidosis and dimethyl amiloride reduce reperfusion induced cell death in ischaemic ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* **29**: 231-238.

Karmazyn,M. (2013) NHE-1: still a viable therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol* **61**: 77-82.

Kassimis,G., Davlouros,P., Patel,N., De Maria,G., Kallistratos,M.S., Kharbanda,R.K. et al. (2015) Adenosine as an Adjunct Therapy in ST Elevation Myocardial Infarction Patients: Myth or Truth? *Cardiovasc Drugs Ther.* **29**: 481-493.

Kerendi,F., Kin,H., Halkos,M.E., Jiang,R., Zatta,A.J., Zhao,Z.Q. et al. (2005) Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* **100**: 404-412.

Kevin,L.G., Novalija,E., and Stowe,D.F. (2005) Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth. Analg.* **101**: 1275-1287.

Khan,M., Meduru,S., Mostafa,M., Khan,S., Hideg,K., and Kuppusamy,P. (2010) Trimetazidine, administered at the onset of reperfusion, ameliorates myocardial dysfunction and injury by activation of p38 mitogen-activated protein kinase and Akt signaling. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **333**: 421-429.

Khan,T.A., Bianchi,C., Voisine,P., Feng,J., Baker,J., Hart,M. et al. (2004) Reduction of myocardial reperfusion injury by aprotinin after regional ischemia and cardioplegic arrest. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **128**: 602-608.

Kis,A., Baxter,G.F., and Yellon,D.M. (2003) Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A1/A2A receptor agonist: role of A2A receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther.* **17**: 415-425.

Kitakaze,M., Asakura,M., Kim,J., Shintani,Y., Asanuma,H., Hamasaki,T. et al. (2007) Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet* **370**: 1483-1493.

Kitakaze,M., Takashima,S., Funaya,H., Minamino,T., Node,K., Shinozaki,Y. et al. (1997) Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size in dogs. *Am J Physiol* **272**: H2071-H2078.

Klein,H.H., Pich,S., Bohle,R.M., Lindert-Heimberg,S., and Nebendahl,K. (2000) Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation* **102**: 1977-1982.

- Kloner,R.A. (2013) Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. *Circ Res* **113**: 451-463.
- Kloner,R.A., Bolli,R., Marban,E., Reinlib,L., and Braunwald,E. (1998) Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* **97**: 1848-1867.
- Kloner,R.A. and Nesto,R.W. (2008) Glucose-insulin-potassium for acute myocardial infarction: continuing controversy over cardioprotection. *Circulation* **117**: 2523-2533.
- Kopecky,S.L., Aviles,R.J., Bell,M.R., Lobl,J.K., Tipping,D., Frommell,G. et al. (2003) A randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-ranging study measuring the effect of an adenosine agonist on infarct size reduction in patients undergoing primary percutaneous transluminal coronary angioplasty: the ADMIRE (AmP579 Delivery for Myocardial Infarction REduction) study. *Am Heart J* **146**: 146-152.
- Kottenberg,E., Musiolik,J., Thielmann,M., Jakob,H., Peters,J., and Heusch,G. (2014) Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **147**: 376-382.
- Koumura,A., Nonaka,Y., Hyakkoku,K., Oka,T., Shimazawa,M., Hozumi,I. et al. (2008) A novel calpain inhibitor, ((1S)-1((((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-met hylbutyl) carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester, protects neuronal cells from cerebral ischemia-induced damage in mice. *Neuroscience* **157**: 309-318.
- Krug,A., Du Mesnil,d.R., and Korb,G. (1966) Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res* **19**: 57-62.
- Kuga,H., Ogawa,K., Oida,A., Taguchi,I., Nakatsugawa,M., Hoshi,T. et al. (2003) Administration of atrial natriuretic peptide attenuates reperfusion phenomena and preserves left ventricular regional wall motion after direct coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circ J* **67**: 443-448.
- Kukreja,R.C., Salloum,F.N., Das,A., Koka,S., Ockaili,R.A., and Xi,L. (2011) Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. *Exp. Clin Cardiol* **16**: e30-e35.
- Lavi,S., D'Alfonso,S., Diamantouros,P., Camuglia,A., Garg,P., Teefy,P. et al. (2014) Remote ischemic postconditioning during percutaneous coronary interventions: remote ischemic postconditioning-percutaneous coronary intervention randomized trial. *Circ Cardiovasc Interv.* **7**: 225-232.
- Lazar,H.L., Zhang,X., Rivers,S., Bernard,S., and Shemin,R.J. (1995) Limiting ischemic myocardial damage using glucose-insulin-potassium solutions. *Ann. Thorac. Surg.* **60**: 411-416.
- Lecour,S. (2009a) Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol* **47**: 32-40.
- Lecour,S. (2009b) Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? *J Mol Cell Cardiol* **46**: 607-609.
- Li,J., Rohailla,S., Gelber,N., Rutka,J., Sabah,N., Gladstone,R.A. et al. (2014a) MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* **109**: 423.
- Li,S.J., Wu,Y.N., Kang,Y., Yin,Y.Q., Gao,W.Z., Liu,Y.X., and Lou,J.S. (2010) Noninvasive limb ischemic preconditioning protects against myocardial I/R injury in rats. *J Surg. Res* **164**: 162-168.

BIBLIOGRAFÍA

Li,W.N., Wu,N., Shu,W.Q., Guan,Y.E., and Jia,D.L. (2014b) The protective effect of fasudil pretreatment combined with ischemia postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur. Rev Med Pharmacol. Sci* **18**: 2748-2758.

Libby,P. (2013) Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N. Engl. J Med* **368**: 2004-2013.

Limalanathan,S., Andersen,G.O., Klow,N.E., Abdelnoor,M., Hoffmann,P., and Eritsland,J. (2014) Effect of ischemic postconditioning on infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction treated by primary PCI results of the POSTEMI (POStconditioning in ST-Elevation Myocardial Infarction) randomized trial. *J Am Heart Assoc.* **3**: e000679.

Liu,J., Farmer,J.D., Jr., Lane,W.S., Friedman,J., Weissman,I., and Schreiber,S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815.

Liu,S., Taffet,S., Stoner,L., Delmar,M., Vallano,M.L., and Jalife,J. (1993) A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophys. J* **64**: 1422-1433.

Lonborg,J., Kelbaek,H., Vejlsturp,N., Botker,H.E., Kim,W.Y., Holmvang,L. et al. (2012a) Exenatide reduces final infarct size in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction and short-duration of ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* **5**: 288-295.

Lonborg,J., Vejlsturp,N., Kelbaek,H., Botker,H.E., Kim,W.Y., Mathiasen,A.B. et al. (2012b) Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J* **33**: 1491-1499.

Lundberg,J.O., Weitzberg,E., and Gladwin,M.T. (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev Drug Discov.* **7**: 156-167.

Luo,A.K. and Wu,K.C. (2006) Imaging microvascular obstruction and its clinical significance following acute myocardial infarction. *Heart Fail. Rev* **11**: 305-312.

Mahaffey,K.W., Puma,J.A., Barbagelata,N.A., DiCarli,M.F., Leeser,M.A., Browne,K.F. et al. (1999) Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction STudy of ADenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll. Cardiol* **34**: 1711-1720.

Marban,E. and Kusuoka,H. (1987) Maximal Ca²⁺-activated force and myofilament Ca²⁺ sensitivity in intact mammalian hearts. Differential effects of inorganic phosphate and hydrogen ions. *J Gen. Physiol* **90**: 609-623.

Maroko,P.R., Libby,P., Ginks,W.R., Bloor,C.M., Shell,W.E., Sobel,B.E., and Ross,J., Jr. (1972a) Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest* **51**: 2710-2716.

Maroko,P.R., Libby,P., Sobel,B.E., Bloor,C.M., Sybers,H.D., Shell,W.E. et al. (1972b) Effect of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion. *Circulation* **45**: 1160-1175.

Marzilli,M., Orsini,E., Marraccini,P., and Testa,R. (2000) Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation* **101**: 2154-2159.

Masereel,B., Pochet,L., and Laeckmann,D. (2003) An overview of inhibitors of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *Eur. J Med Chem.* **38**: 547-554.

- Masini,E., Cuzzocrea,S., Mazzon,E., Marzocca,C., Mannaioni,P.F., and Salvemini,D. (2002) Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. *Br. J Pharmacol.* **136**: 905-917.
- Mastitskaya,S., Basalay,M., Hosford,P.S., Ramage,A.G., Gourine,A., and Gourine,A.V. (2016) Identifying the Source of a Humoral Factor of Remote (Pre)Conditioning Cardioprotection. *PLoS. One.* **11**: e0150108.
- Mathers,C.D. and Loncar,D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS. Med* **3**: e442.
- Matsuoka,Y. and Srere,P.A. (1973) Kinetic studies of citrate synthase from rat kidney and rat brain. *J Biol Chem.* **248**: 8022-8030.
- Matsushima,S., Tsutsui,H., and Sadoshima,J. (2014) Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med* **24**: 202-205.
- Maulik,M., Maulik,S.K., and Kumari,R. (1999) Importance of timing of magnesium administration: a study on the isolated ischemic-reperfused rat heart. *Magnes. Res* **12**: 37-42.
- Mazzone,T., Chait,A., and Plutzky,J. (2008) Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet* **371**: 1800-1809.
- Mehta,S.R., Yusuf,S., Diaz,R., Zhu,J., Pais,P., Xavier,D. et al. (2005) Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA* **293**: 437-446.
- Meier,J.J. (2012) GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev Endocrinol.* **8**: 728-742.
- Mendis,S., Puska,P., and Norrving,B. (2011) *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. World Health Organisation. Geneva.
- Merlocco,A.C., Redington,K.L., Disenhouse,T., Strantzas,S.C., Gladstone,R., Wei,C. et al. (2014) Transcutaneous electrical nerve stimulation as a novel method of remote preconditioning: in vitro validation in an animal model and first human observations. *Basic Res Cardiol* **109**: 406.
- Mewton,N., Croisille,P., Gahide,G., Rioufol,G., Bonnefoy,E., Sánchez,I. et al. (2010) Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll. Cardiol* **55**: 1200-1205.
- Meybohm,P., Bein,B., Brosteanu,O., Cremer,J., Gruenewald,M., Stoppe,C. et al. (2015) A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N. Engl. J Med* **373**: 1397-1407.
- Mirica,S.N., Duicu,O.M., Trancota,S.L., Fira-Mladinescu,O., Angoulvant,D., and Muntean,D.M. (2013) Magnesium orotate elicits acute cardioprotection at reperfusion in isolated and in vivo rat hearts. *Can. J Physiol Pharmacol.* **91**: 108-115.
- Miro-Casas,E., Ruiz-Meana,M., Agullo,E., Stahlhofen,S., Rodríguez-Sinovas,A., Cabestrero,A. et al. (2009) Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res* **83**: 747-756.
- Miura,T., Downey,J.M., Hotta,D., and Imura,O. (1988) Effect of superoxide dismutase plus catalase on myocardial infarct size in rabbits. *Can. J Cardiol* **4**: 407-411.

BIBLIOGRAFÍA

Miyazaki,S., Fujiwara,H., Onodera,T., Kihara,Y., Matsuda,M., Wu,D.J. et al. (1987) Quantitative analysis of contraction band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart. *Circulation* **75**: 1074-1082.

Molnar,A.O., Fergusson,D., Tsampalieros,A.K., Bennett,A., Fergusson,N., Ramsay,T., and Knoll,G.A. (2015) Generic immunosuppression in solid organ transplantation: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **350**: h3163.

Moran,A.E., Forouzanfar,M.H., Roth,G.A., Mensah,G.A., Ezzati,M., Murray,C.J., and Naghavi,M. (2014) Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation* **129**: 1483-1492.

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

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

Nauck,M. (2016) Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes. Metab* **18**: 203-216.

Neuhof,C. and Neuhof,H. (2014) Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol* **6**: 638-652.

Nikolaidis,L.A., Elahi,D., Hentosz,T., Doverspike,A., Huerbin,R., Zourelis,L. et al. (2004) Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation* **110**: 955-961.

Novgorodov,S.A., Gudz,T.I., and Obeid,L.M. (2008) Long-chain ceramide is a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. **283**: 24707-24717.

Ovize,M., Aupetit,J.F., Rioufol,G., Loufoua,J., Andre-Fouet,X., Minaire,Y., and Faucon,G. (1995) Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol* **269**: H72-H79.

Pache,J., Kastrati,A., Mehilli,J., Bollwein,H., Ndrepepa,G., Schuhlen,H. et al. (2004) A randomized evaluation of the effects of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction treated with reperfusion therapy. *Am Heart J* **148**: e3.

Padilla,F., García-Dorado,D., Agullo,L., Barrabes,J.A., Inserte,J., Escalona,N. et al. (2001) Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res* **51**: 592-600.

Padilla,F., García-Dorado,D., Agullo,L., Inserte,J., Paniagua,A., Mirabet,S. et al. (2000) L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res* **46**: 412-420.

Park,S.S., Zhao,H., Jang,Y., Mueller,R.A., and Xu,Z. (2006a) N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 beta. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **318**: 124-131.

Park,S.S., Zhao,H., Mueller,R.A., and Xu,Z. (2006b) Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. *J Mol Cell Cardiol* **40**: 708-716.

- Parra,V., Verdejo,H.E., Iglewski,M., Del Campo,A., Troncoso,R., Jones,D. et al. (2014) Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFkappaB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes* **63**: 75-88.
- Patti,G., Pasceri,V., Colonna,G., Miglionico,M., Fischetti,D., Sardella,G. et al. (2007) Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial. *J Am Coll. Cardiol* **49**: 1272-1278.
- Perricone,A.J. and Vander Heide,R.S. (2014) Novel therapeutic strategies for ischemic heart disease. *Pharmacol. Res* **89**: 36-45.
- Petrat,F., Drowatzky,J., Boengler,K., Finckh,B., Schmitz,K.J., Schulz,R., and de Groot,H. (2011) Protection from glycine at low doses in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *Eur. Surg. Res* **46**: 180-187.
- Piot,C., Croisille,P., Staat,P., Thibault,H., Rioufol,G., Mewton,N. et al. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J Med* **359**: 473-481.
- Piper,H.M., Abdallah,Y., and Schafer,C. (2004) The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**: 365-371.
- Piper,H.M., García-Dorado,D., and Ovize,M. (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **38**: 291-300.
- Piper,H.M., Kasseckert,S., and Abdallah,Y. (2006) The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovasc Res* **70**: 170-173.
- Pizarro,G., Fernandez-Friera,L., Fuster,V., Fernandez-Jimenez,R., García-Ruiz,J.M., García-Alvarez,A. et al. (2014) Long-term benefit of early pre-reperfusion metoprolol administration in patients with acute myocardial infarction: results from the METOCARD-CNIC trial (Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction). *J Am Coll. Cardiol* **63**: 2356-2362.
- Pizzetti,G., Mailhac,A., Li,V.L., Di Marco,F., Lu,C., Margonato,A., and Chierchia,S.L. (2001) Beneficial effects of diltiazem during myocardial reperfusion: a randomized trial in acute myocardial infarction. *Ital. Heart J* **2**: 757-765.
- Portman,M.A., Panos,A.L., Xiao,Y., Anderson,D.L., and Ning,X. (2001) HOE-642 (cariporide) alters pH(i) and diastolic function after ischemia during reperfusion in pig hearts in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H830-H834.
- Poudyal,H. (2016) Mechanisms for the cardiovascular effects of glucagon-like peptide-1. *Acta Physiol (Oxf)* **216**: 277-313.
- Priori,S.G., Mantica,M., Napolitano,C., and Schwartz,P.J. (1990) Early afterdepolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation* **81**: 1911-1920.
- Prunier,F., Angoulvant,D., Saint,E.C., Vermes,E., Gilard,M., Piot,C. et al. (2014) The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* **109**: 400.
- Przyklenk,K. (2013) Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations. *Anesth. Analg.* **117**: 891-901.

BIBLIOGRAFÍA

Przyklenk,K., Bauer,B., Ovize,M., Kloner,R.A., and Whittaker,P. (1993) Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* **87**: 893-899.

Qiao,X., Xu,J., Yang,Q.J., Du,Y., Lei,S., Liu,Z.H. et al. (2013) Transient acidosis during early reperfusion attenuates myocardium ischemia reperfusion injury via PI3k-Akt-eNOS signaling pathway. *Oxid. Med Cell Longev.* **2013**: 126083.

Quan,W., Yin,Y., Xi,M., Zhou,D., Zhu,Y., Guan,Y. et al. (2013) Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro. *J Tradit. Chin Med* **33**: 85-91.

Quintana,M., Hjemdahl,P., Sollevi,A., Kahan,T., Edner,M., Rehnqvist,N. et al. (2003) Left ventricular function and cardiovascular events following adjuvant therapy with adenosine in acute myocardial infarction treated with thrombolysis, results of the ATTenuation by Adenosine of Cardiac Complications (ATTACC) study. *Eur. J Clin Pharmacol.* **59**: 1-9.

Randle,P.J., Garland,P.B., Hales,C.N., and Newsholme,E.A. (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**: 785-789.

Rassaf,T., Totzeck,M., Hendgen-Cotta,U.B., Shiva,S., Heusch,G., and Kelm,M. (2014) Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res* **114**: 1601-1610.

Redington,K.L., Disenhouse,T., Strantzas,S.C., Gladstone,R., Wei,C., Tropak,M.B. et al. (2012) Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. *Basic Res Cardiol* **107**: 241.

Reimer,K.A., Lowe,J.E., Rasmussen,M.M., and Jennings,R.B. (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* **56**: 786-794.

Ren,B., Shen,Y., Shao,H., Qian,J., Wu,H., and Jing,H. (2007) Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats. *Clin Chim. Acta* **377**: 83-87.

Ren,Y., Deng,L., Cai,Y., Lv,Y., and Jia,D. (2014) The protective effect of Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker kb-r7943 on myocardial ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic rat. *Cell Biochem. Biophys.* **70**: 1017-1022.

Revel,J.P. and Karnovsky,M.J. (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* **33**: C7-C12.

Richards,P., Parker,H.E., Adriaenssens,A.E., Hodgson,J.M., Cork,S.C., Trapp,S. et al. (2014) Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes* **63**: 1224-1233.

Rodríguez-Sinovas,A., Abdallah,Y., Piper,H.M., and García-Dorado,D. (2007a) Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail. Rev* **12**: 207-216.

Rodríguez-Sinovas,A., Boengler,K., Cabestrero,A., Gres,P., Morente,M., Ruiz-Meana,M. et al. (2006a) Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res* **99**: 93-101.

- Rodríguez-Sinovas,A., Cabestrero,A., García,D.B., Inserte,J., García,A., and García-Dorado,D. (2009) Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs. *Basic Res Cardiol* **104**: 761-771.
- Rodríguez-Sinovas,A., Cabestrero,A., Lopez,D., Torre,I., Morente,M., Abellan,A. et al. (2007b) The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog. Biophys. Mol Biol* **94**: 219-232.
- Rodríguez-Sinovas,A. and Cinca,J. (1999) [Sudden death (II). Myocardial ischemia and ventricular arrhythmias in experimental models: triggering mechanisms]. *Rev Esp Cardiol* **52**: 851-859.
- Rodríguez-Sinovas,A., García-Dorado,D., Padilla,F., Inserte,J., Barrabes,J.A., Ruiz-Meana,M. et al. (2003) Pre-treatment with the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* **58**: 109-117.
- Rodríguez-Sinovas,A., García-Dorado,D., Ruiz-Meana,M., and Soler-Soler,J. (2004) Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J Physiol* **559**: 245-257.
- Rodríguez-Sinovas,A., García-Dorado,D., Ruiz-Meana,M., and Soler-Soler,J. (2006b) Protective effect of gap junction uncouplers given during hypoxia against reoxygenation injury in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**: H648-H656.
- Rodríguez-Sinovas,A., Sánchez,J.A., Fernandez-Sanz,C., Ruiz-Meana,M., and García-Dorado,D. (2012) Connexin and pannexin as modulators of myocardial injury. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**: 1962-1970.
- Roolvink,V., Ibañez,B., Ottervanger,J.P., Pizarro,G., van Royen,N., Mateos,A. et al. (2016) Early Administration of intravenous Beta blockers in patients with ST-elevation myocardial infarction before primary PCI. *J Am Coll. Cardiol.* doi: 10.1016/j.jacc.2016.03.522.
- Ross,A.M., Gibbons,R.J., Stone,G.W., Kloner,R.A., and Alexander,R.W. (2005) A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll. Cardiol* **45**: 1775-1780.
- Ruiz-Meana,M., Abellan,A., Miro-Casas,E., Agullo,E., and García-Dorado,D. (2009) Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H1281-H1289.
- Ruiz-Meana,M., Abellan,A., Miro-Casas,E., and García-Dorado,D. (2007) Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* **102**: 542-552.
- Ruiz-Meana,M., García-Dorado,D., Gonzalez,M.A., Barrabes,J.A., and Soler-Soler,J. (1995) Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res* **30**: 64-69.
- Ruiz-Meana,M., García-Dorado,D., Hofstaetter,B., Piper,H.M., and Soler-Soler,J. (1999) Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res* **85**: 280-287.
- Ruiz-Meana,M., García-Dorado,D., Julia,M., Inserte,J., Siegmund,B., Ladilov,Y. et al. (2000) Protective effect of HOE642, a selective blocker of Na⁺-H⁺ exchange, against the development of rigor contracture in rat ventricular myocytes. *Exp. Physiol* **85**: 17-25.

BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz-Meana,M., García-Dorado,D., Pina,P., Inserte,J., Agullo,L., and Soler-Soler,J. (2003) Cariporide preserves mitochondrial proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H999-1006.
- Ruiz-Meana,M., Inserte,J., Fernandez-Sanz,C., Hernando,V., Miro-Casas,E., Barba,I., and García-Dorado,D. (2011) The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res Cardiol* **106**: 1259-1268.
- Ruiz-Meana,M., Nunez,E., Miro-Casas,E., Martinez-Acedo,P., Barba,I., Rodríguez-Sinovas,A. et al. (2014) Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol. *J Mol Cell Cardiol* **68**: 79-88.
- Ruiz-Meana,M., Pina,P., García-Dorado,D., Rodríguez-Sinovas,A., Barba,I., Miro-Casas,E. et al. (2004) Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J Physiol* **558**: 873-882.
- Ruiz-Meana,M., Rodríguez-Sinovas,A., Cabestrero,A., Boengler,K., Heusch,G., and García-Dorado,D. (2008) Mitochondrial connexin43 as a new player in the pathophysiology of myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **77**: 325-333.
- Rupprecht,H.J., vom,D.J., Terres,W., Seyfarth,K.M., Richardt,G., Schultheisbeta,H.P. et al. (2000) Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation* **101**: 2902-2908.
- Sachdeva,J., Dai,W., Gerczuk,P.Z., and Kloner,R.A. (2014) Combined remote preconditioning and postconditioning failed to attenuate infarct size and contractile dysfunction in a rat model of coronary artery occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol. Ther.* **19**: 567-573.
- Sack,M.N. and Murphy,E. (2011) The role of comorbidities in cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol. Ther.* **16**: 267-272.
- Sack,M.N. and Yellon,D.M. (2003) Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia: a proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. *J Am Coll. Cardiol* **41**: 1404-1407.
- Saitoh,T., Ishida,M., Maruyama,M., and Shinozaki,H. (1994) A novel antagonist, phenylbenzene omega-phosphono-alpha-amino acid, for strychnine-sensitive glycine receptors in the rat spinal cord. *Br. J Pharmacol.* **113**: 165-170.
- Salling,H.K., Dohler,K.D., Engstrom,T., and Treiman,M. (2012) Postconditioning with curaglutide, a novel GLP-1 analog, protects against heart ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart. *Regul. Pept.* **178**: 51-55.
- Sánchez,J.A., Rodríguez-Sinovas,A., Barba,I., Miro-Casas,E., Fernandez-Sanz,C., Ruiz-Meana,M. et al. (2013) Activation of RISK and SAFE pathways is not involved in the effects of Cx43 deficiency on tolerance to ischemia-reperfusion injury and preconditioning protection. *Basic Res Cardiol* **108**: 351.
- Sánchez,J.A., Rodríguez-Sinovas,A., Fernandez-Sanz,C., Ruiz-Meana,M., and García-Dorado,D. (2011) Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**: H2442-H2453.
- Sangawa,K., Nakanishi,K., Ishino,K., Inoue,M., Kawada,M., and Sano,S. (2004) Atrial natriuretic peptide protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Ann. Thorac. Surg.* **77**: 233-237.

- Sanggaard,K.W., Dyrlund,T.F., Thomsen,L.R., Nielsen,T.A., Brondum,L., Wang,T. et al. (2015) Characterization of the gila monster (*Heloderma suspectum suspectum*) venom proteome. *J Proteomics*. **117**: 1-11.
- Sarti,P., Arese,M., Forte,E., Giuffre,A., and Mastronicola,D. (2012) Mitochondria and nitric oxide: chemistry and pathophysiology. *Adv. Exp. Med Biol* **942**: 75-92.
- Saxena,P., Newman,M.A., Shehatha,J.S., Redington,A.N., and Konstantinov,I.E. (2010) Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application. *J Card Surg*. **25**: 127-134.
- Schafer,C., Ladilov,Y., Inserte,J., Schafer,M., Haffner,S., García-Dorado,D., and Piper,H.M. (2001) Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* **51**: 241-250.
- Schlack,W., Preckel,B., Barthel,H., Obal,D., and Thamer,V. (1997) Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br. J Anaesth*. **79**: 88-96.
- Schlack,W., Uebing,A., Schafer,M., Bier,F., Schafer,S., Piper,H.M., and Thamer,V. (1994) Regional contractile blockade at the onset of reperfusion reduces infarct size in the dog heart. *Pflugers Arch*. **428**: 134-141.
- Schmidt,M.R., Pryds,K., and Botker,H.E. (2014a) Novel adjunctive treatments of myocardial infarction. *World J Cardiol* **6**: 434-443.
- Schmidt,M.R., Smerup,M., Konstantinov,I.E., Shimizu,M., Li,J., Cheung,M. et al. (2007) Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: H1883-H1890.
- Schmidt,M.R., Stottrup,N.B., Contractor,H., Hyldebrandt,J.A., Johannsen,M., Pedersen,C.M. et al. (2014b) Remote ischemic preconditioning with--but not without--metabolic support protects the neonatal porcine heart against ischemia-reperfusion injury. *Int. J Cardiol* **170**: 388-393.
- Scholz,W., Albus,U., Counillon,L., Gogelein,H., Lang,H.J., Linz,W. et al. (1995) Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **29**: 260-268.
- Schulz,R., Cohen,M.V., Behrends,M., Downey,J.M., and Heusch,G. (2001) Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* **52**: 181-198.
- Schulz,R., Gorge,P.M., Gorbe,A., Ferdinandy,P., Lampe,P.D., and Leybaert,L. (2015) Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacol. Ther.* **153**: 90-106.
- Seidler,N.W., Jona,I., Vegh,M., and Martonosi,A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. **264**: 17816-17823.
- Seidlmayer,L.K., Juettner,V.V., Kettlewell,S., Pavlov,E.V., Blatter,L.A., and Dedkova,E.N. (2015) Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc Res* **106**: 237-248.
- Selker,H.P., Beshansky,J.R., Sheehan,P.R., Massaro,J.M., Griffith,J.L., D'Agostino,R.B. et al. (2012) Out-of-hospital administration of intravenous glucose-insulin-potassium in patients with suspected acute coronary syndromes: the IMMEDIATE randomized controlled trial. *JAMA* **307**: 1925-1933.

BIBLIOGRAFÍA

- Selker,H.P., Udelson,J.E., Massaro,J.M., Ruthazer,R., D'Agostino,R.B., Griffith,J.L. et al. (2014) One-year outcomes of out-of-hospital administration of intravenous glucose, insulin, and potassium (GIK) in patients with suspected acute coronary syndromes (from the IMMEDIATE [Immediate Myocardial Metabolic Enhancement During Initial Assessment and Treatment in Emergency Care] Trial). *Am J Cardiol* **113**: 1599-1605.
- Seufert,J. and Gallwitz,B. (2014) The extra-pancreatic effects of GLP-1 receptor agonists: a focus on the cardiovascular, gastrointestinal and central nervous systems. *Diabetes Obes. Metab* **16**: 673-688.
- Severs,N.J. (1990) The cardiac gap junction and intercalated disc. *Int. J Cardiol* **26**: 137-173.
- Severs,N.J., Coppen,S.R., Dupont,E., Yeh,H.I., Ko,Y.S., and Matsushita,T. (2004) Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* **62**: 368-377.
- Shanmuganathan,S., Hausenloy,D.J., Duchon,M.R., and Yellon,D.M. (2005) Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H237-H242.
- Sharov,V.G., Todor,A., Khanal,S., Imai,M., and Sabbah,H.N. (2007) Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **42**: 150-158.
- Sheiban,I., Tonni,S., Chizzoni,A., Marini,A., and Trevi,G. (1997) Recovery of left ventricular function following early reperfusion in acute myocardial infarction: a potential role for the calcium antagonist nisoldipine. *Cardiovasc Drugs Ther.* **11**: 5-16.
- Sheth,H., Hafez,T., Glantzounis,G.K., Seifalian,A.M., Fuller,B., and Davidson,B.R. (2011) Glycine maintains mitochondrial activity and bile composition following warm liver ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol. Hepatol* **26**: 194-200.
- Shimizu,M., Tropak,M., Diaz,R.J., Suto,F., Surendra,H., Kuzmin,E. et al. (2009) Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* **117**: 191-200.
- Shiva,S., Sack,M.N., Greer,J.J., Duranski,M., Ringwood,L.A., Burwell,L. et al. (2007) Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp. Med* **204**: 2089-2102.
- Siegmund,B., Kliezt,T., Schwartz,P., and Piper,H.M. (1991) Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* **260**: H426-H435.
- Siegmund,B., Schlack,W., Ladilov,Y.V., Balsler,C., and Piper,H.M. (1997) Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* **96**: 4372-4379.
- Siegmund,B., Zude,R., and Piper,H.M. (1992) Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload. *Am J Physiol* **263**: H1262-H1269.
- Singh,R.B. and Dhalla,N.S. (2010) Ischemia-reperfusion-induced changes in sarcolemmal Na⁺/K⁺-ATPase are due to the activation of calpain in the heart. *Can. J Physiol Pharmacol.* **88**: 388-397.
- Sivaraman,V., Pickard,J.M., and Hausenloy,D.J. (2015) Remote ischaemic conditioning: cardiac protection from afar. *Anaesthesia* **70**: 732-748.
- Skyschally,A., Schulz,R., and Heusch,G. (2010) Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther.* **24**: 85-87.

- Sloth,A.D., Schmidt,M.R., Munk,K., Kharbanda,R.K., Redington,A.N., Schmidt,M. et al. (2014) Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J* **35**: 168-175.
- Sodi-Pallares,D., Bisteni,A., Medrano,G.A., Testelli,M.R., and De Micheli,A. (1963) The polarizing treatment of acute myocardial infarction. Possibility of its use in other cardiovascular conditions. *Dis. Chest* **43**: 424-432.
- Sodi-Pallares,D., Testelli,M.R., Fishleder,B.L., Bisteni,A., Medrano,G.A., Friedland,C., and De Micheli,A. (1962) Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report. *Am J Cardiol* **9**: 166-181.
- Solan,J.L. and Lampe,P.D. (2009) Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem. J* **419**: 261-272.
- Sommer,S.P., Sommer,S., Sinha,B., and Leyh,R.G. (2012) Glycine preconditioning to ameliorate pulmonary ischemia reperfusion injury in rats. *Interact. Cardiovasc Thorac. Surg.* **14**: 521-525.
- Staat,P., Rioufol,G., Piot,C., Cottin,Y., Cung,T.T., L'Huillier,I. et al. (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**: 2143-2148.
- Steensrud,T., Li,J., Dai,X., Manlihot,C., Kharbanda,R.K., Tropak,M., and Redington,A. (2010) Pretreatment with the nitric oxide donor SNAP or nerve transection blocks humoral preconditioning by remote limb ischemia or intra-arterial adenosine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H1598-H1603.
- Stewart,S., Lesnefsky,E.J., and Chen,Q. (2009) Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl. Res* **153**: 224-231.
- Stromer,H., de Groot,M.C., Horn,M., Faul,C., Leupold,A., Morgan,J.P. et al. (2000) Na(+)/H(+) exchange inhibition with HOE642 improves postischemic recovery due to attenuation of Ca(2+) overload and prolonged acidosis on reperfusion. *Circulation* **101**: 2749-2755.
- Sun,B., Qi,X., and Jiang,J. (2014) Heptanol decreases the incidence of ischemia-induced ventricular arrhythmias through altering electrophysiological properties and connexin 43 in rat hearts. *Biomed. Rep.* **2**: 349-353.
- Szabo,I. and Zoratti,M. (1991) The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem.* **266**: 3376-3379.
- Szczepanek,K., Xu,A., Hu,Y., Thompson,J., He,J., Lerner,A.C. et al. (2015) Cardioprotective function of mitochondrial-targeted and transcriptionally inactive STAT3 against ischemia and reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* **110**: 53.
- Taggart,P. and Yellon,D.M. (2002) Preconditioning and arrhythmias. *Circulation* **106**: 2999-3001.
- Takahashi,N., Hayano,T., and Suzuki,M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**: 473-475.
- Takeshita,D., Tanaka,M., Mitsuyama,S., Yoshikawa,Y., Zhang,G.X., Obata,K. et al. (2013) A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia-reperfusion in in situ rat hearts. *J Physiol Sci* **63**: 113-123.

BIBLIOGRAFÍA

Tanaka,K., Kersten,J.R., and Riess,M.L. (2014) Opioid-induced cardioprotection. *Curr Pharm. Des* **20**: 5696-5705.

Tani,M., Hasegawa,H., Suganuma,Y., Shinmura,K., Kayashi,Y., and Nakamura,Y. (1996) Protection of ischemic myocardium by inhibition of contracture in isolated rat heart. *Am J Physiol* **271**: H2515-H2519.

Tasyurek,H.M., Altunbas,H.A., Balci,M.K., and Sanlioglu,S. (2014) Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* **30**: 354-371.

ten Hove,M., van Emous,J.G., and van Echteld,C.J. (2003) Na⁺ overload during ischemia and reperfusion in rat hearts: comparison of the Na⁺/H⁺ exchange blockers EIPA, cariporide and eniporide. *Mol Cell Biochem.* **250**: 47-54.

Teoh,L.K., Grant,R., Hulf,J.A., Pugsley,W.B., and Yellon,D.M. (2002) The effect of preconditioning (ischemic and pharmacological) on myocardial necrosis following coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Res* **53**: 175-180.

Thandroyen,F.T., McCarthy,J., Burton,K.P., and Opie,L.H. (1988) Ryanodine and caffeine prevent ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia and reperfusion in rat heart. *Circ Res* **62**: 306-314.

Theroux,P., Chaitman,B.R., Danchin,N., Erhardt,L., Meinertz,T., Schroeder,J.S. et al. (2000) Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation* **102**: 3032-3038.

Theroux,P., Gregoire,J., Chin,C., Pelletier,G., de Guise,P., and Juneau,M. (1998) Intravenous diltiazem in acute myocardial infarction. Diltiazem as adjunctive therapy to activate (DATA) trial. *J Am Coll. Cardiol* **32**: 620-628.

Thibault,H., Piot,C., Staat,P., Bontemps,L., Sportouch,C., Rioufol,G. et al. (2008) Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* **117**: 1037-1044.

Thielmann,M., Kottenberg,E., Kleinbongard,P., Wendt,D., Gedik,N., Pasa,S. et al. (2013) Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* **382**: 597-604.

Thompson-Gorman,S.L. and Zweier,J.L. (1990) Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem.* **265**: 6656-6663.

Timmer,J.R., Svilaas,T., Ottervanger,J.P., Henriques,J.P., Dambrink,J.H., van den Broek,S.A. et al. (2006) Glucose-insulin-potassium infusion in patients with acute myocardial infarction without signs of heart failure: the Glucose-Insulin-Potassium Study (GIPS)-II. *J Am Coll. Cardiol* **47**: 1730-1731.

Timmer,J.R., van,d.H., I, Ottervanger,J.P., De Luca,G., 't Hof,A.W., Biló,H.J., and Zijlstra,F. (2004) Glucose-insulin-potassium infusion as adjunctive therapy in myocardial infarction: current evidence and potential mechanisms. *Ital. Heart J* **5**: 727-731.

Timmers,L., Henriques,J.P., de Kleijn,D.P., Devries,J.H., Kemperman,H., Steendijk,P. et al. (2009) Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll. Cardiol* **53**: 501-510.

Toth,A., Kiss,L., Varro,A., and Nanasi,P.P. (2009) Potential therapeutic effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases. *Curr Med Chem.* **16**: 3294-3321.

- Touret,N., Tanneur,V., Godart,H., Seidler,R., Taki,N., Burger,E. et al. (2003) Characterization of sabiporide, a new specific NHE-1 inhibitor exhibiting slow dissociation kinetics and cardioprotective effects. *Eur. J Pharmacol.* **459**: 151-158.
- Tsujita,K., Shimomura,H., Kawano,H., Hokamaki,J., Fukuda,M., Yamashita,T. et al. (2004) Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **94**: 481-484.
- Ussher,J.R., Baggio,L.L., Campbell,J.E., Mulvihill,E.E., Kim,M., Kabir,M.G. et al. (2014) Inactivation of the cardiomyocyte glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) unmasks cardiomyocyte-independent GLP-1R-mediated cardioprotection. *Mol Metab* **3**: 507-517.
- Ussher,J.R. and Drucker,D.J. (2012) Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr. Rev* **33**: 187-215.
- Valls-Lacalle,L., Barba,I., Miro-Casas,E., Albuquerque-Béjar,J.J., Ruiz-Meana,M., Fuertes-Agudo,M. et al. (2016) Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* **109**: 374-384.
- van Borren,M.M., Baartscheer,A., Wilders,R., and Ravesloot,J.H. (2004) NHE-1 and NBC during pseudo-ischemia/reperfusion in rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 567-577.
- Van de Werf,F. (2014) The history of coronary reperfusion. *Eur. Heart J* **35**: 2510-2515.
- van der Horst,I. and Zijlstra,F. (2005) Potential beneficial mechanisms of insulin (glucose-potassium) in acute myocardial infarction. *Neth. Heart J* **13**: 233-238.
- van der Horst,I., Zijlstra,F., 't Hof,A.W., Doggen,C.J., de Boer,M.J., Suryapranata,H. et al. (2003) Glucose-insulin-potassium infusion in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction: the glucose-insulin-potassium study: a randomized trial. *J Am Coll. Cardiol* **42**: 784-791.
- van Domburg,R.T., Sonnenschein,K., Nieuwlaat,R., Kamp,O., Storm,C.J., Bax,J.J., and Simoons,M.L. (2005) Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *J Am Coll. Cardiol* **46**: 15-20.
- van Jaarsveld,H., Kuyl,J.M., Alberts,D.W., and Wiid,M.N. (1994) Antioxidant supplementation partially protects against myocardial mitochondrial ischemia/reperfusion injury, but ascorbate in the perfusate prevented the beneficial effect. *Res Commun. Mol Pathol. Pharmacol.* **85**: 33-44.
- Vander Heide,R.S. and Steenbergen,C. (2013) Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application. *Circ Res* **113**: 464-477.
- Viola,H.M., Macdonald,W.A., Tang,H., and Hool,L.C. (2009) The L-type Ca(2+) channel as a therapeutic target in heart disease. *Curr Med Chem.* **16**: 3341-3358.
- Visscher,M.B. and Muller,E.A. (1927) The influence of insulin upon the mammalian heart. *J Physiol* **62**: 341-348.
- Wang,N., De Vuyst,E., Ponsaerts,R., Boengler,K., Palacios-Prado,N., Wauman,J. et al. (2013) Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* **108**: 309.
- Wang,P. and Heitman,J. (2005) The cyclophilins. *Genome Biol* **6**: 226.

BIBLIOGRAFÍA

- Wang,P. and Zweier,J.L. (1996) Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the posts ischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem.* **271**: 29223-29230.
- Wei,Y. and Mojssov,S. (1995) Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* **358**: 219-224.
- Weiss,J.N., Korge,P., Honda,H.M., and Ping,P. (2003) Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* **93**: 292-301.
- White,S.K., Frohlich,G.M., Sado,D.M., Maestrini,V., Fontana,M., Treibel,T.A. et al. (2015) Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* **8**: 178-188.
- Wong,V.W., Mardini,M., Cheung,N.W., and Mihailidou,A.S. (2011) High-dose insulin in experimental myocardial infarction in rabbits: protection against effects of hyperglycaemia. *J Diabetes Complications* **25**: 122-128.
- Woo,J.S., Kim,W., Ha,S.J., Kim,J.B., Kim,S.J., Kim,W.S. et al. (2013) Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in revascularization study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **33**: 2252-2260.
- Woods,K.L., Fletcher,S., Roffe,C., and Haider,Y. (1992) Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: results of the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2). *Lancet* **339**: 1553-1558.
- Xin,P., Zhu,W., Li,J., Ma,S., Wang,L., Liu,M. et al. (2010) Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**: H1819-H1831.
- Xu,A., Szczepanek,K., Maceyka,M.W., Ross,T., Bowler,E., Hu,Y. et al. (2014) Transient complex I inhibition at the onset of reperfusion by extracellular acidification decreases cardiac injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**: C1142-C1153.
- Yamada,K., Matsui,K., Yamamoto,S., Kitano,M., and Ohashi,N. (2002) Effect of an Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, SM-20550, on ischemic preconditioning in rabbits. *Int. J Tissue React.* **24**: 1-10.
- Yamasaki,K., Fujiwara,H., Tanaka,M., Yokota,R., Miyamae,M., Ogawa,J. et al. (1997) Preconditioning with 15-minute ischemia extends myocardial infarct size after subsequent 30-minute ischemia in rabbits. *Jpn. Circ J* **61**: 344-352.
- Yang,M., Camara,A.K., Wakim,B.T., Zhou,Y., Gadicherla,A.K., Kwok,W.M., and Stowe,D.F. (2012) Tyrosine nitration of voltage-dependent anion channels in cardiac ischemia-reperfusion: reduction by peroxynitrite scavenging. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**: 2049-2059.
- Yang,Y., Sun,Y., Yi,W., Li,Y., Fan,C., Xin,Z. et al. (2014) A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. *J Pineal Res* **57**: 357-366.
- Ye,Y., Li,J., and Yuan,Z. (2013) Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS. One.* **8**: e56803.
- Yellon,D.M. and Downey,J.M. (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**: 1113-1151.

- Yellon,D.M. and Hausenloy,D.J. (2007) Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J Med* **357**: 1121-1135.
- Yoshikawa,Y., Zhang,G.X., Obata,K., Ohga,Y., Matsuyoshi,H., Taniguchi,S., and Takaki,M. (2010) Cardioprotective effects of a novel calpain inhibitor SNJ-1945 for reperfusion injury after cardioplegic cardiac arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**: H643-H651.
- Zeymer,U., Suryapranata,H., Monassier,J.P., Opolski,G., Davies,J., Rasmanis,G. et al. (2001) The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll. Cardiol* **38**: 1644-1650.
- Zhang,H.X., Zang,Y.M., Huo,J.H., Liang,S.J., Zhang,H.F., Wang,Y.M. et al. (2006a) Physiologically tolerable insulin reduces myocardial injury and improves cardiac functional recovery in myocardial ischemic/reperfused dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. **48**: 306-313.
- Zhang,Z., Biesiadecki,B.J., and Jin,J.P. (2006b) Selective deletion of the NH2-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage. *Biochemistry* **45**: 11681-11694.
- Zhao,Z.Q., Corvera,J.S., Halkos,M.E., Kerendi,F., Wang,N.P., Guyton,R.A., and Vinten-Johansen,J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H579-H588.
- Zhou,R.H., Long,C., Liu,J., and Liu,B. (2008) Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger protects the immature rabbit myocardium from ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Cardiol* **29**: 113-120.
- Zhu,P., Lu,L., Xu,Y., Greyson,C., and Schwartz,G.G. (2000) Glucose-insulin-potassium preserves systolic and diastolic function in ischemia and reperfusion in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H595-H603.
- Zhu,S.B., Liu,Y., Zhu,Y., Yin,G.L., Wang,R.P., Zhang,Y. et al. (2013) Remote preconditioning, perconditioning, and postconditioning: a comparative study of their cardio-protective properties in rat models. *Clinics. (Sao Paulo)* **68**: 263-268.
- Zierler,K., Rogus,E.M., Scherer,R.W., and Wu,F.S. (1985) Insulin action on membrane potential and glucose uptake: effects of high potassium. *Am J Physiol* **249**: E17-E25.