

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA**



**CARDIOPROTECCION POR DEXMEDETOMIDINA
EN LA ISQUEMIA Y REPERFUSION MIOCARDICA**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACOLOGÍA
POR**

MAURICIO IBACACHE FIGUEROA

Dra. Gina Sánchez V.
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Sergio Lavandero G.
Centro Estudios Moleculares de la Célula
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Directores de Tesis

2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

MAURICIO ENRIQUE IBACACHE FIGUEROA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____.

Directores de Tesis:

Dra. Gina Sánchez V. _____

Dr. Sergio Lavandero G. _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Ramón Rodrigo (Presidente) _____

Dra. Paulina Donoso _____

Dra. Ilona Concha _____

Dr. Mauricio Boric _____

*“una profunda pena en mi corazón,
vino el amor..... y me salvo la vida”*

*Dedicada a mi amada esposa
y a mis maravillosos hijos.*

PUBLICACIONES

- **Ibacache M**, Pedrozo Z, Fernández C, Sánchez G, Lavandero S. Infarto perioperatorio en cirugía no-cardíaca y dexmedetomidina. Rev Chil Cardiol 2010; 29: 100-116.
- **Ibacache M**, Pedrozo Z, Echevarria G, Duaso J, Hassi M, Sanchez G , Lavandero S. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in the heart. BBA - Molecular Basis of Disease (en revisión, 2011).
- Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, **Ibacache M**, Criollo A, Nemchenko A, Hill JA, Lavandero S. Cardiomyocyte death: Mechanisms and translational implications. Cell Death Dis (en prensa, 2012).

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- **Ibacache M**, Pedrozo Z, Sánchez G, Lavandero S. Cardioprotección por dexmedetomidina en la isquemia y reperfusión miocárdica. XXXVIII Congreso Chileno de Anestesiología. Puerto Varas, Octubre 2010. Rev Chil Anest 2010; 39: 231.
- **Ibacache M**, Pedrozo Z, Sánchez G, Lavandero S. Cardioprotección por dexmedetomidina en eventos de isquemia y reperfusión miocárdica. XLVII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Santiago, Diciembre 2010. Premio Abbot al mejor trabajo de hemodinamia.
- **Ibacache M**. Precondicionamiento por dexmedetomidina. XXXIX Congreso Chileno de Anestesiología. Santiago, Mayo 2011.

FINANCIAMIENTO

El trabajo de esta tesis se financió por los Proyectos FONDAP 15010006 (S.L.) y FONDECYT 1080497 (G.S.).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los que han hecho posible el desarrollo y término de esta tesis.

En primer lugar, mi más sincero reconocimiento al Profesor Sergio Lavandero, por creer en este proyecto y confiar en mí para su realización. Por su preocupación, dedicación, consejos sabios y oportunos, por enseñarme parte de su visión optimista del trabajo en equipo, su incansable energía, gran sentido de la responsabilidad y profunda pasión por el trabajo científico y académico; todas virtudes que han constituido una verdadera y potente motivación en esta etapa de aprendizaje.

A la Dra. Gina Sánchez, por su mirada científica aguda y crítica, porque su experiencia, sabiduría y dedicación hicieron que el trabajo en el laboratorio fuese un aprendizaje constante, fundamental, cercano y agradable, por su gran resiliencia y capacidad de motivación y porque en resumen, nada en esta tesis habría sido posible sin su invaluable y desinteresada ayuda.

A los profesores de mi Comisión Informante de Tesis: Ramón Rodrigo, Ilona Concha, Paulina Donoso y Mauricio Boric, por la excelente disposición a compartir conmigo sus experiencias e impresiones y por haber hecho de este proceso una real experiencia académica y pedagógica.

A Guillermo Arce y Rodrigo Durán, porque siempre han estado dispuestos a ayudarme durante esas largas y a veces tediosas jornadas de trabajo, y con quienes he compartido alegrías y afortunadamente no tantas penas.

A los amigos científicos que comparten la pasión por encontrar respuestas a los fenómenos biológicos que nos rodean y que han aportado de una u otra forma a este estudio.....algunos con su trabajo, algunos con un consejo, una opinión, una enseñanza.....en especial a Zully Pedrozo, Juan Duaso, Lorena García, Mario Chiong,

Carolina Fernández, Mario Hassi, Ramiro Zepeda, Juan Pablo Muñoz y Rodrigo Troncoso, quienes me han acompañado y ayudado en este proceso.

Una mención especial de agradecimiento para Fidel Albornoz, por toda su cooperación, preocupación y dedicación al trabajo.

A mis padres por el regalo de la vida y su infinito amor.

A mis hermanos Javier y Rodrigo.

A mis colegas anestesiólogos y todos los que trabajan en la División de Anestesiología de la Pontificia Universidad Católica, que me han motivado y facilitado las cosas durante estos años.

Finalmente, a mis hermosos hijos en cuyos ojos me recreo y a mi esposa Marcela, quien comparte conmigo la aventura de la vida y me soporta con todo lo que ello implica.

ÍNDICE GENERAL

	Página
PUBLICACIONES.....	iii
PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares.....	1
1.2. Enfermedad coronaria.....	1
1.3. Isquemia versus infarto del miocardio.....	3
1.4. Daño por isquemia y reperfusión.....	4
1.5. Cardioprotección.....	7
1.5.1. Precondicionamiento y postcondicionamiento isquémico.....	8
1.5.2. Precondicionamiento y postcondicionamiento farmacológico.....	11
1.6. Morbimortalidad cardiovascular perioperatoria.....	13
1.7. Cardioprotección perioperatoria.....	14
1.8. Dexmedetomidina.....	15
1.9. Receptores α_2 -adrenérgicos miocárdicos.....	17
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS GENERALES.....	19

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1. Reactivos.....	20
5.2. Animales y procedimientos quirúrgicos.....	21
5.3. Protocolos experimentales.....	23
5.4. Medición de tamaños de infarto y área de riesgo de infarto.....	26
5.5. Medición de la función del ventrículo izquierdo.....	26
5.6. Obtención y cultivo de cardiomiocitos.....	27
5.7. Obtención de homogenizados de tejidos y células.....	27
5.8. Determinación de proteínas por método de Lowry.....	28
5.9. Análisis de Western blot.....	28
5.10. Inmunohistoquímica.....	29
5.11. Análisis estadístico.....	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1. Activación de la vía transduccional RISK en la cardioprotección mediada por dexmedetomidina.....	31
6.2. Dexmedetomidina reduce el tamaño de infarto en modelos animales <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> de isquemia y reperfusión miocárdica regional.....	33
6.3. Dexmedetomidina mejora la función ventricular frente a eventos de isquemia y reperfusión miocárdica.....	35
6.4. Rol de PI3K en el preconditionamiento inducido por dexmedetomidina.....	37
6.5. Detección de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón de rata.....	37
7. DISCUSIÓN.....	41
7.1. Cardioprotección inducida por dexmedetomidina.....	41
7.2. Activación de la vía RISK por dexmedetomidina.....	43

7.3. Rol del receptor α_2 -adrenérgico en la cardioprotección inducida por dexmedetomidina.....	45
7.4. Mecanismo asociado a la cardioprotección inducida por dexmedetomidina.....	47
7.5. Otros probables mecanismos de cardioprotección inducidos por dexmedetomidina.....	49
7.6. Limitaciones del estudio.....	52
8. CONCLUSIONES.....	54
9. REFERENCIAS.....	55
10. ANEXOS.....	67
10.1. Precondicionamiento con xilazina.....	67

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Hipótesis del daño producido por isquemia y reperfusión.....	7
Figura 2. Vía transduccional RISK.....	13
Figura 3. Protocolo experimental de modelos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	25
Figura 4. Dexmedetomidina estimula la fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS, la que es prevenida por la adición de YOH.....	32
Figura 5. Dexmedetomidina disminuye los tamaños de infarto frente a eventos de I/R regional en el modelo <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	34
Figura 6. Dexmedetomidina mejora la función ventricular frente a eventos de I/R.....	36
Figura 7. Localización de subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en tejidos de rata...	38
Tabla 1. Distribución diferencial de los distintos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón.....	39
Figura 8. Caracterización de los receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón.....	40
Figura 9. Vía transduccional RISK y dexmedetomidina.....	49

RESUMEN

En Chile, la patología cardiovascular tiene una elevada prevalencia y constituye la primera causa de muerte del país. Esta realidad ha provocado un aumento significativo de la morbimortalidad perioperatoria, por lo que se recomienda el uso de fármacos cardioprotectores (bloqueadores β -adrenérgicos, estatinas y agonistas α_2 -adrenérgicos) durante este período.

La dexmedetomidina (DEX) es un agonista α_2 -adrenérgico de uso frecuente en anestesia, con potenciales efectos cardioprotectores. Recientemente, se ha sugerido que produciría un preconditionamiento isquémico al estimular receptores α_2 -adrenérgicos postsinápticos. Sin embargo, hasta este momento se desconocen los mecanismos moleculares asociados a la potencial cardioprotección inducida por dexmedetomidina.

Para responder a esta interrogante, se utilizó un modelo *in vivo* y un modelo *ex vivo* de ratas Sprague Dawley, machos, cuyos corazones se sometieron a 30 min de isquemia miocárdica regional y 120 min de reperfusión. Se determinaron los niveles de fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS, previo a la isquemia y los tamaños de infartos y la recuperación de la función ventricular, al final del periodo de reperfusión. Se estudió la relación entre la activación de kinasas de sobrevida y el efecto preconditionante del fármaco, mediante la inhibición de PI3K. Finalmente, se determinó la presencia y localización de los potenciales subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos involucrados en la cardioprotección inducida por DEX. Los resultados mostraron que en ambos modelos, el preconditionamiento con DEX aumentó significativamente los niveles de fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS, previo a la I/R y redujo significativamente los tamaños de infarto en el área de riesgo, propiciando una mejor recuperación de la función ventricular, al término de la reperfusión. La administración de yohimbina y la inhibición de PI3K, revirtieron la reducción de los tamaños de infarto y la recuperación de la función ventricular inducida por DEX. Además, se demostró la

existencia de receptores α_2 -adrenérgicos en los cardiomiocitos. Los resultados sugieren que el preconditionamiento con DEX produce cardioprotección frente a eventos de isquemia y reperfusión miocárdica regional, muy probablemente al producir activación de la kinasas relacionadas con sobrevida, posterior al estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos ubicados en los cardiomiocitos. Estos hallazgos pueden ser relevantes en el manejo anestésico del perioperatorio de pacientes de alto riesgo cardiovascular.

SUMMARY

In Chile, cardiovascular disease is highly prevalent and is the leading cause of death in the country. This fact has caused a significant increase in perioperative cardiovascular morbidity and mortality; therefore, the use of cardioprotective drugs (β -adrenergic blockers, statins and α_2 -adrenergic agonists) during the perioperative period is recommended.

Dexmedetomidine (DEX) is an α_2 -adrenergic agonist commonly used in anesthesia, with potential cardioprotective effects. Recently, it has been suggested that DEX produces ischemic preconditioning by means of postsynaptic α_2 -adrenergic receptors stimulation. However, molecular mechanisms associated with the potential cardioprotection induced by dexmedetomidine still remains unknown.

In order to answer this question, an *in vivo* and an *ex vivo* models of male Sprague Dawley rats, whose hearts were subjected to 30 min regional myocardial ischemia and 120 min of reperfusion, were developed. Levels The phosphorylated levels of ERK1/2, Akt and eNOS before ischemia and infarct size and ventricular function recovery at the end of reperfusion period, were determined. The relationship between activation of survival kinases and preconditioning effect of the drug, it was studied by specific PI3K inhibition. Finally, we investigated the presence and location of α_2 -adrenergic receptor subtypes potentially involved in DEX induced cardioprotection. The results showed that in both models DEX preconditioning significantly increased the phosphorylated levels of ERK 1/2, Akt and eNOS, prior to the I/R and significantly reduce infarct size in the area of risk, leading to a better ventricular function recovery at the end of reperfusion. The administration of yohimbine and PI3K inhibition, reversed the reduction of infarct size and ventricular function recovery induced by DEX. Furthermore, the existence of α_2 -adrenergic receptors in cardiomyocytes, was demonstrated. The results suggest that DEX preconditioning produces cardioprotection against regional myocardial ischemia and

reperfusion events, by means of survival kinases activation after stimulation of α_2 -adrenergic receptors located in cardiomyocytes. These findings may be relevant in the perioperative anesthetic management of patients at high cardiovascular risk.

ABREVIATURAS

ACDA	: Arteria coronaria descendente anterior
ADP	: Adenosina difosfato
AI	: Área de infarto
Akt	: Proteína kinasa B
AMP	: Adenosina monofosfato
AR	: Área de riesgo de infarto
ATP	: Adenosina trifosfato
BSA	: Seroábumina de bovino
CKMB	: Creatina kinasa isoenzima MB
DEX	: Dexmedetomidina
DMEM	: Medio Dulbecco modificado de Eagle
DTT	: Ditioneitol
eNOS	: Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK1/2	: Proteína kinasa regulada extracelularmente 1/2
EROs	: Especies reactivas derivadas del oxígeno
FC	: Frecuencia cardiaca
FBS	: Suero fetal bovino
HEPES	: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
iNOS	: Sintasa de óxido nítrico inducible
I/R	: Isquemia y reperfusión
IV	: Intravenoso
LDH	: Láctico deshidrogenasa
LDL	: Lipoproteína de baja densidad
LDLox	: Lipoproteína de baja densidad oxidada

LY	: LY 294002
PTPM	: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
mKATP	: Canal de potasio mitocondrial dependiente de ATP
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADH+	: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NO	: Óxido nítrico
PCI	: Precondicionamiento isquémico
PCF	: Precondicionamiento farmacológico
PDFVI	: Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
PDVI	: Presión desarrollada por ventrículo izquierdo
PKC	: Proteína kinasa C
PKG	: Proteína kinasa dependiente de cGMP
PMSF	: Fenilmetanosulfonil floruro
PostCI	: Postcondicionamiento isquémico
PostCF	: Postcondicionamiento farmacológico
PP	: Presión de perfusión
PSVI	: Presión sistólica del ventrículo izquierdo
RAPG	: Receptor asociado a proteína G
RISK	: Reperfusion Injury Salvage Kinases
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SNA	: Sistema nervioso autónomo
VI	: Ventrículo izquierdo
YOH	: Yohimbina
+dP/dt _{max}	: pico positivo máximo de la derivada de la presión ventricular izquierda
-dP/dt _{min}	: pico negativo mínimo de la derivada de la presión ventricular izquierda

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares

De acuerdo con la teoría de la transición demográfico-epidemiológica de países en desarrollo, Chile está cursando una etapa caracterizada por un predominio de enfermedades crónicas no transmisibles y un marcado aumento de la mortalidad por causas cardiovasculares (1-3). En nuestro país, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y corresponden aproximadamente al 27% de las muertes totales (4). La enfermedad coronaria corresponde al 36% de las muertes de causa circulatoria y es causa de muerte en aproximadamente el 8% de la población chilena (4,5). Como consecuencia del aumento de la prevalencia de factores de riesgo asociados a la enfermedad cardiovascular en los menores de 50 años y al acelerado envejecimiento de la población, es probable que en el futuro la morbimortalidad cerebrovascular y coronaria aumente o al menos se mantenga (6-10).

1.2. Enfermedad coronaria

La angina de pecho estable o inestable y el infarto agudo del miocardio son las expresiones clínicas más frecuentes de la enfermedad coronaria. La angina corresponde a eventos isquémicos de duración variable, no asociadas a daño miocárdico (11,12). El infarto del miocardio implica daño y muerte de cardiomiocitos y ocurre cuando la irrigación de los tejidos es interrumpida definitivamente o por un período suficientemente largo como para gatillar fenómenos irreversibles de muerte celular (13,14). La enfermedad coronaria es el reflejo de la presencia de aterosclerosis en las arterias coronarias (15). La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la

acumulación de lípidos en las paredes arteriales en forma de placas de ateroma, localizadas o difusas (16,17). Esta última patología implica procesos de disfunción endotelial, inflamación, proliferación vascular y alteraciones de la matriz extracelular. La disfunción endotelial pareciera ser la alteración más precoz de la pared vascular, caracterizada por una disminución en la producción y disponibilidad de óxido nítrico (NO). El NO es un importante vasodilatador que además disminuye la oxidación de LDL y la proliferación de células musculares lisas (18). Entre los factores responsables de esta disfunción, se encuentran los elevados niveles de LDL y LDLox, especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs) y/o especies reactivas derivadas de nitrógeno (17-19). En presencia de hipercolesterolemia, las LDL se retienen en la pared arterial, por una fuerte adhesión a los proteoglicanos presentes en la íntima (20). En esta situación, las LDLs se oxidan fácilmente, aumentando su aterogenicidad (21). La expresión de diferentes moléculas inflamatorias y de adhesión en la placa, estimula la migración de leucocitos, en particular de monocitos, al subendotelio de la pared arterial (22-25). Después de adherirse e infiltrar al endotelio los monocitos se transforman en macrófagos y fagocitan las LDLox, por las que tienen mayor afinidad que las LDL nativas (26). Los macrófagos captan las LDLox y se transforman en células espumosas que engrosan la placa de ateroma en la pared vascular. En esta etapa, la lesión ateromatosa contiene células espumosas en el sub-endotelio, linfocitos T, depósitos de matriz extracelular y células musculares lisas que migran desde la capa media a la íntima (27,28). También, ocurre activación y adhesión de plaquetas y leucocitos a la superficie endotelial. Cuando la inflamación se mantiene, las células musculares lisas sintetizan nuevo colágeno para la reparación y mantención de la capa fibrosa, pero aumenta también la degradación de la matriz de colágeno por sobreexpresión y actividad de metaloproteasas (29). De esta manera, la capa fibrosa se debilita y es susceptible de romperse cuando es expuesta a tensiones continuas del flujo sanguíneo. La ruptura lleva al desarrollo de hemorragia

intraplaca, formación de trombos y oclusión de la arteria (30).

1.3. Isquemia versus infarto del miocardio

La isquemia miocárdica es producto de un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno y nutrientes, en un determinado territorio del corazón. Clínicamente se identifica a través de la historia referida por el paciente y por alteraciones electrocardiográficas específicas. Los síntomas incluyen combinaciones de dolor al pecho, mandíbula, extremidad superior izquierda, etc. Los cambios electrocardiográficos son expresión de alteraciones funcionales y moleculares que ocurren durante el desbalance aporte/demanda (11). Si la isquemia es limitada en el tiempo, al ser tratada o al resolverse en forma espontánea, se evitará el daño y la muerte de cardiomiocitos (31). La resolución de la isquemia implica obligatoriamente la introducción del concepto de reperfusión de los tejidos isquémicos. Actualmente, sabemos que las alteraciones moleculares generadas durante la reperfusión también producen daño celular (32-37). La sobrevivencia de los cardiomiocitos durante eventos isquémicos depende de los cambios moleculares generados durante la isquemia y la reperfusión miocárdica, especialmente de la capacidad del miocardio de gatillar vías moleculares de sobrevivencia celular (32-39).

Se entiende por infarto del miocardio a la ocurrencia de muerte de células cardíacas como consecuencia de una isquemia prolongada o no resuelta. Se acepta que si la isquemia se mantiene por sobre 20 min, es muy probable que el infarto se haga evidente a las pocas horas posterior a su inicio (40). Clínicamente, el diagnóstico se basa en una historia clínica compatible y elevación de enzimas cardíacas en el plasma. Las más usadas en el diagnóstico de infarto son la isoenzima B de la creatina kinasa (CKMB) y las troponinas (11,40). El tamaño del infarto dependerá de la cantidad de territorio isquémico,

la duración de la isquemia en los territorios afectados, la presencia de circulación colateral capaz de suplir la zona isquémica y de la capacidad del miocardio de generar una respuesta de sobrevida frente al daño (38-40).

1.4. Daño por isquemia y reperfusión

Los cardiomiocitos toleran periodos breves de isquemia sin producir su muerte; etapa que conocemos como la fase reversible de la isquemia. Sin embargo, en la fase irreversible, tiempos prolongados de isquemia producen un daño no recuperable y muerte del cardiomiocito (13,14). La isquemia reversible provoca diversos cambios en los cardiomiocitos, tales como: alteraciones de la contracción, disminución del ATP y del pool de nucleótidos, disminución del glicógeno, acumulación de lactato y H^+ y eventualmente edema intracelular. Estos cambios se revierten cuando el flujo coronario se restablece en los territorios isquémicos (26,36). Durante la isquemia, la ausencia de oxígeno o su escasa presencia en los tejidos, determina que el metabolismo aeróbico mitocondrial cese y se inicie un metabolismo anaeróbico glicolítico (14). La demanda energética del cardiomiocito supera la energía aportada por la glicólisis anaeróbica y las reservas energéticas. Posteriormente, la cantidad de ATP disminuye progresivamente y se acumula ADP (41). La acumulación de lactato y la disminución del pH intracelular por acumulación de H^+ , inhiben la glicólisis (42). La contracción miocárdica disminuye con cada sístole, hasta desaparecer del todo. Se produce además, una sobrecarga de osmolitos activos tales como: lactato, fosfato inorgánico y creatinina, que no se traduce inicialmente en una entrada excesiva de agua y edema celular, debido a la poca disponibilidad de agua en el extracelular (43). El exceso de ADP generado se degrada a AMP y éste, a su vez, en adenosina (44). La adenosina difunde al extracelular, perdiéndose cerca del 30-40% del pool de adenosina intracelular al final de la fase

reversible de isquemia (45). El Ca^{2+} libre intracelular se eleva en las etapas tardías de la fase reversible de la isquemia, provocando hipercontractura miocárdica (46-48). La isquemia provoca acidosis metabólica y activación del intercambiador Na^+/H^+ , transportando protones fuera de la célula y Na^+ hacia el interior (36,49). El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se activa, llevando Na^+ al extracelular y Ca^{2+} hacia el citosol (36,49,50). El Ca^{2+} también aumenta por depolarización del potencial de membrana, que permite la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L con una subsecuente mayor entrada de este electrolito (36). Proteínas como la superóxido dismutasa (51), “heat-shock protein” (52) y la iNOS (53), aumentan durante el periodo de isquemia y también durante la reperfusión. En la mitocondria, la ausencia de oxígeno aumenta los niveles de ácidos grasos no esterificados, como resultado del cese de su oxidación (54,55). La interrupción del ciclo de Krebs, permite la acumulación de NADH en el citoplasma, con un incremento de la relación NADH/NAD^+ . La disminución de la oxidación produce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, acompañado de la disminución de la actividad del transportador de Ca^{2+} mitocondrial. La sintasa de ATP empieza a funcionar como ATPasa y contribuye a la disminución del 50% del ATP durante la isquemia (56). Las actividades de los complejos I y III de la cadena respiratoria disminuye, generando EROs durante la isquemia (57,58). Durante la reperfusión, el tejido isquémico reperfundido desarrolla una hiperemia reactiva muy marcada. Así, durante los primeros minutos de la reperfusión se produce una gran cantidad de EROs, que alcanzan su máximo entre los 4 y 7 min (59). El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), un megacanal multiproteico que conecta la matriz mitocondrial con el citosol, se abre durante la reperfusión e induce muerte celular (60,61). El pool de nucleótidos de adenina se convierte en un 90% a ATP por medio de la refosforilación del ADP y AMP (45). El lactato disminuye debido a su remoción por la circulación sistémica o por su oxidación a CO_2 y agua. El pH retorna rápidamente a los niveles basales (45). Los niveles de glucosa se elevan 4 a 6 veces

sobre lo normal, muy probablemente porque los transportadores GLUT-4 se movieron del sarcoplasma al sarcolema durante la isquemia (62,63). A nivel de la cadena transportadora de electrones, la reperfusión daña la actividad de los complejos I y III (64,65). Además se ha observado un aumento del desacoplamiento del metabolismo mitocondrial, que se manifiesta como un exceso de oxidación de sustratos en comparación a la producción de energía, disminuyendo la eficacia metabólica en los corazones reperfundidos (55,66).

Aún cuando los eventos de isquemia y reperfusión involucran un gran número de moléculas y procesos celulares, el daño asociado a la isquemia y reperfusión miocárdica se puede resumir en dos mecanismos interrelacionados entre sí (Figura 1). El primero corresponde al aumento del Ca^{2+} intracelular secundario a la apertura o cierre de canales y activación de transportadores de membrana; el segundo corresponde al aumento en la producción y acumulación de EROs, que provocan peroxidación de la membrana celular y pérdida de la integridad celular, facilitando la entrada de Ca^{2+} (36,67). En ambos casos, el resultado final es una hipercontractura del cardiomiocito, que lo llevará irreversiblemente a su muerte por distintas vías. En las últimas décadas, existe evidencia que relaciona la apertura del PTPM con la muerte celular. La apertura masiva del poro provoca depolarización mitocondrial, edema y ruptura de la membrana externa de la mitocondria, alterando irreversiblemente su función (60,68,69). Durante la isquemia, el PTPM se encuentra cerrado debido a la acidosis generada, pero durante la reperfusión se establecen condiciones que favorecen su apertura. La hipercalcemia, el estrés oxidativo y la normalización del pH, inducen muerte celular dependiendo de la disponibilidad de ATP (37,69,70). La célula ejecuta el programa de apoptosis cuando sus niveles son altos, mientras que se desarrolla el de necrosis cuando hay ausencia de ATP (71).

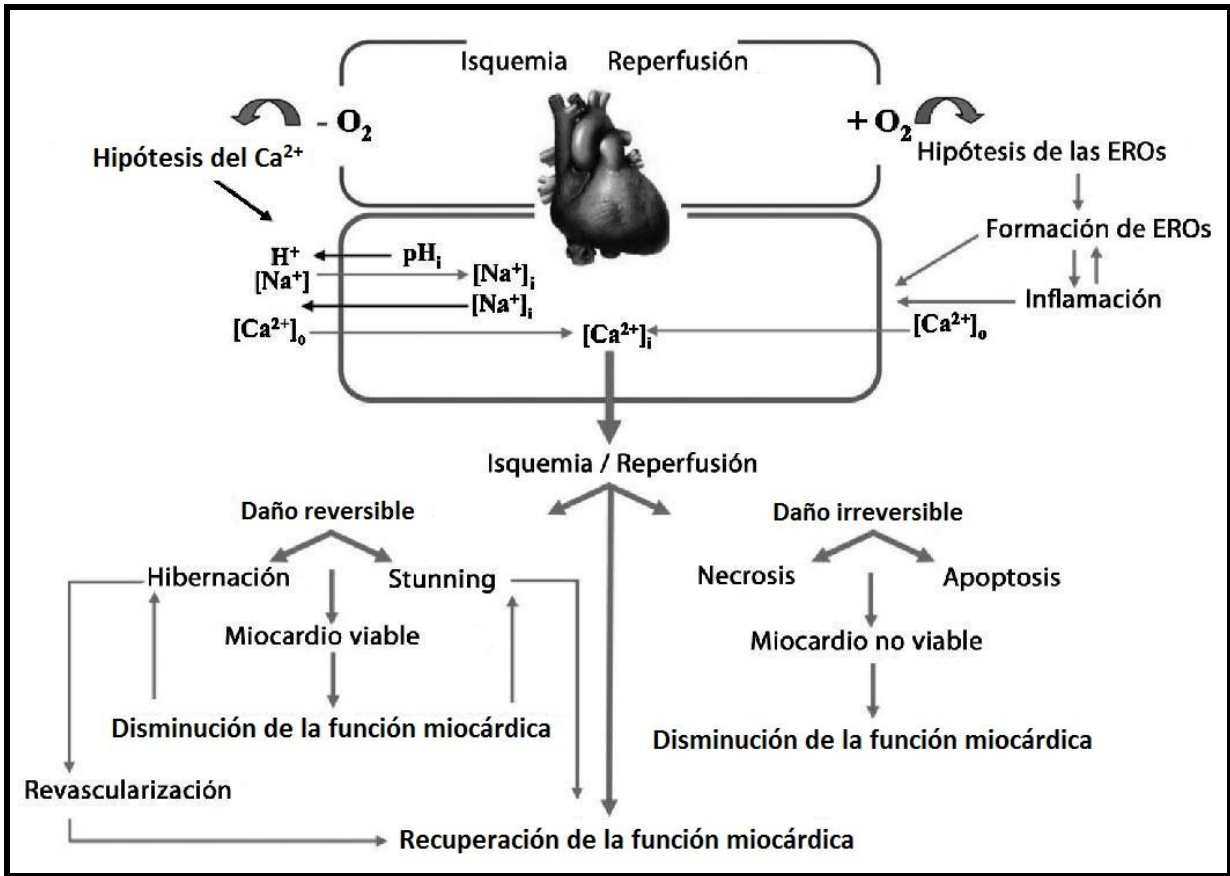


Figura 1. Hipótesis del daño producido por isquemia y reperfusion.

1.5. Cardioprotección

El daño por isquemia y reperfusion se presenta en diversos escenarios clínicos, tales como: la trombolisis en un infarto agudo del miocardio, durante el desarrollo de cirugía de by-pass coronario, en la recuperación de un paro cardiaco, durante el período perioperatorio y otros. La severidad del daño depende de cuán rápido se logre la reperfusion de los territorios isquémicos (11,37). Un potencial factor protector de daño es la capacidad intrínseca del corazón de generar respuestas de sobrevivencia celular (38,39,72). Este hecho es evidente en pacientes que sufren de isquemia miocárdica

crónica o isquemia subaguda prolongada. En ellos ocurre una condición conocida como corazón hibernante (73). En estas condiciones, no se observa necrosis ni apoptosis en los territorios isquémicos, pero sí una alteración de la función contráctil del miocardio. En 1985, Rahimtoola *et al.* mostraron que al mejorar la perfusión de los territorios isquémicos mediante cirugía de revascularización miocárdica, la disfunción del miocardio afectado se recuperaba (74). Aparentemente los cardiomiocitos tienen la capacidad de disminuir su metabolismo y función, proporcionalmente a la disminución del flujo coronario. En el mismo sentido, se ha mostrado que frente a eventos de isquemia y reperfusión únicos, de corta duración, el miocardio afectado presenta un déficit prolongado de la función contráctil conocido como “stunning” miocárdico o miocardio atontado (75). El fenómeno, descrito en 1975 por Heyndrickx *et al.* en un modelo animal, también se observa en la periferia de infartos de corazones humanos (76) o posterior al ejercicio en pacientes con estenosis coronarias parciales o en el corazón post by-pass coronario o en cuadros de espasmo coronario de paciente jóvenes (77-79). En los procesos de corazón atontado e hibernante, existe una pérdida transitoria de la función contráctil y una disminución del metabolismo celular que es recuperable, toda vez que el flujo sanguíneo se restablece. En estos casos se ha demostrado ausencia de apoptosis y/o necrosis, unida a una respuesta genómica caracterizada por un aumento de genes implicados en supervivencia, resistencia a la apoptosis y crecimiento celular (80-82).

1.5.1. Precondicionamiento y postcondicionamiento isquémico

Los mecanismos citoprotectores previamente descritos, activados durante eventos isquémicos, se relacionan mecánicamente con el preconditionamiento isquémico (PCI) y el post condicionamiento isquémico (PostCI).

El PCI representa una forma de cardioprotección frente al daño por isquemia y reperfusión, que se obtiene por ciclos breves y repetidos de oclusión/reperfusión realizados inmediatamente previo a un episodio de isquemia prolongado. El PCI descrito por Murry *et al.* en 1986, representa actualmente el “gold standard” de la cardioprotección (83). El PCI presenta dos ventanas protectoras. La primera o temprana, confiere protección por 2 ó 4 h posterior a la isquemia y representa la adaptación de vías moleculares específicas y el empleo de moléculas preexistentes dentro de la célula (38,39,84). La segunda ventana o tardía, entrega protección por 24 a 72 h e implica la expresión de genes relacionados con sobrevivencia y adaptación celular (85,86).

En el año 2003 se describió por primera vez el PostCI, el cual corresponde a una técnica de cardioprotección que aplicada en el momento de la reperfusión, ha mostrado resultados similares al PCI, al reducir el tamaño de infartos en diferentes modelos animales (87). Consiste en realizar ciclos breves y repetidos de oclusión/reperfusión realizados inmediatamente al inicio de la reperfusión miocárdica. La técnica ha sido usada con éxito en humanos sometidos a angioplastia en infarto agudo del miocardio (88).

La aplicabilidad clínica del PCI y del PostCI es limitada actualmente. Sin embargo, ambas técnicas han sido estudiadas ampliamente, en un intento por desentrañar los mecanismos moleculares tempranos y tardíos que confieren cardioprotección (89-91). Si bien, los mecanismos involucrados no están del todo dilucidados, es probable que la maquinaria transduccional que se activa durante el PCI y el PostCI sea similar (91-93). Se ha descrito la existencia de una vía transduccional de protección miocárdica común a ambas estrategias cardioprotectoras. Esta vía corresponde a varias proteínas quinasas relacionadas con sobrevivencia y que se agrupan dentro de lo que se conoce actualmente

como vía RISK (“**R**eperfusion **I**njury **S**alvage **K**inases”) (94,95). La vía RISK surgió como concepto en los últimos años de la década de los 90, unido al reconocimiento de la apoptosis como mecanismo de muerte en el daño por reperfusión (96,97). Sus integrantes originales eran PI3K, Akt y ERK1/2, que al ser activadas durante la reperfusión conferían una potente cardioprotección (39,92,93). Durante eventos de isquemia y reperfusión, estas proteínas kinasas se activan normalmente, pero en niveles insuficientes para producir cardioprotección. Se requiere de un estímulo más potente, ya sea mecánico (PCI o PostCI) o farmacológico para conferir protección. Actualmente, la vía incluye a una serie de otras proteínas kinasas, tales como: PKC, (principalmente la isoforma ϵ), PKG, p70s6K y GSK-3 β (98-103). Como efector final, la vía converge en el PTPM, manteniéndolo en un estado cerrado (104-107). El mecanismo por el cual la cascada de kinasas logra inhibir la apertura de PTPM en los primeros minutos de la reperfusión, aún no está del todo claro. Sin embargo, pareciera estar relacionado con la actividad y la fosforilación de algunos componentes río abajo en la vía, como por ejemplo GSK-3 β , cuya fosforilación e inhibición confiere protección (108). Otro componente relacionado con este efecto modulador del PTPM es la eNOS que puede inhibir al poro al activar la vía PKG-PKC y la apertura de canales mKATP (109-111) o en forma directa por acción del NO (112). Otro potencial mecanismo modulador del PTPM es la inhibición de la translocación de BAX a la mitocondria (113). Un mecanismo recientemente descrito es la reducción del Ca^{2+} intracelular al estimularse su captación por el retículo sarcoplásmico (114). Este efecto estaría mediado por la actividad de Akt. Esta vía transduccional modula además otros componentes asociados al daño por isquemia y reperfusión como son la producción de EROs, la sobrecarga de Ca^{2+} y el pH post-isquémico (94,95). Es sabido y aceptado que la elevada producción de EROs durante la isquemia y especialmente durante la reperfusión, se asocia con mayor daño miocárdico (115-117). Durante el PCI y PostCI, la producción de EROs se atenúa

considerablemente, pero se mantiene elevada (104,118). Las EROs generan protección; es decir, cierta cantidad de EROs son necesarios para generar respuestas de sobrevida al ser mediadores de señales de vías transduccionales protectoras (119). Esta paradoja de daño/protección asociada a los EROs, podría explicarse por diferencias en la compartimentalización en la producción de estas especies reactivas (citósolicos versus mitocondriales), el momento en que son generados (durante la isquemia versus la reperfusión), el tipo de EROs ($O\cdot$ y H_2O_2 versus $OH\cdot$) y obviamente la cantidad (pocos versus muchos). Recientemente se ha establecido una relación con EROs generados en la mitocondria y protección, ya que al modular la actividad de PKC- ϵ , potenciarían la apertura de canales mKATP e inhibirían la apertura del PTPM (120). Por otro lado, reducir los niveles de Ca^{2+} intracelular e intramitocondrial pareciera ser beneficioso dado que previene la muerte celular al evita la apertura del PTPM o la hipercontractura del cardiomiocito (121). Tanto el PCI como el PostCI producen este efecto. La inhibición del intercambiador de Na^+/H^+ por el PCI no sólo permitiría que la corrección del pH fuera más lenta durante la reperfusión, evitando la apertura del PTPM, sino que también influiría en la disminución de la entrada de Ca^{2+} al intracelular (122).

1.5.2. Precondicionamiento y postcondicionamiento farmacológico

Existe evidencia de que la vía RISK u otras asociadas a citoprotección pueden ser gatilladas por distintas moléculas, hormonas y/o fármacos en intensidades variables, introduciendo el concepto de precondicionamiento farmacológico (PCF) y postcondicionamiento farmacológico (PostCF) (94,95). Está bien establecido que la estimulación de receptores asociados a proteínas G (RAPG) por ligandos endógenos, tales como adenosina, bradicininas y opiodes, puede iniciar la activación de vías de protección celular (Figura 2). Existe evidencia que la activación de receptores de

adenosina A2A y A3, tanto en la etapa de isquemia como durante la reperfusión, es fundamental para conferir protección por la vía RISK (123,124). Fármacos tales como opioides, anestésicos inhalatorios y estatinas son cardioprotectores al activar de una u otra forma la vía RISK (125-127). Es importante diferenciar entre fármacos cardioprotectores, de aquellos con propiedades pre o postcondicionantes. Los primeros hacen referencia al desarrollo de protección miocárdica en tanto el fármaco esté presente en concentraciones plasmáticas circulantes efectivas, pero cuyo efecto protector se pierde en ausencia del fármaco. El concepto de condicionamiento implica que la protección miocárdica no se pierde en ausencia del fármaco, sino que se mantiene aún cuando no sea detectable en la circulación. Este concepto de farmacoprotección y condicionamiento cardiaco está cada vez más difundido y se utiliza clínicamente en situaciones de manejo de pacientes con alto riesgo cardiovascular sometidos a procedimientos terapéuticos, ya sean médicos o quirúrgicos. En cirugía cardíaca y no cardíaca de pacientes coronarios se pregona el uso de fármacos cardioprotectores para evitar la ocurrencia de eventos coronarios agudos y disminuir los daños asociados a isquemia y reperfusión coronaria.

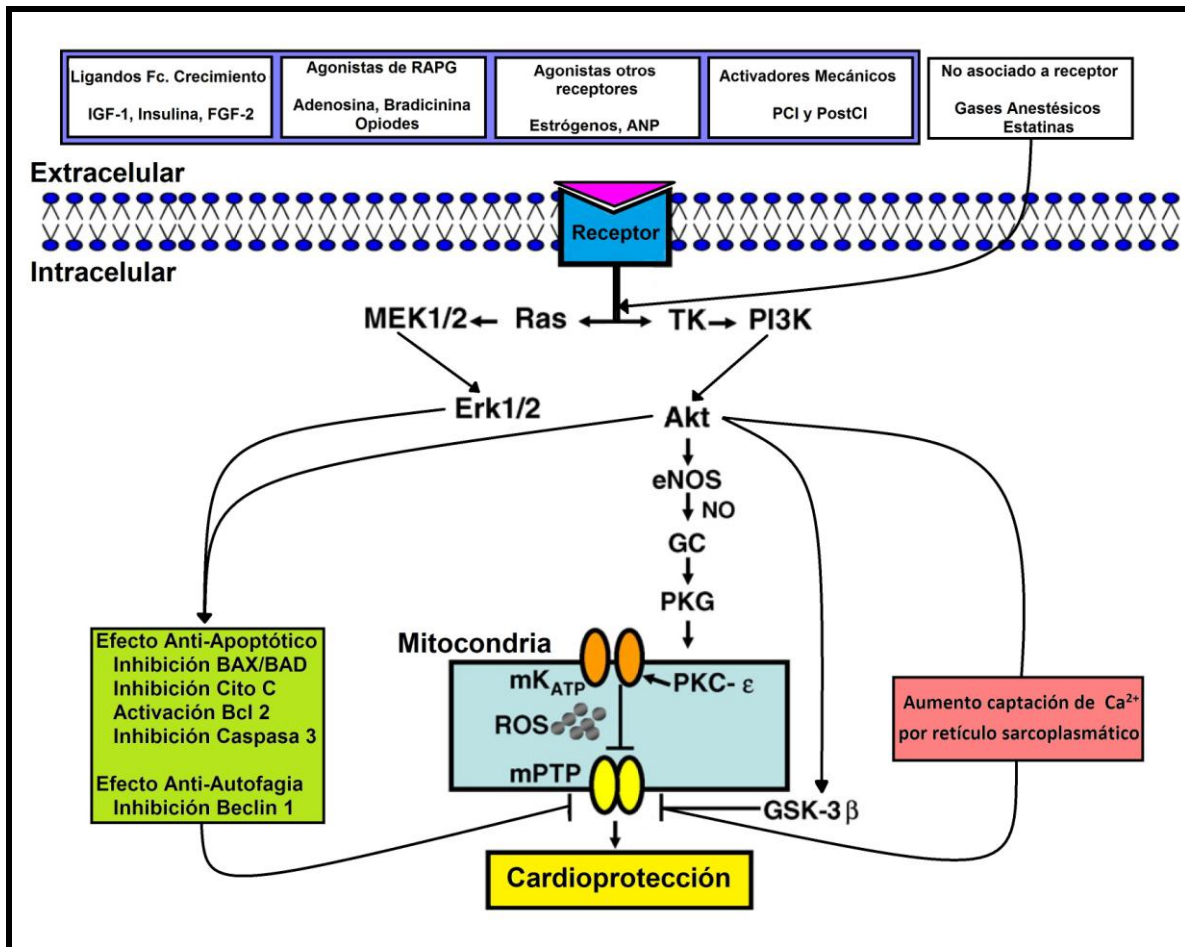


Figura 2. Vía transduccional RISK. El esquema muestra como diferentes moléculas biológicas y fármacos producen cardioprotección mediante la activación de una o más vías transduccionales, reclutadas especialmente durante el período de reperfusión. Distintas vías transduccionales de cardioprotección convergen en el poro de transición mitocondrial, el cuál pareciera ser el efector final de cardioprotección (modificada desde Hausenloy D, Yellon D (94,95)).

1.6. Morbimortalidad cardiovascular perioperatoria

En países desarrollados, aproximadamente el 30% de los pacientes quirúrgicos corresponden a pacientes coronarios (128). Si bien, en Chile no contamos con estadísticas, se infiere que la cifra oscilaría entre el 15 y 30%. Alrededor del 1 al 6% de

los pacientes sometidos a cirugía presentan eventos cardiovasculares graves tales como: muerte, infarto, angina inestable, insuficiencia cardiaca y arritmias (129-131). La ocurrencia de estas complicaciones cardiovasculares se relaciona directamente con la incidencia y severidad de los eventos isquémicos en el período perioperatorio (132,133). En general, se acepta que en los pacientes de riesgo cardiovascular alto, la isquemia puede alcanzar una incidencia aproximada de 40% (134-136). Esta realidad ha motivado que investigadores y médicos focalicen sus esfuerzos en el estudio del riesgo cardiovascular perioperatorio. Se han desarrollado normas y protocolos clínicos destinados a disminuir la incidencia de complicaciones cardiovasculares en pacientes quirúrgicos. En este sentido, el American College of Cardiology y la American Heart Association (ACC/AHA) han generado las guías de evaluación cardiovascular y cuidados perioperatorios para cirugía no-cardíaca (137). Las guías entregan una base sólida para la estratificación de pacientes quirúrgicos, mediante la identificación de factores de riesgo cardiovascular específicos y la evaluación de su estado funcional. Además, proponen una serie de algoritmos de toma de decisiones, en cuanto al estudio, manejo médico y terapia farmacológica perioperatoria de estos pacientes, haciendo especial referencia a aquellos tratamientos que han mostrado ser efectivos previniendo la ocurrencia de complicaciones cardiovasculares.

1.7. Cardioprotección perioperatoria

Las medidas destinadas a disminuir la incidencia de problemas cardiovasculares perioperatorios incluyen: 1) adecuada identificación de pacientes de riesgo, 2) adecuada monitorización cardiovascular intra y postoperatoria, 3) optimizar el tratamiento médico de patologías asociadas, 4) revascularización miocárdica preoperatoria, 5) uso de fármacos con propiedades cardioprotectoras durante dicho período. Las guías del ACC/AHA

recomiendan el uso de bloqueadores β -adrenérgicos y estatinas en pacientes con riesgo cardiovascular intermedio-alto. Los agonistas α_2 -adrenérgicos son otro grupo de fármacos que aparecen referidos como útiles en pacientes con factores de riesgo cardiovascular que requieren control de hipertensión perioperatoria. Clonidina y mivazerol disminuirían la incidencia de isquemia y complicaciones cardiovasculares, mejorando la supervivencia a largo plazo (138,139). Dexmedetomidina es otro agonista α_2 -adrenérgico que ha sugerido tener efectos cardioprotectores (140,141).

1.8. Dexmedetomidina

La dexmedetomidina (DEX) es un potente y selectivo agonista de receptores α_2 -adrenérgicos, 8 veces más específica por estos receptores que clonidina (142,143). Los estudios que evalúan la afinidad del fármaco por cada uno de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} , son escasos. La evidencia disponible sugiere que DEX tiene una afinidad elevada y similar para los tres subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos descritos, oscilando en el rango de 1,3-7,6 nM (144).

Debido a sus efectos analgésicos y ansiolíticos, en clínica se utiliza para sedación perioperatoria y en cuidados intensivos (145). El estímulo de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} por DEX, median distintos efectos cardiovasculares (146,147). El uso de un bolo endovenoso de DEX en individuos sanos determina una respuesta bifásica de la presión arterial. Primero produce un aumento transitorio inicial, atribuible a la activación de receptores α_{2B} post-sinápticos que inducen vasoconstricción en la musculatura lisa vascular, seguido de una disminución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, producto de la simpatomolisis inducida por la activación de receptores α_{2A} en el sistema nervioso central (148-151). Estudios en humanos sugieren que este

fármaco tiene propiedades cardioprotectoras al modular el sistema nervioso autónomo (SNA), disminuyendo la actividad simpática con predominio de la actividad parasimpática. Esto atenuaría la respuesta adrenérgica frente al trauma quirúrgico, mejorando la estabilidad hemodinámica durante el período perioperatorio. Además, la disminución de la frecuencia cardíaca y la presión arterial observada durante su uso, disminuirían el estrés sobre placas ateromatosas inestables y ayudaría a mantener el balance en la relación aporte/demanda de oxígeno miocárdico, impactando de manera favorable en la morbimortalidad perioperatoria asociada a la cirugía vascular y no-cardíaca (140,152). En perros sometidos a estenosis fija de la arteria coronaria descendente anterior se observó una menor incidencia de isquemia y menor producción de lactato durante el período de estudio en el grupo usuario de DEX versus el grupo control (153). En otro estudio realizado también en perros, DEX suprimió la respuesta endocrina y cardiovascular frente a un estímulo simpático (154). En corazones aislados de ratas sometidos a hipoxia y reoxigenación miocárdica global, el uso de DEX previo y durante los eventos hipóxicos mejoró la función ventricular y el flujo coronario, comparado con el grupo control (155). Según los autores, este efecto benéfico podría atribuirse a estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos. Okada *et al.* (1997) concluyeron que DEX tiene un efecto cardioprotector en la isquemia global de corazones aislados de rata, mediado por estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos postsinápticos que causarían vasoconstricción coronaria y protección de forma similar al PCI (156). El trabajo de Okada es el primero en sugerir un probable efecto preconditionador de DEX. Sin embargo, a la fecha, ningún estudio ha explorado los potenciales mecanismos moleculares de cardioprotección generados por DEX. En ese sentido, hay evidencia que DEX aumentaría significativamente la producción de NO a partir de células endoteliales, en concentraciones suficientes como para generar protección miocárdica por esa vía (157), pero se desconoce si produce efectivamente un efecto de pre o postcondicionamiento

cardíaco que gatille vías moleculares cardioprotectoras con activación de kinasas de supervivencia celular que forman parte de la vía RISK. Además, desde el punto de vista anestésico tanto la isquemia perioperatoria, así como el infarto perioperatorio, son entidades que se limitan a una región de miocardio hipoperfundido y no al corazón entero. Tampoco existe claridad acerca de cuán importante o necesaria puede llegar a ser la modulación del SNA por DEX para generar cardioprotección, durante eventos de I/R miocárdica. En consecuencia, independiente de la modulación del SNA, parece necesario e interesante, estudiar los probables mecanismos moleculares involucrados en la potencial protección celular generada por DEX y explorar sus potenciales efectos cardioprotectores de frente a eventos de I/R regional.

1.9. Receptores α_2 -adrenérgicos miocárdicos

Tres subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos se han identificados en mamíferos. De acuerdo a los diferentes genes que codifican para su expresión, las tres isoformas de receptores fueron conocidas clásicamente como α_{2-C10} , α_{2-C2} y α_{2-C4} y en la actualidad se les conoce generalmente como los subtipos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} respectivamente (158). En roedores y bovinos se ha descrito una forma ortóloga del subtipo α_{2A} humano, llamado erróneamente α_{2D} , sobre la base de sus propiedades farmacológicas (158,159). La expresión y distribución de los subtipos de receptores α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} , es específica para cada tejido y difiere de una especie a otra (158,160,161). La importancia o la función biológica de la distinta proporción de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en un órgano particular, aún no se encuentra dilucidada. Los diversos estudios que dan cuenta de la distribución de los tres subtipos evidencian importantes diferencias de expresión en un mismo tejido (161-163). A pesar de estas discrepancias, parece haber consenso de la presencia de los tres subtipos de receptores tanto en corazones de rata, como en

corazones humanos (164,165). Tanto en el miocardio como en las arterias coronarias, se ha demostrado funcionalmente la existencia de receptores α_2 -adrenérgicos en las terminales nerviosas presinápticas (166,167). Sin embargo, la presencia de receptores α_2 -adrenérgicos postsinápticos en los cardiomiocitos no está del todo definida. Si bien, se ha avanzado en la determinación de la expresión de los tres subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en los distintos órganos, son escasos los estudios que hacen referencia a la localización y función de éstos, a nivel celular, en un órgano particular. Esta realidad, especialmente cierta respecto del corazón, hace relevante estudiar la expresión, localización y función cardioprotectora de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en el contexto de este estudio y poder extrapolar los potenciales resultados favorables, al corazón humano.

2. HIPÓTESIS

La profilaxis con dexmedetomidina produce preconditionamiento cardíaco y disminuye el daño miocárdico por episodios de isquemia y reperfusión miocárdica, a través de la activación de la vía transduccional RISK, posterior al estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos.

3. OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la capacidad preconditionante de la dexmedetomidina en la isquemia y reperfusión miocárdica regional.
- Estudiar el mecanismo molecular del preconditionamiento cardíaco inducido por dexmedetomidina.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar si dexmedetomidina reduce el tamaño de infarto en modelos animales *in vivo* y *ex vivo* de isquemia y reperfusión miocárdica regional.
2. Estudiar si dexmedetomidina mejora la función ventricular en modelo animal *ex vivo* de isquemia y reperfusión miocárdica regional.
3. Determinar la activación de la vía transduccional RISK por dexmedetomidina.
4. Evaluar la relación entre activación de la vía RISK y la cardioprotección inducida por dexmedetomidina.
5. Identificar y localizar receptores α_2 -adrenérgicos en el tejido miocárdico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Azul de Evans, 2,3,5-trifeniltatrazolio, yohimbina, medio DMEM, EDTA, Na_3VO_4 , PMSF, DTT, Tween-20, ácido pirúvico, reactivo de Folin Ciocalteau. De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron: NaOH, CaCl_2 HCl, Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , MgSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tatrato dipotásico, NaF, $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, formaldehído 37%, Entellan. De Amresco (Solo, OH, EEUU): NaCl, Tris base, Hepes. De Winkler (Santiago, Chile) se obtuvo KCL, BSA y glucosa. De Calbiochem (San Diego, CA, EEUU) se adquirieron: anti-IgG conejo, anti-IgG ratón, FBS (suero fetal de bovino) y LY 294002. De Cell Signalling Technology Inc. (New England, NY, EEUU) se adquirieron anticuerpos: anti p-Akt^{Ser473}, anti Akt total, anti p-ERK1/2^{Thr202/Tyr204}, anti ERK 1/2 total. De BD Transduction Laboratories (NJ, EEUU) se adquirieron anticuerpos anti p-eNOS^{Ser1177} y anti eNOS total. De Antibodies Online.com (Aachen, Germany) se obtuvo anticuerpo anti receptor adrenérgico α_{2A} . De Thermo Fisher Scientific Inc. (IL, EEUU) se obtuvo los anticuerpos anti receptor adrenérgico α_{2B} y α_{2C} . De Laboratorios Hospira Chile se adquirió pentobarbital y dexmedetomidina (Hospira Inc., NC, EEUU). Otros reactivos: Hematoxilina de Mayer (Dako Cytomation, CA, EEUU), Kit ECL plus (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, EEUU), Cocktail inhibidor de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Kit HRP-estreptavidina marcada (RTU-Vectastain kit, Vector Laboratories Inc., CA, EEUU), Nonidet P-40 (Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU).

5.2. Animales y procedimientos quirúrgicos

Los experimentos se llevaron a cabo en modelos *in vivo* y *ex vivo* de corazón de ratas macho, adultas, Sprague-Dawley (250-350g), contando con la autorización del Comité de Ética Institucional.

Modelo *in vivo*: las ratas se anestesiaron con pentobarbital (80 mg/kg IP). La tráquea se intubó con una cánula 16 y se conectó a un ventilador de roedores (Harvard Rodent Ventilator, Modelo 683, Holliston, MA). Las ratas se ventilaron con aire enriquecido con O₂, a 40-50 respiraciones por min, con volúmenes corrientes de 1 ml/100 mg peso. La temperatura corporal se mantuvo constante a 37° C mediante el uso de una almohadilla de calefacción de temperatura regulable. La arteria carótida derecha se canuló con un catéter de calibre 24 y se conectó a un transductor de presión para monitorizar continuamente la presión y la frecuencia cardiaca con un monitor General Electric, Dash 1000. Luego, un catéter intravenoso 24 se instaló en la vena yugular izquierda, para la administración de fármacos. Posteriormente, se abrió el tórax a través de una toracotomía izquierda a nivel del cuarto o quinto espacio intercostal, las costillas se retrajeron con suavidad y se realizó una pericardiotomía para exponer el corazón. Con el fin de realizar la isquemia regional temporal del ventrículo izquierdo, se posicionó un asa de sutura prolene 6-0, por debajo de la aparición de la primera rama de la arteria coronaria descendente anterior (ACDA). Los extremos de dicha sutura se pasaron a través de un tubo de polietileno (PE- 50) formando un lazo que permitiera una oclusión reversible. Posterior a la infusión de fármacos del estudio y antes de la instauración de la isquemia, se administró heparina 100 U/kg por vía intravenosa. A continuación, los corazones se sometieron a 30 min de isquemia regional seguida de 120 min de perfusión del territorio dependiente de ACDA o área de riesgo de infarto (AR).

La isquemia fue confirmada visualmente por cianosis en la superficie de miocardio y la reperfusión se corroboró por una respuesta hiperémica epicárdica y la rápida desaparición de la cianosis.

Modelo *ex vivo*: las ratas se anestesiaron con pentobarbital (80 mg/kg i.p.). Posteriormente, se realizó una esternotomía y se administró heparina 100 U/kg, i.v. Los corazones fueron rápidamente extraídos de la cavidad torácica, montados en una cámara de corazón con temperatura controlada y perfundidos de forma retrógrada, a través de la aorta ascendente, con una bomba de infusión peristáltica (Gilson Minipuls3, Francia) a un flujo constante de 10-14 ml/min, para generar una presión de perfusión media inicial de 60-70 mmHg, con una solución tampón Krebs Henseleit que contenía (en mM) NaCl (128,3), KCl (4,7), CaCl₂ (1,35), NaHCO₃ (20,2), NaH₂PO₄ (0,4), MgSO₄ (1,1), glucosa (11,1), a pH 7,4 a 37° C, al equilibrarse con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Las temperaturas del perfusado y el baño se mantuvieron a 37° C, por un sistema de recirculación de agua entibiada por termostato (B. Braun Thermomix 1420, Alemania Occidental). Luego, un balón de látex se insertó en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral, se conectó a un transductor de presión (Puente Amp ADInstruments ML221, Australia) y se llenó con solución salina normal para producir una presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDFVI) de 5-10 mmHg. El volumen del balón se mantuvo constante durante todo el experimento. Con el fin de realizar la isquemia regional temporal del ventrículo izquierdo, se posicionó un asa de sutura prolene 6-0, por debajo de la aparición de la primera rama de la arteria coronaria descendente anterior (ACDA). Los extremos de dicha sutura se pasaron a través de un tubo de polietileno (PE-50) formando un lazo que permitiera una oclusión reversible. Después de 15 min de estabilización, los corazones con una presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) menor de 60 mmHg y frecuencia cardíaca (FC) de menor de 180 latidos por min,

se excluyeron del estudio. Los corazones restantes se sometieron a una isquemia regional de 30 min regional seguida de una reperfusión de 120 min del AR.

5.3. Protocolos experimentales

Para determinar si DEX induce activación de kinasas de sobrevivencia previo al período de isquemia y reperfusión, si produce cardioprotección al final del periodo de reperfusión por medio del estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos independientemente de la modulación del SNA y para explorar la relación entre la protección inducida por DEX y la activación de la vía PI3K/Akt, en cada modelo, las ratas se asignaron al azar a uno de los siguientes grupos de estudio, después de un periodo de 15 min de estabilización y antes de la isquemia regional (Figura 3).

Modelo *in vivo*:

- Grupo Control: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió solución fisiológica, IV, por 30 min.
- Grupo DEX: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió un bolo de DEX 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IV, en 10 min y luego DEX 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, IV, por 15 min.
- Grupo YOH: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió un bolo de YOH 1 mg/kg, IV, en 5 min y luego YOH 0,5 mg/kg/h, IV, por 20 min.
- Grupo YOH/DEX: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió un bolo de YOH 1 mg/kg, IV, en 5 min y luego YOH 0,5 mg/kg/h, IV por 25 min. Después de 5 min de iniciada la infusión de YOH, se administró un bolo de DEX 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IV, en 10 min y luego DEX 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, IV, por 15 min.

Modelo *ex vivo*:

- Grupo Control: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió solución de perfusión por 30 min.
- Grupo DEX: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió DEX 10 nM en solución de perfusión por 25 min, seguido de un lavado de 5 minutos con solución de perfusión.
- Grupo YOH: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió YOH 1 μ M en solución de perfusión por 25 min, seguido de un lavado de 5 min con solución de perfusión.
- Grupo YOH/DEX: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió YOH 1 μ M en solución de perfusión por 30 min y después de 5 min de iniciada la infusión de YOH, se administró DEX 10 nM por 25 min, seguido de un lavado de 5 min con solución de perfusión.
- Grupo LY: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió LY 20 μ M en solución de perfusión por 25 min, seguido de un lavado de 5 min con solución de perfusión.
- Grupo LY/DEX: Previo a la isquemia y reperfusión regional, recibió LY 20 μ M en solución de perfusión por 30 min y después de 5 min de iniciada la infusión de LY 20 μ M, se administró DEX 10 nM por 25 min, seguido de un lavado de 5 min con solución de perfusión.

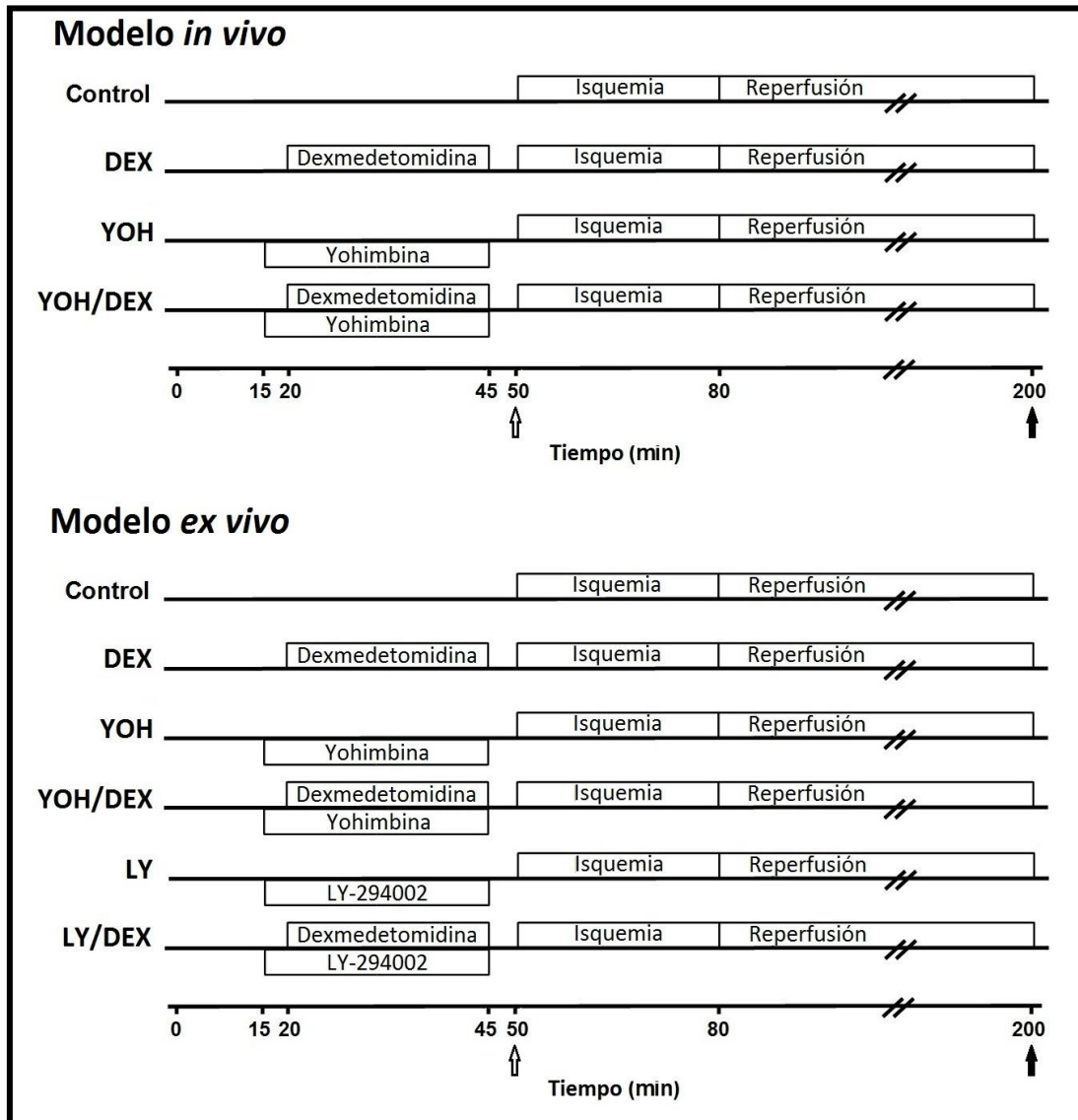


Figura 3. Protocolo experimental de modelos *in vivo* y *ex vivo*. Los corazones de las ratas se sometieron a 30 min de isquemia del territorio irrigado por la ACDA y a 120 min de reperusión. Control: sin preconditionamiento, DEX: preconditionamiento con dexmedetomidina, YOH: preconditionamiento con yohimbina, YOH/DEX: preconditionamiento con yohimbina y dexmedetomidina. LY: Preconditionamiento con LY-294002, LY/DEX: preconditionamiento con LY-294002 y dexmedetomidina. La flecha blanca indica el momento de la toma de muestras para el análisis de Western blot. La flecha negra muestra el momento de medición de la recuperación de las variables hemodinámicas y el tamaño de infarto del AR.

5.4. Medición de tamaños de infarto y área de riesgo de infarto

En ambos modelos, al final del período de reperfusión, se ocluyó definitivamente la ACDA utilizando la misma hebra de prolene 6-0 instalada previamente. Se administró azul de Evans al 1% para teñir el miocardio no isquémico, delineando el AR (zona sin tinción) en el corazón estudiado. Dependiendo del modelo, se extrajo rápidamente el corazón de la cavidad torácica (modelo *in vivo*) o se desmontó del sistema de Langendorff (modelo *ex vivo*), se separaron las aurículas y los grandes vasos de los ventrículos. Estos últimos se cortaron en rebanadas de aproximadamente 2 mm, desde la base hasta la punta. Los cortes se introdujeron durante 15 min, en 15 ml de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1% (Sigma Chemical) en tampón fosfato, ajustado a pH 7,4, a 37°C. Las rebanadas se mantuvieron durante la noche en formaldehído al 10%, para su fijación. Posteriormente, los cortes se colocaron en un soporte de plexiglás y cubiertos por un cristal separado por cuatro cuñas de 2 mm en las esquinas para mantener la separación entre ambas placas en el grosor de corte deseado. Se utilizaron abrazaderas de resorte para presionar ambas placas, aplastando las rebanadas a un grosor uniforme de 2 mm. Luego, se tomó una fotografía digital del tejido montado (168,169). Para cada rebanada de tejido, se midió el tamaño del AR y el AI, mediante planimetría utilizando el programa Image J (170). El AR se expresó como porcentaje del volumen de los ventrículos, y el AI se expresó como porcentaje del volumen del AR.

5.5. Medición de la función del ventrículo izquierdo

La función del ventrículo izquierdo, se determinó sólo en el modelo *ex vivo*. La PDFVI, la PSVI, el máximo de positivos y negativos de la derivada de la presión del VI (+dP/dtmax, -dP/dtmin), la FC y la PP se midieron y registraron continuamente durante

todo el período experimental. Los datos recogidos se guardaron y analizaron en un ordenador personal utilizando un PowerLab (ML866 ADInstruments, Australia). La PDVI se calculó de la siguiente manera: $PDVI = LVSP - PDFVI$ (mmHg).

5.6. Obtención y cultivo de cardiomiocitos

Los cardiomiocitos adultos se obtuvieron a partir de corazones de ratas Sprague-Dawley adultas (250-350g), como se describe en Vicencio *et al.* (171). Los corazones se digirieron con solución tampón de Gerard (en mM): NaH_2PO_4 (0,19), Na_2HPO_4 (1,01), HEPES (10), NaCl (128), KCl (4), MgSO_4 (1,4), glucosa (5,5), ácido pirúvico (2), colagenasa y hialuronidasa 0,07% (p/v), a pH 7,4. Luego de trozados mecánicamente e incubados en solución de digestión con agitación constante durante 20 min, el sobrenadante se centrifugó a 500 rpm durante 30 s. El tejido restante se digirió aún más, repitiendo el proceso. Los centrifugados de cardiomiocitos adultos se homogenizaron inmediatamente para la extracción de proteínas.

Los cardiomiocitos neonatos se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días, como se describe en Foncea *et al.* (172). Las células se sembraron a una densidad final de $1,4 \times 10^3/\text{mm}^2$ sobre placas de Petri (35, 60 ó 100 mm) cubiertas con gelatina al 2%. Después de la obtención, los cardiomiocitos se incubaron por 24 h en medio con suero (DMEM:M199=4:1, FBS 10%).

5.7. Obtención de homogenizados de tejidos y células

Los ventrículos de ratas adultas congelados en nitrógeno líquido o los cardiomiocitos de los animales adultos y neonatos, se homogeneizaron en tampón frío con inhibidores de fosfatasas y proteasas (en mM): Tris-HCl (50), NaCl (150), EDTA (1),

Na₃VO₄ (5), NaF (20), Na₄P₂O₇ (10) , Nonidet P-40 del 1% (v/v) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, Mannheim, Alemania), pH final 7,4. Luego las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 5 min 4° C y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Las fracciones solubles se guardaron congeladas a -80° C, para posterior análisis por Western blot.

5.8. Determinación de proteínas por método de Lowry

Se utilizó una variante del micrométodo de Lowry en presencia de detergentes (173). Brevemente, se preparó el reactivo A mezclando partes iguales de una solución de cobre-tartrato-carbonato (preparado por mezcla de 50 mL de 0,2% p/v CuSO₄•5H₂O y 0,4% p/v tartrato dipotásico con 50 mL de 20% p/v Na₂CO₃), 10% SDS y NaOH 0,8 N; y el reactivo B diluyendo 1 volumen del reactivo de Folin Ciocalteu con 5 volúmenes de agua nanopura. En un tubo Eppendorf se mezcló 5 µL de muestra de proteínas con 400 µL de agua nanopura, 400 µL de reactivo A y 200 µL de reactivo B. se incubó a 40°C por 30 min y la absorbancia se determinó a 750 nm. Como estándar de proteínas se utilizó BSA.

5.9. Análisis de Western blot

Los niveles de las formas totales y fosforiladas de kinasas de sobrevida en los ventrículos de ratas adultas, al final del periodo de acondicionamiento farmacológico y previo a los periodos de isquemia y reperfusión, se determinaron por Western blot. También se usó esta técnica para determinar la presencia de receptores α₂-adrenérgicos en distintos tejidos de rata incluidos corazón y cardiomiocitos adultos aislados. Para la electroforesis y el análisis de Western blot, los lisados de los tejidos se ajustaron por

proteínas (30 µg), separadas por SDS-PAGE (8%) y transferidos a membranas de nitrocelulosa (Millipore Corp., Bedford, MA). Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA al 2,5% p/v en TBS-T ((en mM) Tris (25), NaCl (138), KCl (2,7), Tween-200 1% (v/v), a pH 7,4) por 1 h. Las membranas se incubaron con anticuerpos contra las formas fosforiladas (1:2.000 v/v) y totales (1:2.000 v/v) de ERK 1/2, Akt, eNOS o con anticuerpos contra los subtipos específicos de receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} (1:500 v/v), según correspondiera. Después de un período de incubación adicional con los correspondientes anticuerpos secundarios anti IgG de conejo o ratón, conjugado a peroxidasa de rabanito (1:4.000 v/v), la unión específica se detectó mediante quimioluminiscencia (ECL). La intensidad de la señal de las bandas se cuantificó por densitometría usando el software Image J (170).

5.10. Inmunohistoquímica

La localización de subtipos específicos de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón de rata adulta se determinó mediante técnicas de inmunohistoquímica. Con este fin, los corazones se fijaron en formaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,3) por 24 h. Posteriormente se deshidrataron en alcohol, se aclararon en xilol, y se incluyeron en parafina para ser cortados en secciones de 5 µm. Se utilizaron técnicas estándar de inmunoperoxidasa, para evidenciar la presencia de receptores α_2 -adrenérgicos. El anticuerpo primario de subtipos específicos de receptores α_2 -adrenérgicos se aplicó en cada sección individual (1:500 v/v) a 4° C, durante la noche. La inmunotinción se realizó utilizando un kit de HRP-estreptavidina marcada (RTU-Vectastain kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron en un portaobjeto con Entellan. Los controles de inmunohistoquímica se realizaron mediante la sustitución del anticuerpo primario con tampón fosfato salino.

Todos los controles fueron negativos. De la misma forma y utilizando las mismas técnicas de inmunohistoquímicas se determinó la presencia de receptores α_2 -adrenérgicos en cerebro y riñón de ratas adultas. Todas las secciones de tejido se examinaron por microscopía de luz (Leitz, Orthoplan) y las imágenes se capturaron con una cámara Canon 1256.

5.11. Análisis estadístico

El tamaño de la muestra de estos experimentos se definió en 8 animales por grupo en cada modelo. Se utilizó ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey para analizar los niveles de fosforilación de las proteínas kinasas asociadas a sobrevida y el tamaño de las zonas de riesgo e infarto. Los datos hemodinámicos se analizaron con ANOVA de dos vías para medidas repetidas (modelo mixto), seguido de una prueba de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Los datos se expresan como promedio \pm S.E.M.

6. RESULTADOS

6.1. Activación de la vía transduccional RISK en la cardioprotección mediada por dexmedetomidina

La administración de DEX en ambos modelos de estudio, *in vivo* y *ex vivo*, estimuló la fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS, en el tejido ventricular, previo al evento de I/R. En el modelo *in vivo* de I/R regional, 25 min de preconditionamiento con DEX, provocaron un aumento significativo de las fosforilaciones de ERK 1/2, Akt y eNOS, en comparación con los otros tres grupos experimentales. La administración del antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos YOH no modificó los niveles de fosforilación de las tres proteínas evaluadas en comparación al grupo Control. Sin embargo, la adición de YOH previno el aumento inducido por DEX en las fosforilaciones de ERK 1/2, Akt y eNOS. Igualmente, en el modelo *ex vivo* de I/R regional, la administración de DEX previo a los episodios de I/R, resultó en un aumento significativo en la fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS en comparación con los otros tres grupos. La administración de YOH no modificó los niveles de fosforilación de las tres proteínas respecto al grupo control. Una vez más, los aumentos de la fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS inducidos por DEX fueron prevenidos por la adición de YOH. La Figura 4 muestra una imagen representativa de los Western blots y los valores promedios de los niveles fosforilados de ERK 1/2, Akt y eNOS en tejido ventricular en los grupos Control, DEX, YOH y YOH/DEX después del preconditionamiento farmacológico e inmediatamente previo a la isquemia en los modelos *in vivo* (Figura 4A) y *ex vivo* (Figura 4B).

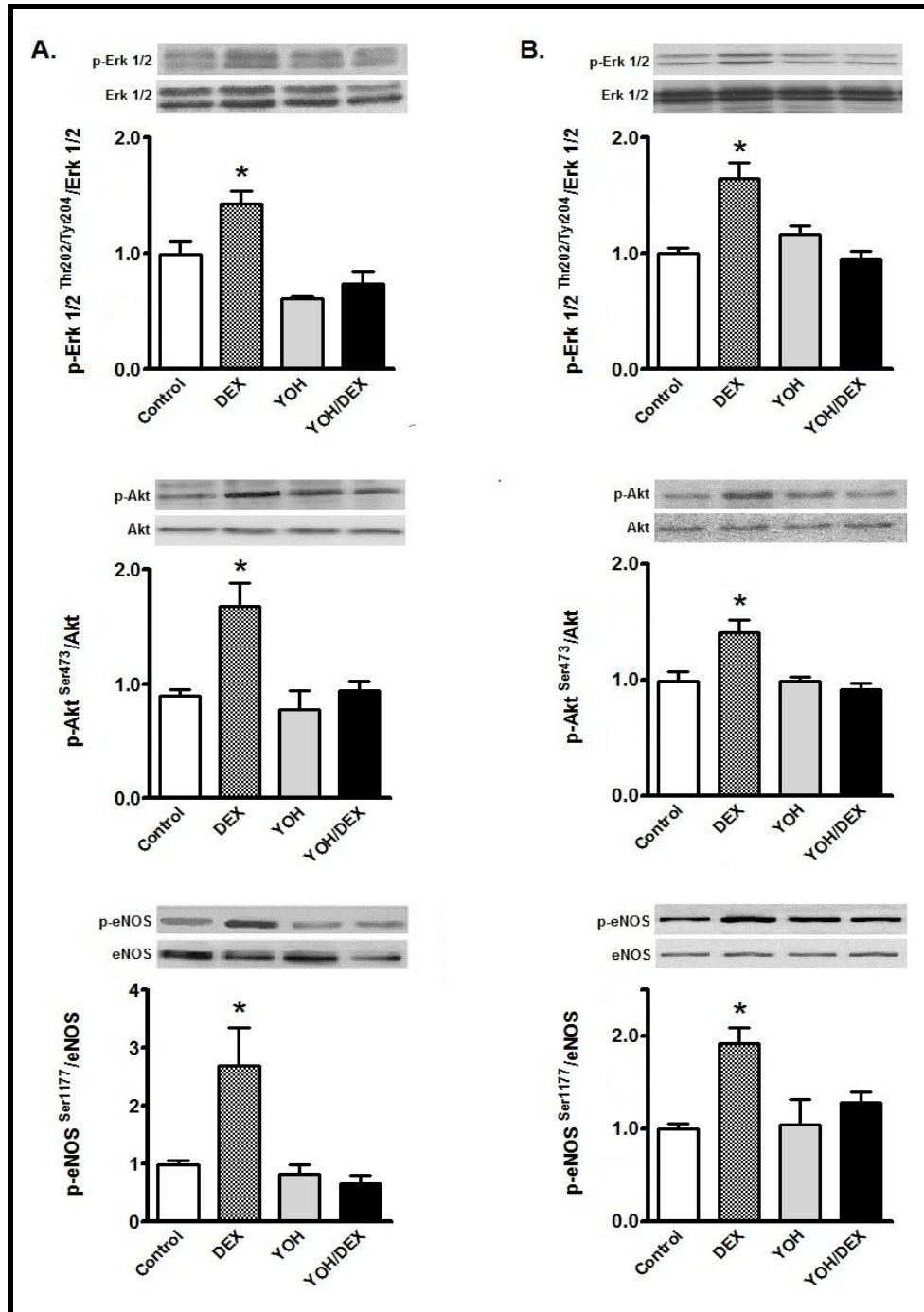


Figura 4. Dexmedetomidina estimula la fosforilación de Erk 1/2, Akt y eNOS, la que es prevenida por la adición de YOH. Western blots y valores promedios de los niveles de p-ERK 1/2 en Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, p-Akt en Ser⁴⁷³ y p-eNOS en Ser¹¹⁷⁷ en homogenizado ventricular de los grupos Control, DEX, YOH y YOH/DEX, previo a la isquemia en el modelo *in vivo* (A) y el modelo *ex vivo* (B). Los valores se expresan como promedios \pm S.E.M., n = 8 por grupo en cada modelo, * p<0,05 DEX v/s Control, YOH y YOH/DEX (ANOVA de una vía. Tukey para comparaciones múltiples).

6.2. Dexmedetomidina reduce el tamaño de infarto en modelos animales *in vivo* y *ex vivo* de isquemia y reperfusión miocárdica regional

El preconditionamiento con DEX redujo los tamaños de infartos tanto en el modelo *in vivo* como en el modelo *ex vivo* de I/R regional. En el modelo *in vivo* de I/R regional, la administración de DEX previo a los episodios de I/R, redujo significativamente los tamaños de infarto en el AR ventricular en comparación con los otros grupos en estudio. El pretratamiento con YOH no modificó el tamaño de infarto en comparación con el grupo Control. Sin embargo, la reducción observada en el tamaño de infarto en el AR inducida por DEX fue prevenida por la adición de YOH. Igualmente en el modelo *ex vivo* de I/R regional, la administración de DEX, previo a los episodios de I/R, redujo significativamente los tamaños de infarto en el AR, en comparación con los otros grupos experimentales. La administración de YOH no modificó el tamaño de infarto en comparación con el grupo Control. Sin embargo, la reducción en el tamaño de infarto en el AR inducida por DEX también fue prevenida por YOH. Los valores promedios de los tamaños de infarto en el modelo *in vivo* (Control: $50 \pm 3\%$, DEX: $22 \pm 4\%$, YOH: $41 \pm 2\%$, YOHDEX: $32 \pm 2\%$), se muestran en la Figura 5A. Los valores promedios de los tamaños de infarto en el modelo *ex vivo* (Control: $36 \pm 3\%$, DEX: $8 \pm 3\%$, YOH: $41 \pm 6\%$, YOH / DEX: $30 \pm 3\%$) se muestran en la Figura 5B. El AR, expresada como porcentaje del volumen ventricular, fue similar entre los grupos en los modelos *in vivo* y *ex vivo*.

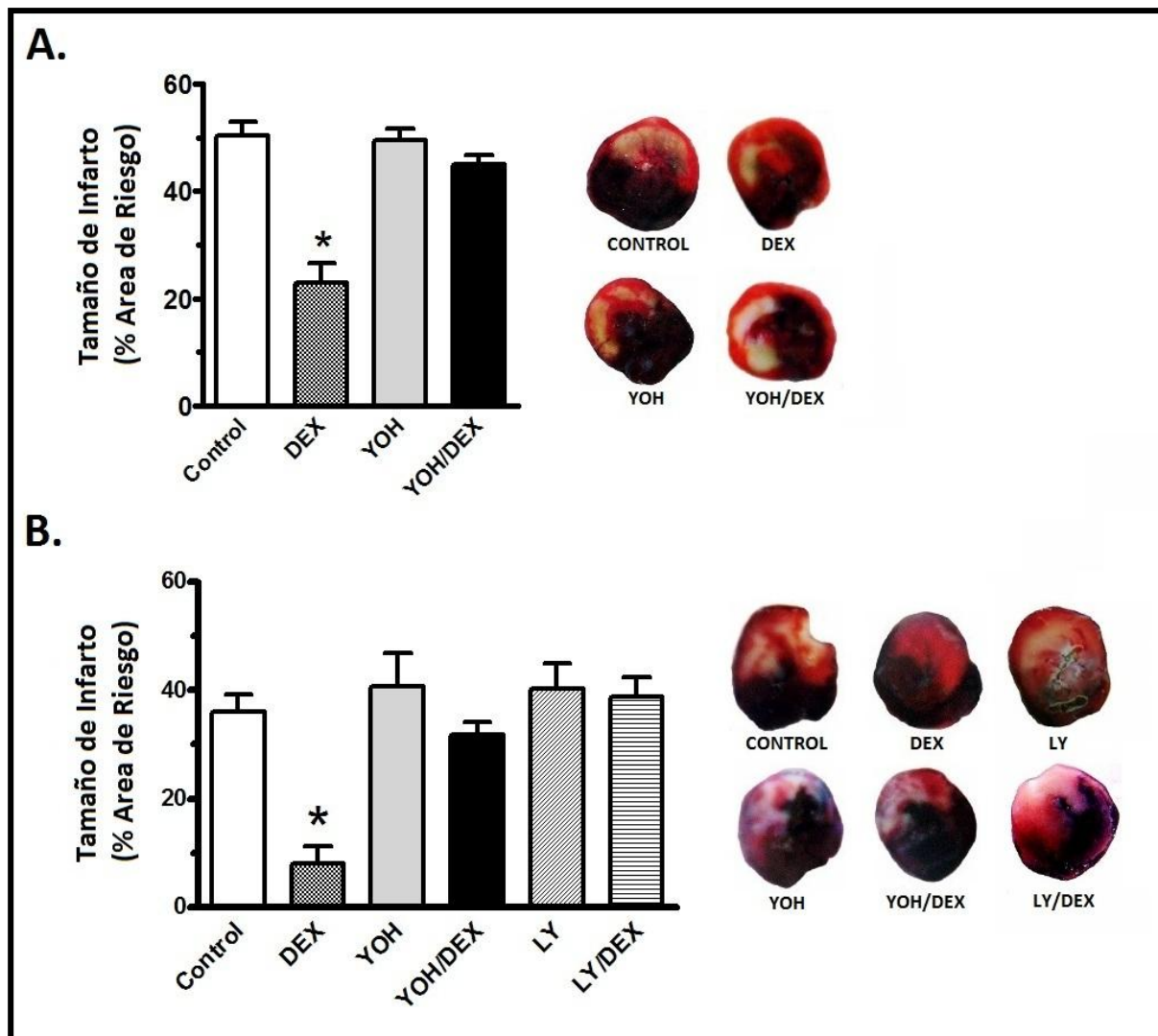


Figura 5. Dexmedetomidina disminuye los tamaños de infarto frente a eventos de I/R regional en el modelo *in vivo* y *ex vivo*. Imágenes representativas de secciones de corazón y promedios de los tamaños de infarto del AR en los grupos Control, DEX, YOH, YOH/DEX, después de la I/R en el modelo *in vivo* (A) y en los grupos Control, DEX, YOH, YOH/DEX, LY, LY/DEX, después de la I/R en el modelo *ex vivo* (B). ANOVA de una vía reveló que el grupo DEX presentó una reducción significativa del tamaño del infarto en comparación con los otros grupos, en ambos modelos. Los valores se expresan como promedios \pm S.E.M, $n = 8$ por grupo, * $p < 0,05$ DEX v/s Control, YOH y YOH/DEX, al final de la reperfusión en el modelo *in vivo*. * $p < 0,05$ DEX v/s Control, YOH, YOH/DEX, LY y LY/DEX, al final de la reperfusión en el modelo *ex vivo* (ANOVA de una vía. Tukey para comparaciones múltiples).

6.3. Dexmedetomidina mejora la función ventricular frente a eventos de isquemia y reperfusión miocárdica

El preconditionamiento con DEX mejoró significativamente la recuperación funcional del VI al final del período de reperfusión, en el modelo *ex vivo* de I/R miocárdica regional. En el modelo *ex vivo*, el efecto preconditionante de DEX comenzó a evidenciarse en la PDVI, al término de la primera hora de reperfusión, sin lograr diferencia significativa al compararse con el resto de los grupos. Al final de las 2 h de reperfusión, se observó una recuperación significativa de la PDVI, $+dP/dt$ max y $-dP/dt$ min, en comparación con el resto de los grupos de estudio. La función ventricular en el grupo YOH fue similar al grupo Control, en todos los tiempos analizados. La mejor recuperación funcional del VI inducida por DEX, al final del período de reperfusión, fue prevenida por la administración concomitante de YOH. En este estudio, la PDFVI, la FC y la PP fueron similares entre los grupos a lo largo de todo el tiempo experimental. Se observó un marcado efecto deletéreo de la I/R regional y del factor tiempo sobre todas las variables hemodinámicas medidas, excepto la FC. La influencia de ambos factores hace que la función ventricular afecte significativamente a todos los grupos de tratamiento por igual. El preconditionamiento con DEX permitió que la función ventricular fuera mejor que en el resto de los grupos de estudio. Sin embargo, esta recuperación nunca alcanzó a los valores basales de función. La Figura 6 muestra los valores promedios de las variables hemodinámicas medidas, antes del preconditionamiento farmacológico y al final de las 2 h de reperfusión.

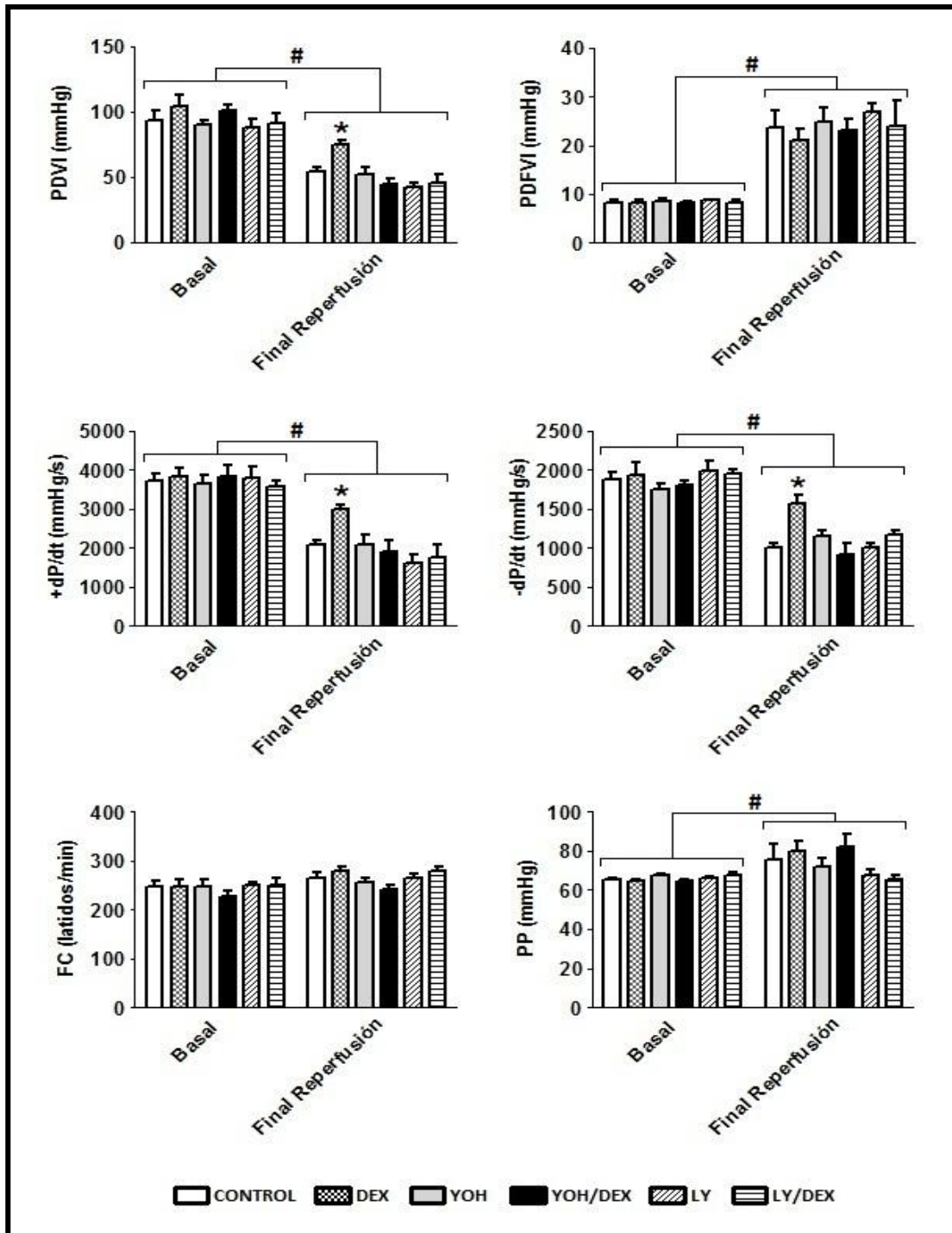


Figura 6. Dexmedetomidina mejora la función ventricular frente a eventos de I/R. Valores promedio de variables hemodinámicas medidas (PDVI, PDFVI, +dP/dt max, -dP/dt min, FC y PP), antes del preconditionamiento farmacológico y al final de 2 h de reperusión. ANOVA (modelo mixto) reveló que al final de la reperusión el grupo DEX presentó una mejor PDVI y mejor +dP/dt max y -dP/dt min, en comparación con los otros grupos. Los valores se expresan como promedios \pm S.E.M, n = 8 por grupo, * p<0,05 DEX v/s Control, YOH, YOH/DEX, LY y LY/DEX, al final de la reperusión en el modelo ex vivo. # p<0,05 Basal vs final reperusión. (ANOVA para mediciones repetidas. Bonferroni para comparaciones múltiples).

6.4. Rol de PI3K en el preconditionamiento inducido por dexmedetomidina

La inhibición de PI3K por LY-294002 evitó la reducción el tamaño del infarto inducida por DEX, en el modelo *in vivo*. En este experimento, el AR, expresada como porcentaje del volumen ventricular, fue similar entre los grupos. La Figura 5B muestra que el preconditionamiento con DEX redujo significativamente el tamaño de infarto (AI) en el AR, en comparación con los otros grupos. La administración de LY-294002 previo a los eventos de I/R, no modificó los tamaños de infarto en comparación con el grupo Control. Sin embargo, la reducción en el tamaño del infarto regional inducida por DEX, fue abolida por la administración concomitante de LY-294002 en el modelo *ex vivo* (Control: $36 \pm 3\%$, DEX: $8 \pm 3\%$, LY: $40 \pm 4\%$, LY/DEX: $38 \pm 4\%$).

El efecto preconditionante de DEX en la función ventricular también se modificó por la administración de LY-294002. En estos experimentos, realizados en el modelo *ex vivo*, DEX mejoró la recuperación de la PDVI, dP/dt max y dP/dt min, en comparación con el resto de los grupos. La función ventricular en el grupo LY fue similar al grupo Control. La mejor recuperación funcional del VI, inducida por DEX fue abolida por la administración concomitante de LY-294002 (Figura 6).

6.5. Detección de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón de rata

Utilizados como controles positivos, se determinó la presencia de subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} en cerebro, riñón, bazo, pulmón e hígado de rata, mediante análisis de Western blot. Con el mismo propósito se determinó la presencia del subtipo de receptor α_{2A} en tejido cerebral y riñón por inmunohistoquímica. Los resultados en estos controles fueron concordantes con lo publicado en la literatura, encontrándose

una distribución diferencial de los distintos subtipos de receptores. La inmunohistoquímica mostró una inmunoreactividad en los vasos sanguíneos y coroides cerebral y en los túbulos de la corteza renal (Figura 7).

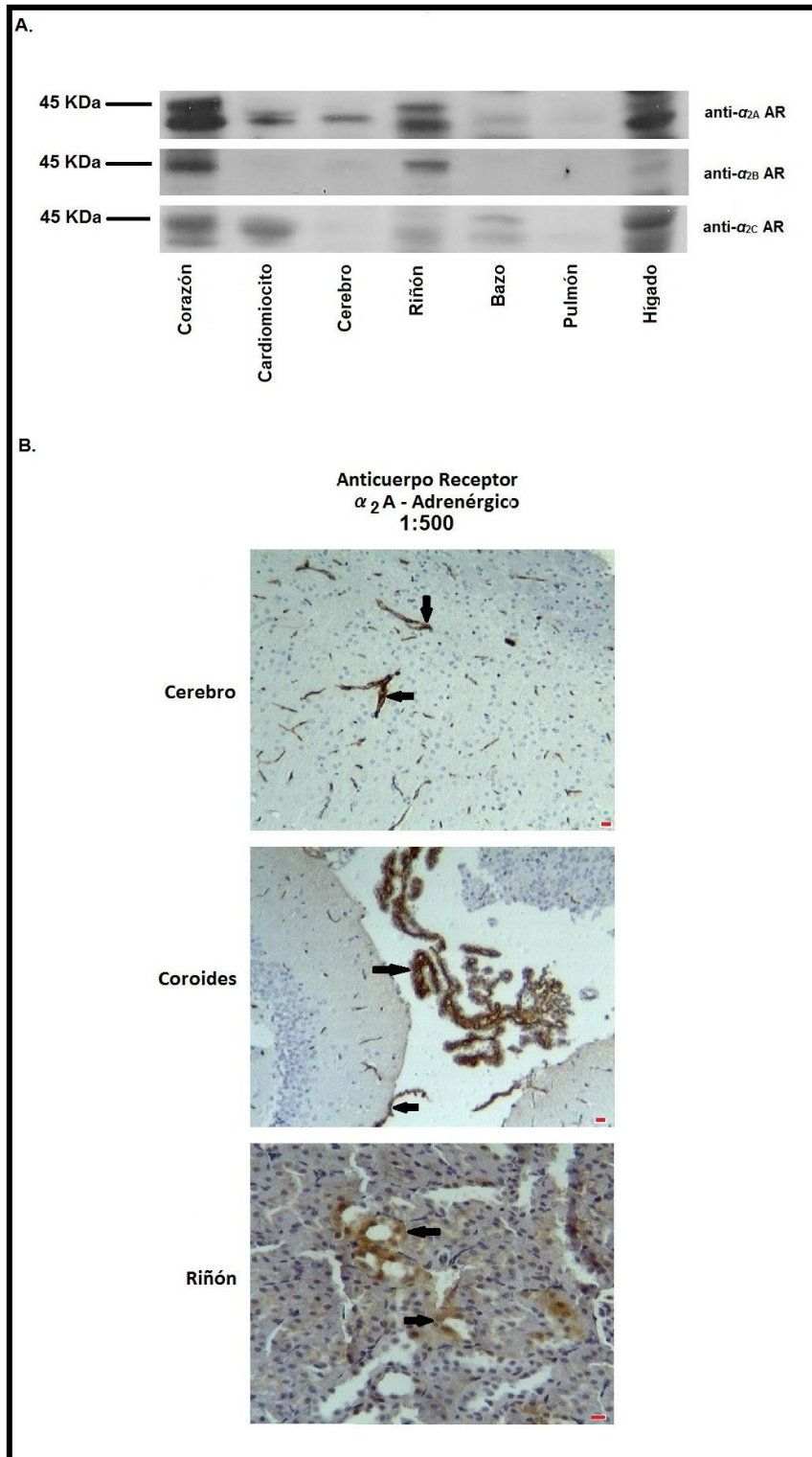


Figura 7. Localización de subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en tejidos de rata.

A. Western blot de subtipos de receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} en distintos tejidos de rata. **B.** Secciones de cerebro y riñón adultos de ratas Sprague-Dawley marcados con anticuerpos para subtipo de receptores α_{2A} (1:500). Las flechas negras indican la inmunodetección de receptores α_{2A} -adrenérgicos. Se encontró inmunoreactividad en los vasos sanguíneos y coroides cerebral y en túbulos corticales del riñón. Escala barra: 20 μ (rojo).

Además se identificó la presencia de los distintos subtipos específicos de receptores α_2 -adrenérgicos por inmunotransferencia en el tejido ventricular de rata adulta y muestras purificadas de cardiomiocitos de ratas adultas. El análisis de Western blot del tejido cardiaco de rata adulta mostró la presencia de bandas de densitométricas con un peso molecular correspondiente a los subtipos de receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} . El análisis de Western blot de los cardiomiocitos aislados de rata adulta mostró sólo presencia de los subtipos α_{2A} y α_{2C} (Fig. 8A). El análisis inmunohistoquímico del tejido ventricular de rata adulta reveló la presencia del subtipo α_{2A} en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los cardiomiocitos, la presencia de α_{2B} en las células musculares lisas de pequeñas arteriolas y venas, y la presencia del subtipo α_{2C} en cardiomiocitos y en las células del músculo liso de las arteriolas y venas (Tabla 1 y Fig. 8B). Estos hallazgos fueron confirmados por un investigador externo, con similares resultados.

Tipo Celular	α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}
Cardiomiocitos	++	-	++
Endotelio	++	-	-
Músculo liso (Vasos sanguíneos)	-	++	++

Tabla 1. Distribución diferencial de los distintos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón.

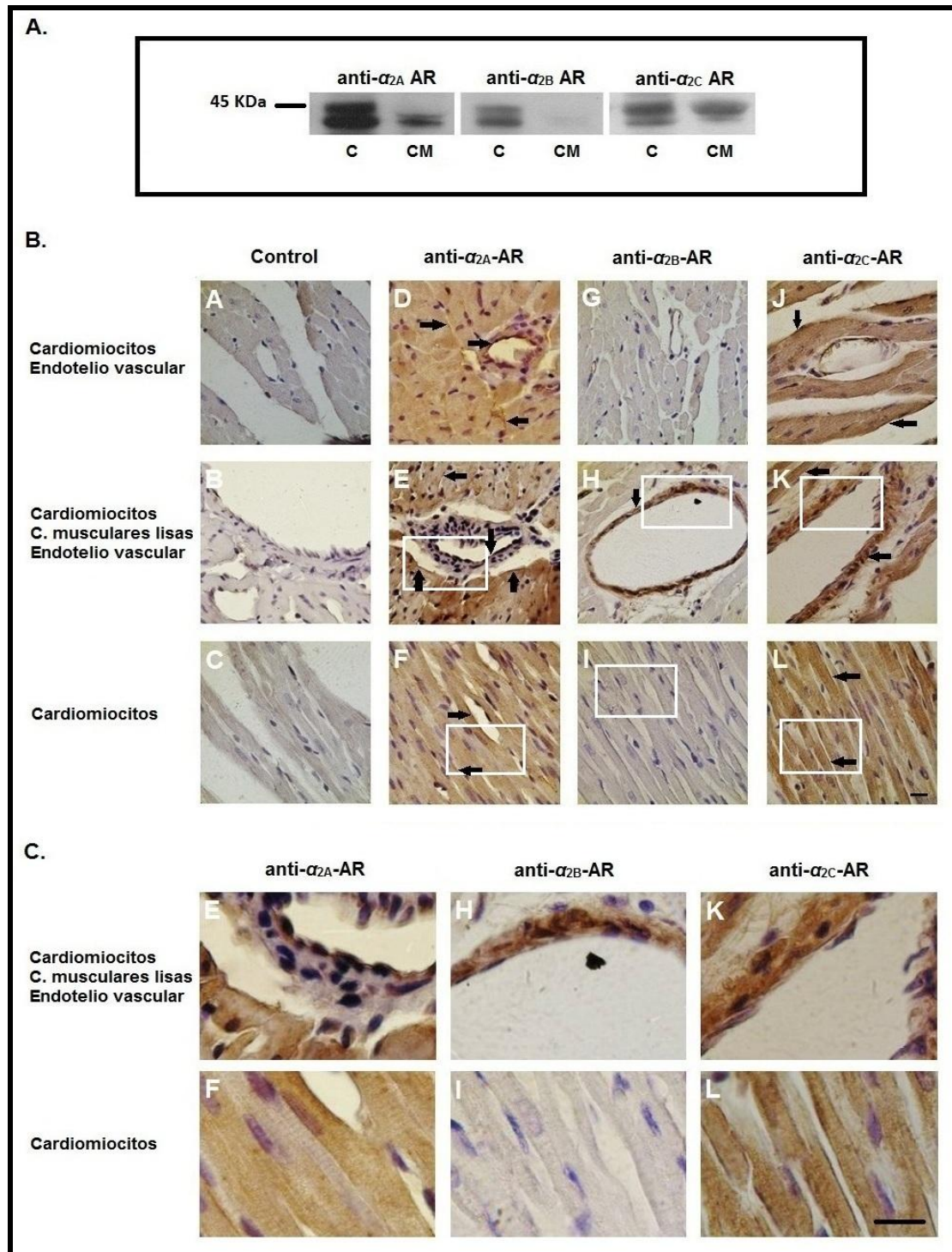


Figura 8. Caracterización de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón. **A.** Western blot de subtipos de receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} . La expresión de subtipos es diferente en el homogeneizado ventricular (Carril C), respecto de cardiomiocitos adultos, aislados (Carril CM). **B.** Secciones de ventrículos adultos marcados con anticuerpos para subtipos de α_{2A} (D,E,F) (1:500), α_{2B} (G,H,I) (1:500) y α_{2C} (J,K,L) (1:500). Todos los controles (sin anticuerpo primario) fueron negativos (A,B,C). Las flechas indican inmunodetección de receptores α_2 -adrenérgicos. **C.** Imágenes aumentadas de áreas marcadas en 8B (recuadros blancos). Se muestra presencia del subtipo α_{2A} en endotelio y en cardiomiocitos, presencia de α_{2B} en células musculares lisas de pequeños vasos sanguíneos y de α_{2C} en cardiomiocitos y en células del músculo liso de arteriolas y venas. Escala barra: 20 μ .

7. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este estudio son: a) el preconditionamiento con DEX reduce el tamaño de infarto y mejora la función ventricular tras un evento de I/R regional del corazón, en los modelos *in vivo* y *ex vivo*; b) el preconditionamiento con DEX estimula la fosforilación de ERK1/2, Akt y eNOS en ambos modelos; c) la administración del antagonista de los receptores α_2 -adrenérgicos YOH previno la cardioprotección y la fosforilación de ERK 1/2, Akt y eNOS dependiente de DEX en ambos modelos; d) la inhibición de PI3K previno la cardioprotección inducida por DEX; e) se demuestra la existencia de, al menos, 2 subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en los cardiomiocitos. Por lo tanto, parece probable que, independientemente de la modulación del sistema nervioso autónomo, los efectos cardioprotectores inducidos por DEX estén mediados, al menos en parte, por la activación de la vía de señalización de sobrevivencia PI3K/Akt, posterior al estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos ubicados en cardiomiocitos.

7.1. Cardioprotección inducida por dexmedetomidina

La investigación previa realizada por Okada *et al.* mostró los efectos cardioprotectores de DEX en un modelo de isquemia global de corazón aislado de rata (156). Ellos encontraron que la administración de DEX antes de una I/R global, disminuía el flujo coronario y disminuía el tamaño del infarto miocárdico. Los autores propusieron que la administración de DEX induce vasoconstricción coronaria por estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos cardiacos, disminuye el flujo coronario, causando isquemia miocárdica y estimulando PCI en el corazón. Este estudio mostró una reducción en el flujo coronario. Sin embargo, la isquemia miocárdica que se hizo referencia durante la administración de DEX no fue demostrada por estos investigadores. Un trabajo anterior,

en personas voluntarias mostró la ocurrencia de vasoconstricción coronaria y reducción del flujo sanguíneo coronario, pero también evidenció una reducción paralela de la demanda miocárdica de oxígeno. No hubo reportes de episodios de isquemia miocárdica en este ensayo (174). A pesar de que en el presente estudio no se determinó el flujo coronario efectivo, las mediciones de la PP en el modelo *ex vivo* no fueron significativamente diferentes de los valores basales en el grupo DEX y fueron similares entre los grupos de estudio durante y después de la infusión del fármaco. No se encontró evidencia de isquemia miocárdica durante la administración de DEX. Por lo tanto, la teoría de que la administración de DEX produce un PCI parece improbable.

En otro sentido, debido a que los eventos de isquemia e infarto miocárdicos perioperatorios son regionales y no globales, los modelos *in vivo* y *ex vivo* de nuestra investigación fueron elegidos y desarrollados para examinar el efecto cardioprotector de la DEX contra episodios de I/R regional, explorar los mecanismos subyacentes a la protección en condiciones controladas y evaluar el impacto de los efectos neurohumorales del SNA en dicha cardioprotección. En este estudio, ambos modelos mostraron una proporción similar de la capacidad cardioprotectora de DEX después de la I/R regional. La administración profiláctica de DEX redujo el tamaño del infarto del miocardio en la zona de riesgo en casi un 28% en ambos modelos y mejoró significativamente la recuperación de la función miocárdica en el modelo *ex vivo*. Ambos efectos beneficiosos, inducidos por DEX sobre el miocardio, se perdieron con la administración de YOH. Esta evidencia sugiere que los efectos cardioprotectores inducidos por la DEX son mayoritariamente mediados por una respuesta molecular río abajo de la estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos cardiacos y no son exclusivamente el resultado de una modulación sistémica neurohumoral. Además, se evaluó la idea de que cualquier fármaco α_2 -agonista potencialmente induce cardioprotección. En un modelo *ex vivo* de I/R miocárdica global

se exploró la capacidad cardioprotectora de xilazina (XLZ) y la pérdida de esta cardioprotección al adicionar yohimbina. XLZ es un reconocido agonista de receptores α_2 -adrenérgicos y la evidencia aportada por otros investigadores muestra que los corazones de animales anestesiados con dosis repetidas de XLZ presentan efectos cardioprotectores en estudios de I/R miocárdica (175,176). En el Anexo 1 se entregan detalles acerca de los métodos empleados y los resultados de la evaluación del efecto cardioprotector inducido por XLZ. Nuestros resultados muestran que el preconditionamiento cardiaco con XLZ reduce los tamaños de infartos y mejora significativamente la función miocárdica en el modelo *ex vivo* de I/R global. Además, la cardioprotección inducida por XLZ se previno por la adición de YOH. Estos hallazgos confirman la participación de los receptores α_2 -adrenérgicos cardiacos en la cardioprotección inducida por dexmedetomidina.

7.2. Activación de la vía RISK por dexmedetomidina

El presente estudio muestra que el preconditionamiento con DEX aumenta los niveles de las formas fosforiladas de ERK1/2, Akt y eNOs. Estas kinasas se activan durante eventos de I/R, pero a niveles insuficientes para producir cardioprotección. Un estímulo más poderoso ya sea de naturaleza mecánica o farmacológica es necesario para conferir protección. El PCI y el PCF inducen una respuesta bifásica en la activación de las kinasas asociadas a sobrevida, con una primera fase que ocurre inmediatamente después de las maniobras de preconditionamiento y una segunda fase de activación que ocurre durante la reperfusión y después de la injuria isquémica (93,94,125). De esta forma, para inducir protección, es necesaria la activación de la vía PI3K/Akt/eNOS tanto posterior al preconditionamiento, como también durante la reperfusión. Estudios previos han mostrado que las vías de sobrevida activadas interactúan entre sí; con una vía

influyendo en la activación de otra (177). En este estudio sólo se determinó la activación de ERK1/2, Akt y eNOS posterior a la infusión de DEX y antes del insulto isquémico. Este hecho justifica y hace interesante poder determinar los niveles de fosforilación de estas kinasas, después de la reperfusión de corazones tratados con DEX. Además, este estudio evaluó la relación causal entre la activación de vías de señalización asociadas a sobrevida, inducida por DEX y la capacidad preconditionante del fármaco frente a eventos de I/R regional. Nuestros hallazgos confirman la hipótesis planteada que DEX induce la activación de componentes de señalización molecular asociados con cardioprotección, a través de la estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos cardiacos. Para demostrar este vínculo se investigaron los efectos de la inhibición de PI3K en la recuperación de la función miocárdica y reducción del tamaño del infarto después de una I/R regional, en el modelo *ex vivo*. Los resultados mostraron que la activación de la vía PI3K/Akt activada por DEX, es esencial para conferir protección frente eventos de I/R miocárdica. En este estudio no se exploró la inhibición de la activación de ERK1/2. Por lo tanto, sería interesante explorar el papel de la cascada de señalización MEK1/2-Erk1/2 en el preconditionamiento por DEX.

Desde el punto de vista molecular, casi todas las estrategias cardioprotectoras actualmente disponibles activan vías de señalización canónicas asociadas con la sobrevida celular (91,95). Varios agentes farmacológicos han mostrado ser cardioprotectores mediante la unión específica a un RAPG. La unión de un ligando específico a un RAPG resulta en la activación de cascadas de señalización de PI3K/Akt y Ras-MEK1/2-ERK1/2 (95). Los mecanismos moleculares involucrados en la activación de ERK y Akt río abajo de la estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos vinculados a adenilato ciclasa aún no se conocen completamente. La evidencia disponible muestra que algunas de las respuestas celulares observadas tras la estimulación de receptores

α_2 -adrenérgicos, son mediadas por la señalización de las vías Erk y PI3K/Akt (178-182). Estudios previos han mostrado activación de ERK y Akt posterior a la estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos, como consecuencia de una transactivación de receptores del factor de crecimiento epidermal (EGF). Un paso clave en la subsecuente activación de estas kinasas, es la participación de PI3K, río abajo de la transactivación del receptor EGF (178,182). Si bien, se ha demostrado previamente que ERK se activa por PI3K por distintos receptores acoplados a proteínas Gq/i, entre los que se incluyen a los receptores α_2 -adrenérgicos y muscarínicos M₃ (182-184), el mecanismo por el cual PI3K contribuiría a la activación de la vía ERK aún no está claro y merece un análisis más profundo en futuras investigaciones. DEX es un potente agonista de receptores α_2 -adrenérgicos que ejerce su acción asociándose a proteínas G mayoritariamente inhibitorias. No sorprende entonces, haber encontrado en este estudio, activación de ERK 1/2, Akt y eNOs posterior al preconditionamiento con DEX. La identificación de una cascada transduccional integrada por receptor EGF/PI3K/Akt/Erk como un importante componente en la señalización de receptores α_2 -adrenérgicos en otros tejidos, abre la posibilidad que la cardioprotección inducida por DEX frente a eventos de I/R miocárdica regional pueda ser mediada por este mecanismo.

7.3. Rol del receptor α_2 -adrenérgico en la cardioprotección inducida por dexmedetomidina

Poder dilucidar los mecanismos moleculares de la cardioprotección inducida por DEX puede tener importantes implicancias en el desarrollo de estrategias de cardioprotección perioperatoria. Este trabajo está lejos de entregar una respuesta completa a los mecanismos implicados en el preconditionamiento por DEX, pero aclara algunos aspectos relacionados con esta materia. Tomando en cuenta este argumento, se

exploró además, la localización de los receptores α_2 -adrenérgicos potencialmente implicados en el preconditionamiento por DEX. Estudios previos han mostrado evidencia que avala la existencia de los tres subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en ratas y humanos (161,162). La expresión y distribución de los diferentes subtipos de receptores es específica para cada tejido y diferente de una especie a otra. Los hallazgos de estudios que hacen referencia a la localización y distribución de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en los tejidos de ratas, carecen de consenso y presentan importantes contradicciones entre ellos (161-163). A pesar de todo lo anterior, se ha mostrado la presencia de los tres subtipos receptores α_2 -adrenérgicos en aurículas y ventrículos de rata (164). En diferentes tejidos humanos, estos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos están ampliamente distribuidos y muestran una expresión distintiva en algunos órganos, con el corazón expresando los tres subtipos (165). Este hecho es especialmente relevante ya que los resultados de este estudio podrían ser extrapolados al corazón humano. Nuestra investigación confirma la existencia de los tres subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en el corazón de rata, pero con un patrón de distribución diferente para cada subtipo. El análisis de Western blot en extractos proteicos de cardiomiocitos aislados de rata adulta mostró la presencia de los subtipos α_{2A} y α_{2C} , pero no el subtipo α_{2B} . Por otra parte, el análisis inmunohistoquímico de ventrículos completos en este estudio reveló la presencia de los subtipos α_{2A} y α_{2C} en los cardiomiocitos. Estos hallazgos coinciden con el potencial mecanismo subyacente del preconditionamiento inducido por DEX en el corazón y sugiere que el estímulo de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos α_{2A} y/o α_{2C} en la superficie de los cardiomiocitos activaría a las proteínas quinasas asociadas a sobrevivencia en estas células, protegiéndolas frente a eventos de I/R miocárdica regional. Determinar cuál de los dos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos encontrados en los cardiomiocitos, tiene mayor trascendencia en la cardioprotección inducida por dexmedetomidina, escapa a los objetivos propuestos en esta investigación.

Será necesario realizar estudios de afinidad y función, mediante la inhibición específica de los subtipos α_{2A} y α_{2C} para poder dilucidar este punto particular. Sabemos por estudios previos que diversos antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos muestran afinidades distintas para cada subtipo descrito (160,185). Sin embargo, la evidencia disponible sugiere que no existiría una diferencia significativa en la afinidad de diferentes agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos por los distintos subtipos de receptores (185). Este pareciera ser el caso de la DEX, que tendría una afinidad en el rango nM, similar para los dos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos α_{2A} y α_{2C} (144), los que serían redundantes en la función de proteger al corazón frente a eventos de I/R.

7.4. Mecanismo asociado a la cardioprotección inducida por dexmedetomidina

El presente estudio demuestra la capacidad preconditionante de la DEX frente a eventos de I/R miocárdica regional y describe algunos de los probables mecanismos moleculares asociados a la cardioprotección inducida por el fármaco. En el momento en que se inició esta investigación, los estudios en animales y en humanos sugerían potenciales efectos cardioprotectores de la DEX, en la medida que este fármaco era capaz de modular el SNA, disminuyendo la actividad simpática y el estrés sobre el sistema cardiovascular. El trabajo de Okada *et al.*, publicado en 1997, mostró por primera vez que el preconditionamiento con DEX producía cardioprotección frente a eventos de isquemia global de corazones aislados de rata, al estimular receptores α_2 -adrenérgicos postsinápticos. Sin embargo hasta la fecha, ningún estudio ha explorado los mecanismos moleculares de cardioprotección generados por el preconditionamiento con DEX. En este estudio hemos confirmado que el preconditionamiento con DEX produce cardioprotección morfológica y funcional, posterior a eventos de I/R miocárdica -en este caso regional-, mediante el estímulo de receptores α_2 -adrenérgicos postsinápticos. Hemos mostrado que

independiente de la modulación del SNA, el estímulo de los receptores α_2 -adrenérgicos postsinápticos por DEX, genera cardioprotección y causa activación de algunas de las mismas kinasas pertenecientes a la vía RISK (Erk, Akt, eNOS), relacionadas previamente con la cardioprotección inducida por otras maniobras de PCI y PCF. Además, hemos mostrado que la inhibición de la activación de la vía de señalización PI3K-Akt, evita la cardioprotección inducida por DEX. Finalmente, hemos logrado identificar la presencia de receptores α_2 -adenérgicos en diversos tipos celulares miocárdicos. En este sentido, haber encontrado existencia de los subtipos α_{2A} y α_{2C} en los cardiomiocitos es relevante y apoya la sospecha de que la DEX produciría cardioprotección mediante un mecanismo molecular similar al producido por otros fármacos con capacidad preconditionante. La Figura 9 resume los avances aportados por esta investigación en el entendimiento y comprensión del potencial mecanismo molecular asociado al preconditionamiento por DEX. Estos hallazgos apoyan la idea que la DEX no es sólo útil como sedante en la práctica clínica, sino que también podría desempeñar un papel fundamental en la cardioprotección perioperatoria. En un momento en que los efectos cardioprotectores de los fármacos recomendados en el perioperatorio de pacientes de alto riesgo cardiovascular son debatidos, los esfuerzos de investigación deben estar dirigidos a esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en la cardioprotección de los anestésicos actuales. Los beneficios potenciales del preconditionamiento con DEX en los pacientes de alto riesgo cardiovascular sometidos a cirugía son importantes.

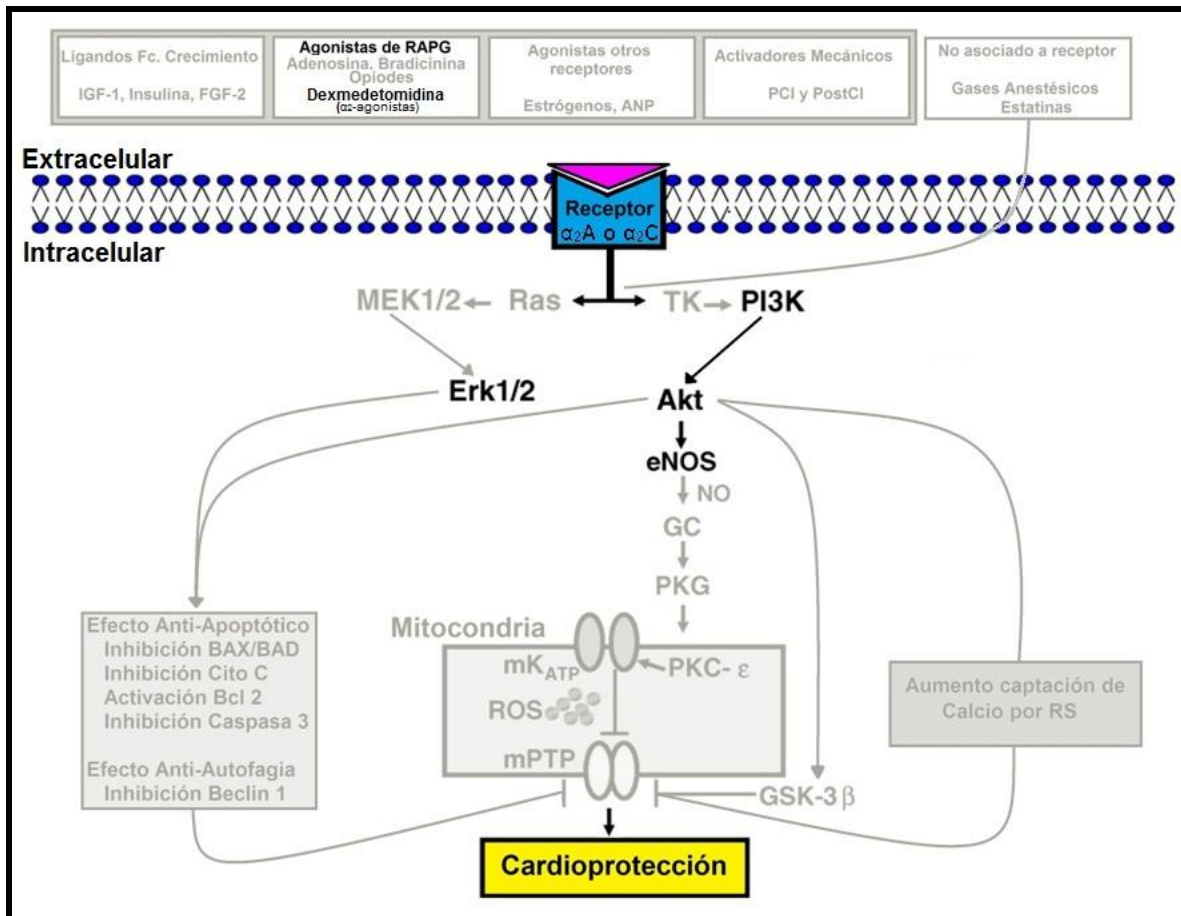


Figura 9. Vía transduccional RISK y dexmedetomidina. Diagrama esquemático de los mecanismos moleculares de preconditionamiento, asociados a maniobras cardioprotectoras previamente descritas. Destacados y sobrepuestos al diagrama se muestran los potenciales elementos asociados al preconditionamiento por dexmedetomidina, descubiertos en este estudio (texto en **negrita** y elementos coloreados), (modificada desde Hausenloy D, Yellon D (94,95)).

7.5. Otros probables mecanismos de cardioprotección inducidos por dexmedetomidina

En la cardioprotección inducida por DEX encontrada en este estudio no se puede descartar la participación de otros componentes conocidos, que han sido relacionados con cardioprotección. Sabemos que durante la reperfusión, posterior a un evento isquémico,

las EROs se producen en cantidades muy superiores a las que las defensas antioxidantes fisiológicas (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa), pueden manejar y evitar el daño en un tejido (186). Previamente en neuronas de hipocampo y giro dentado de ratas sometidas a I/R se ha observado que DEX aumenta la actividad de enzimas antioxidantes, disminuye la producción de lipoperoxidación y reduce los niveles plasmáticos de citokinas (187). Por lo tanto, en este estudio no se puede descartar potenciales efectos protectores de la DEX, al modular la producción de EROs.

En el mismo sentido, las especies reactivas de nitrógeno también se han implicado en el daño por I/R (188). En bajas concentraciones, las EROs y las especies reactivas de nitrógeno están estrechamente vinculadas y se comportan como segundos mensajeros en la función celular normal. Durante la reperfusión de un territorio isquémico se producen altos niveles de ambas especies y ambas juegan un rol fisiopatológico, al interrumpir la normalidad las vías de señalización. Algunos estudios han mostrado que la limitación de la producción de NO durante episodios de I/R puede reducir el grado de daño miocárdico (189,190). Otros informes han sugerido que el NO y el peroxinitrito podrían inhibir caminos críticos en la generación de EROs (NADPH oxidasa y XO) (191,192). Esta inhibición en la formación de EROs y la limitación del daño miocárdico también se ha observado con el aporte de NO exógeno, mediante la administración de donantes farmacológicos de NO (193-195). Un estudio reciente muestra este doble papel del NO en el corazón. Esta investigación muestra la ausencia de adaptación del miocardio sometido a I/R inducida por el NO y, por otro lado, una influencia positiva de NO en los mecanismos de cardioprotección provocada por el PCI (196). La administración de DEX produce importantes aumentos en la producción de NO en el endotelio (157). Aparentemente esta producción elevada de NO sería útil para contrarrestar la vasoconstricción producida por la DEX, al estimular receptores α_2 -adrenérgicos ubicados

en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, evitando así una potencial isquemia de un territorio particular (197). Okada *et al.* mostraron algún grado de vasoconstricción coronaria en los corazones de rata que recibieron DEX, sin demostrar la producción de isquemia miocárdica (156). En este estudio hemos mostrado la presencia de receptores α_2 -adrenérgicos en el endotelio de vasos coronarios; pero no hemos estudiado la producción de NO por el endotelio, como tampoco su influencia en la cardioprotección observada. Si, hemos demostrado, que el preconditionamiento con DEX aumenta la fosforilación de eNOS en el miocardio. Esta proteína forma parte de la vía de señalización cardioprotectora RISK, río abajo de la activación de Akt. Sin embargo, no se estudiaron los potenciales efectos cardioprotectores que el aumento en la actividad de la eNOS pudo haber desencadenado en la cardioprotección observada y su relación con la inhibición en la producción de EROs, apertura de canales mKATP, estabilización del PTPM y nitrosilación de proteínas que se relacionan con el metabolismo del calcio intracelular (198).

Finalmente, los fibroblastos son el tipo celular más frecuente en el corazón y juegan un papel fundamental en la regulación de la función fisiológica de este órgano, como así también en la remodelación del miocardio en respuesta a estímulos patológicos como la hipertensión arterial, el infarto agudo del miocardio y la insuficiencia cardiaca. Comparados con los fibroblastos cardiacos, los cardiomiocitos son particularmente sensibles a la hipoxia y al efecto de las EROs. Los fibroblastos son capaces de adaptarse a diferentes tensiones de oxígeno, alterando y modificando su actividad. La hipoxia estimula la diferenciación a miofibroblastos, reduce la proliferación celular, aumenta la síntesis de colágeno, reduce la actividad de las metaloproteinasas II y estimula la secreción de citoquinas y factores de crecimiento. La reoxigenación lleva a proliferación celular y es un potente estímulo para aumentar el recambio de matriz extracelular, lo que

resulta en la síntesis de colágeno I y III y metaloproteinasas (199). Ahora bien, pareciera ser que en la cardioprotección temprana inducida por DEX, los fibroblastos no tendrían una participación directa, aparente. Sabemos que los fibroblastos cardiacos expresan receptores adrenérgicos β_2 , pero no β_1 ni β_3 ; así como tampoco, a ninguno de los miembros de la familia de receptores α -adrenérgicos (199-200). En nuestro estudio, el análisis inmunohistoquímico no mostró la presencia de ninguno de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en fibroblastos. Por lo tanto, debido a que los efectos de los adrenérgicos en los fibroblastos son predominantemente mediados por la activación de receptores β_2 , es poco probable que la DEX tuviera algún efecto directo sobre este tipo celular.

7.6. Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones de este estudio son: a) si bien, logró demostrar que el preconditionamiento con DEX produce cardioprotección en los modelos *in vivo* y *ex vivo*, no se realizaron estudios complementarios que dieran cuenta de la protección inducida por DEX a nivel celular, disminuyendo niveles de apoptosis y/necrosis. En este sentido habría sido útil contar con experimentos que hubiesen evaluado niveles de caspasa 3, TUNEL y muerte en cultivos de cardiomiocitos sometidos a I/R. Resultados positivos en estos experimentos podrían haber apoyado fuertemente nuestros hallazgos. Futuras investigaciones podrían aclarar este punto. b) El preconditionamiento con DEX aumentó de los niveles de las formas fosforiladas de ERK1/2, Akt y eNOS antes de la I/R, siendo significativamente revertidos por la administración de YOH y mostramos la importancia de PI3K en la cardioprotección inducida por DEX. Sin embargo, no se exploraron los mecanismos subyacentes involucrados en la activación de ERK1/2, Akt y eNOS, río abajo del estímulo de los receptores adrenérgicos α_{2A} y α_{2C} . Como se mencionó previamente,

la transactivación del receptor de EGF podría estar involucrada en la activación de ambas kinasas. Tampoco se estudió la relevancia de ERK1/2 en la cardioprotección temprana inducida por DEX. Ambos tópicos previamente enunciados merecen una mayor exploración. c) Si bien es cierto, que nuestro estudio mostró que el preconditionamiento con DEX mejoró el rendimiento ventricular frente a eventos de I/R en el modelo *ex vivo*, debido a limitaciones del diseño experimental, no se determinó la función ventricular en los estudios *in vivo*. Será importante contar con estos resultados y confirmar los hallazgos en el modelo *in vivo*. d) La participación de otros componentes relacionados con cardioprotección que pudiesen haber influido en nuestros resultados y que no fueron estudiados no se pudo descartar, tales como la potencial capacidad antioxidante de DEX o su influencia en los eventuales aumentos en los niveles de NO generados en el endotelio de los vasos coronarios. Estudios que analicen estos aspectos son necesarios.

8. CONCLUSIONES

- El preconditionamiento cardiaco con dexmedetomidina produce cardioprotección frente a eventos regionales de isquemia y reperfusión miocárdica.
- La capacidad preconditionante de dexmedetomidina frente a la I/R miocárdica regional se evidencia morfológica y funcionalmente al reducir los tamaños de los infartos en el área de riesgo, mejorando la función contráctil global del ventrículo afectado.
- La cardioprotección inducida por el preconditionamiento con dexmedetomidina tiene relación con cambios moleculares en el tejido miocárdico y no sería sólo consecuencia de la modulación neurohumoral provocada por el fármaco.
- Dexmedetomidina induce activación de componentes de la vía transduccional RISK, muy probablemente al estimular receptores α_2 -adrenérgicos ubicados a nivel de los cardiomiocitos. Esta activación de la vía RISK por la acción de dexmedetomidina, es una condición necesaria y fundamental para lograr proteger al miocardio del daño asociado a I/R regional.
- Los hallazgos de este estudio sugieren a dexmedetomidina como una alternativa real en el manejo perioperatorio de pacientes con riesgo de experimentar eventos isquémicos. Esta aseveración requiere de validación clínica, propiciando la realización de estudios clínicos controlados para confirmar los beneficios encontrados en el laboratorio.

9. REFERENCIAS

- 1) Omran AR. The epidemiologic transition: a theory of epidemiology of population change. *Millbank Memorial Fund Q* 1971; 49: 509-38.
- 2) Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001; 104: 2746-53.
- 3) Koch E, Otárola A, Manríquez L, Kirschbaum A, Paredes M, Silva C. Predictors of non fatal cardiovascular events in a Chilean cohort. Results of the San Francisco Project. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1002-1012.
- 4) Instituto Nacional de Estadísticas (INE). ANUARIO DE ESTADÍSTICAS VITALES Año 2003.
- 5) Instituto Nacional de Estadísticas (INE). Mortalidad. Tablas abreviadas por estado civil y sexo. País 2001-2002.
- 6) Corbalán R. ¿Qué podemos hacer para modificar los factores de riesgo coronario? *Rev Esp Cardiol* 2006; 59: 1089-92.
- 7) República de Chile. Ministerio de Salud de Chile. Departamento de Epidemiología. Encuesta Nacional de Salud 2003.
- 8) Bustos P, Amigo H, Arteaga A, Acosta AM, Rona R. Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 973-980.
- 9) Palomo I, Torres G, Alarcón M, Maragaño P, Leiva E, Mujica V. Alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos en una población de estudiantes universitarios de la región centrosur de Chile. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59: 1100-6.
- 10) Instituto Nacional de Estadísticas (INE). CHILE: Proyecciones y Estimaciones de Población. Total País. Período de Información: 1950-2050.
- 11) Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, Clemmensen PM, Dellborg M, Hod H, Porela P, Underwood R, Bax JJ, Beller GA, Bonow R, Van der Wall EE, Bassand JP, Wijns W, Ferguson TB, Steg PG, Uretsky BF, Williams DO, Armstrong PW, Antman EM, Fox KA, Hamm CW, Ohman EM, Simoons ML, Poole-Wilson PA, Gurfinkel EP, Lopez-Sendon JL, Pais P, Mendis S, Zhu JR, Wallentin LC, Fernández-Avilés F, Fox KM, Parkhomenko AN, Priori SG, Tendera M, Voipio-Pulkki LM, Vahanian A, Camm AJ, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Morais J, Brener S, Harrington R, Morrow D, Lim M, Martinez-Rios MA, Steinhilb S, Levine GN, Gibler WB, Goff D, Tubaro M, Dudek D, Al-Attar N. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116: 2634-53.
- 12) Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250.
- 13) Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA Jr, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol* 1974; 74: 399-422.
- 14) Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990; 82: S112-12.
- 15) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-74.
- 16) Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 1976; 193: 1094-1100.

- 17) Choy PC, Siow YL, Mymin D. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 212-24.
- 18) Badimon L, Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Rodríguez C, Padró T. Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006; 6: 439-56.
- 19) Shmitz G, Grandl M. Role of redox regulation and lipid raft in macrophages during ox-LDL-mediated foam cell formation. *Antiox Redox Signal* 2007; 9: 1499-518.
- 20) Camejo G, Hurt-Camejo, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998; 139: 205-22.
- 21) Hurt-Camejo, Camejo G, Rosengren B, López F, Ahlström C, Fager G, Bondjers G. Effects of proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 569-83.
- 22) Watanabe T, Fan J. Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int J Cardiol* 1998; 66 Suppl 1: S45-53.
- 23) Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 63-71.
- 24) Keiper T, Al-Fakhri N, Chavakis E, Athanasopoulos AN, Isermann B, Herzog S, Saffrich R, Hersemeyer K, Bohle RM, Haendeler J, Preissner KT, Santoso S, Chavakis T. The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *FASEB J*. 2005; 19: 2078-80.
- 25) Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Liyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107:1255-62.
- 26) Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 348-58.
- 27) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2462-78.
- 28) Lee JM, Lindsay AC, Kyliantreas I, Choudhury RP. Atherosclerosis regression. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2008; 10: 187-94.
- 29) Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 189-205.
- 30) Curfman GD. Is exercise beneficial—Or hazardous—To your heart? *N Engl J Med* 1993; 329: 1730-1731.
- 31) Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56: 786–794.
- 32) McCord, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 3: 159–163.
- 33) Braunwald E, Kloner R. A. Myocardial reperfusion a double-edge sword? *J Clin Invest* 1985; 76: 1713–1719.
- 34) van Domburg RT, Sonnenschein K, Nieuwlaet R, Kamp O, Storm CJ, Bax JJ, Simoons ML. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 15–20.

- 35) Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 372–385.
- 36) Levitsky S. Protecting the myocardial cell during coronary revascularization. *Circulation* 2006; 114: S339-43.
- 37) Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291–300.
- 38) Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9: 245–249.
- 39) Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 448–460.
- 40) Thygesen K, Alpert JS, White HD on behalf of the joint ESC/ACCF/AHA/WHT Task force for the redefinition of myocardial infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28: 2525-38.
- 41) Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985; 56: 262-78.
- 42) Fleet WF, Johnson TA, Graebner CA, Gettes LS. Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K^+ , pH and activation in the pig. *Circulation* 1985; 72: 922-32.
- 43) Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986; 18: 769-80.
- 44) Rovetto MJ, Lamberton WF, Neely JR. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res* 1975; 37: 742-51.
- 45) Jennings RB, Steenbergen C Jr. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol* 1985; 47: 727-49.
- 46) Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, Gonzalez MA, Solares J, Julia M, Barrabes JA, Soler-Soler J. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* 1997; 96: 3579–86.
- 47) Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabes JA, Pina P, Agullo L, Piper HM, Soler-Soler J. Effect of inhibition of Na^+/Ca^{2+} exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 739–748.
- 48) Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987; 60: 700-7.
- 49) Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H^+-Na^+ and Na^+-Ca^{2+} exchange. *Circ Res* 1989; 65: 1045-56.
- 50) Eigel BN, Gursahani H, Hadley RW. ROS are required for rapid reactivation of Na^+/Ca^{2+} exchanger in hypoxic reoxygenated guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 2004; 286: H955-63.
- 51) Hoshida S, Kuzuya T, Yamashita N, Oe H, Fuji H, Hori M, Tada M, Kamada T. Brief myocardial ischemia affects free radical generating and scavenging system in dogs. *Heart Vessels* 1993; 8: 115-20.
- 52) Marber MS, Yellon DM. Myocardial adaptation, stress proteins and second window of protection. *Ann N Y Acad Sci*. 1996; 30: 123-41.

- 53) Takano H, Tang XL, Qiu Y, Guo Y, French BA, Bolli R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res* 1998; 83: 73-84.
- 54) Neely JR, Rovetto MJ, Whitmer JT, Morgan HE. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am J Physiol* 1973 ;225: 651-8.
- 55) Lopaschuk GD, Spafford MA. Energy substrate utilization by isolated working hearts from newborn rabbits. *Am J Physiol* 1990; 258: H1274-80.
- 56) Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1383-95.
- 57) Cairns CB, Ferroggiaro AA, Walther JM, Harken AH, Banerjee A. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 1997; 96: S260-5.
- 58) Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: H2240-6.
- 59) Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988; 82: 476-85.
- 60) Di Lisa F, Canton M, Menabo R, Dodoni G, Bernardi P. Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res Cardiol* 2003; 98: 235– 41.
- 61) Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 339– 41.
- 62) Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, Crago MS, Reimer KA. Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1571-88.
- 63) Sun D, Nguyen N, DeGrado TR, Schwaiger M, Brosius FC 3rd. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* 1994; 89: 793-8.
- 64) Flameng W, Andres J, Ferdinande P, Mattheussen M, Van Belle H. Mitochondrial function in myocardial stunning. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1-11.
- 65) Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D, Pouleur H, Hue L. Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage. *Biochem J* 1992; 281: 709-15.
- 66) Eberli FR, Weinberg EO, Grice WN, Horowitz GL, Apstein CS. Protective effect of increased glycolytic substrate against systolic and diastolic dysfunction and increased coronary resistance from prolonged global underperfusion and reperfusion in isolated rabbit hearts perfused with erythrocyte suspensions. *Circ Res* 1991; 68: 466-81.
- 67) Rodríguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D. Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 207–216.
- 68) Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004; 95: 957–70.
- 69) Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 372– 85.
- 70) Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 365–371.

- 71) Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003; 3: 527-35.
- 72) Depre C, Vatner SF. Cardioprotection in stunned and hibernating myocardium. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 307-17.
- 73) Diamond GA, Forrester JS, deLuz PL, Wyatt HL, Swan HJ. Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation. *Am Heart J* 1978; 95: 204-09.
- 74) Rahimtoola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985; 72: V123-V135.
- 75) Theroux P, Ross J Jr, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S. Coronary arterial reperfusion. III. Early and late effects on regional myocardial function and dimensions in conscious dogs. *Am J Cardiol* 1976; 38: 599–606.
- 76) Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; 56: 978–985.
- 77) Ambrosio G, Betocchi S, Pace L, Losi MA, Perrone-Filardi P, Soricelli A et al. Prolonged impairment of regional contractile function after resolution of exercise-induced angina. Evidence of myocardial stunning in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 94: 2455-64.
- 78) Ambrosio G, Tritto I. Clinical manifestations of myocardial stunning. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 357-361.
- 79) Bolli R. Myocardial 'stunning' in man. *Circulation* 1992; 86: 1671-91.
- 80) Kudej RK, Kim SJ, Shen YT, Jackson JB, Kudej AB, Yang GP et al. Nitric oxide, an important regulator of perfusioncontraction matching in conscious pigs. *Am J Physiol* 2000; 279: H451–H456.
- 81) Depre C, Tomlinson JE, Kudej RK, Gaussin V, Thompson E, Kim SJ et al. Gene program for cardiac cell survival induced by transient ischemia in conscious pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9336-41.
- 82) Depre C, Kim SJ, John AS, Huang Y, Rimoldi OE, Pepper JR et al. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium. *Circ Res* 2004; 95: 433-440.
- 83) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36.
- 84) Baxter GF, Yellon DM. Ischaemic preconditioning of myocardium: a new paradigm for clinical cardioprotection? *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38: 381-7.
- 85) Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delay preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1023-34.
- 86) Das DK, Moraru II, Maulik N, Engelman RM. Gene expression during myocardial adaptation to ischemia and reperfusion. *Annals NY Acad Sci* 1994; 723: 292-307.
- 87) Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2003; 285: H579-88.
- 88) Staat P, Rioufol G, MD, Piot C, MD, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, MD, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112: 2143-48.
- 89) Downey J, Davis A, Cohen M. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 181-88.

- 90) Jakob Vinten-Johansen. Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 235-44.
- 91) Gross E, Gross G. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 212 -21.
- 92) Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004; 95: 230-32.
- 93) Hausenloy D, Tsang A, Mocanu M, Yellon D. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion. *Am J Physiol* 2005; 288: H971-76.
- 94) Hausenloy D, Yellon D. Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. *Pharmacol Ther* 2007; 116: 173-91.
- 95) Hausenloy D, Yellon D. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007; 12:217-34.
- 96) Freude B, Masters TN, Robicsek F et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 197-208.
- 97) Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003; 59:132-42.
- 98) Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94: 960–66.
- 99) Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 311–318.
- 100) Zatta AJ, Kin H, Lee G et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 315-24.
- 101) Krolikowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth* 2006; 53: 174–182.
- 102) Wang C, Neff DA, Krolikowski JG et al. The influence of B-cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits. *Anesth Analg* 2006; 102: 1355-60.
- 103) Feng J, Fischer G, Lucchinetti E et al. Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology* 2006; 104: 1004–1014.
- 104) Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005; 111: 194-97.
- 105) Smith CC, Mocanu MM, Davidson SM, Wynne AM, Simpkin JC, Yellon DM. Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol* 2006; 149:5-13.
- 106) Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* 2005; 103: 987-95.
- 107) Pagel PS, Krolikowski JG, Neff DA et al. Inhibition of glycogen synthase kinase enhances isoflurane-induced protection against myocardial infarction during early reperfusion in vivo. *Anesth Analg* 2006; 102: 1348-54.

- 108) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 2004; 113: 1535-49.
- 109) Costa AD, Garlid KD, West IC et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 2005; 97: 329-36.
- 110) Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol* 2006; 291: H2067-74.
- 111) Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 2006; 281: 20801-808.
- 112) Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1943-50.
- 113) Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001; 20: 7779-86.
- 114) Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D et al. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 346-53.
- 115) Burton KP, McCord JM, Ghai G. Myocardial alterations due to freeradical generation. *Am J Physiol* 1984; 246: H776.
- 116) Ytrehus K, Myklebust R, Mjos OD. Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res* 1986; 20: 597-603.
- 117) Zweier JL. Measurement of superoxide derived free radicals in the reperfused heart: evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988; 263: 1353– 7.
- 118) Morihira M, Hasebe N, Baljinniyam E, Sumitomo K, Matsusaka T, Izawa K, Fujino T, Fukuzawa J, Kikuchi K. Ischemic preconditioning enhances scavenging activity of reactive oxygen species and diminishes transmural difference of infarct size. *Am J Physiol* 2006; 290: H577-83.
- 119) Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 461-70.
- 120) Budas GR, Mochly-Rosen D. Mitochondrial protein kinase Cepsilon (PKCepsilon): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35: 1052-4.
- 121) Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, Ovize M. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 115-22
- 122) Zhou RH, Long C, Liu J, Liu B. Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger protects the immature rabbit myocardium from ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Cardiol*. 2008; 29: 113-20.
- 123) Kis A, Baxter GF, Yellon DM. Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A₁/A_{2A} receptor agonist: role of A_{2A} receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17: 415-25.
- 124) Park SS, Zhao H, Jang Y, Mueller RA, Xu Z. 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* 2006; 318: 124–31.

- 125) Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 642-49.
- 126) Pratt P, Wang C, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten J, Pagel PS, Wartier D. Cardioprotection by volatile anesthetics: new applications for old drugs? *Curr Opin Anaesthesiol* 2006; 19:397-403.
- 127) Sanada S, Asanuma H, Minamino T et al. Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation* 2004; 110: 2143-49.
- 128) Mangano D, Goldman L. Preoperative assessment of patients with known or suspected coronary disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 1750-7.
- 129) Fleisher LA, Eagle KA. Clinical practice: lowering cardiac risk in noncardiac surgery. *N Engl J Med* 2001; 345: 1677- 82.
- 130) Lee TH, Marcantonio ER, Mangione CM, et al. Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation* 1999; 100: 1043-9.
- 131) Mangano D. Perioperative cardiac morbidity. *Anesthesiology* 1990; 72: 153-84.
- 132) Boersma E, Poldermans D, Bax JJ, et al. Predictors of cardiac events after major vascular surgery: role of clinical characteristics, dobutamine echocardiography and betabloquer therapy. *JAMA* 2001; 285: 1865-73.
- 133) Landesberg G. The pathophysiology of perioperative myocardial infarction: facts and perspectives. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2003; 17: 90-100.
- 134) Mangano D, Hollenberg M, et al. Perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery: Incidence and severity during the 4 day perioperative period. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 843-50.
- 135) Raby KE, Barry J, et al. Detection and significance of intraoperative and postoperative myocardial ischemia in peripheral vascular surgery. *JAMA* 1992; 268: 222-27.
- 136) Raby KE, Brull SJ, et al. The effect of heart rate control on myocardial ischemia among high risk patients after vascular surgery. *Anesth Analg* 1999; 88: 477-82.
- 137) Lee A, Fleisher, Joshua A, Beckman, Kenneth A, Brown, Hugh Calkins, Elliott Chaikof, Kirsten E, Fleischmann, William K, Freeman, James B, Froehlich, Edward K, Kasper, Judy R, Kersten, Barbara Riegel, John F, Robb. ACC/AHA 2007 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Care for Noncardiac Surgery. *Circulation* 2007; 116: 418-99.
- 138) Wallace A, Galindez D, Salahieh A, Layug E, Lazo E, Haratonik K, Boisvert D, Kardatzke D. Effect of clonidine on cardiovascular morbidity and mortality after noncardiac surgery. *Anesthesiology* 2004; 101: 284-93.
- 139) Oliver M, Goldman L, Julian D, Holme I. Effect of mivazerol on perioperative cardiac complications during non-cardiac surgery in patients with coronary heart disease: The European Mivazerol Trial. *Anesthesiology* 1999; 91: 951-61.
- 140) Wijeyesundera D, et col. Alpha-2 adrenergic agonists to prevent perioperative cardiovascular complications: A meta-analysis. *Am J Med* 2003; 114: 742-52.
- 141) Biccard BM, Goga S, de Beurs J. Dexmedetomidine and cardiac protection for non-cardiac surgery: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Anaesthesia* 2008; 63: 4-14.
- 142) Virtane R, Savola JM, Saano V, Nyman L. Characterization of the selectivity, specificity, and potency of metomidine as an α_2 -adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1988; 150: 9-14.

- 143) Masuki S, Dinunno F, Joyner M, Eisenach J. Selective α_{2B} -adrenergic properties of dexmedetomidine over clonidine in the human forearm. *J Appl Physiol* 2005; 99: 587-92.
- 144) Ruuskanen J, Laurila J, Xhaard H, Rantanen VV, Vuoriluoto K, Wurster S, Marjamäki A, Vainio M, Johnson M, Scheinin M. Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish α_2 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 165-77
- 145) Bhana N, Goa KL, Mc Clellan KJ. Dexmedetomidine. *Drugs* 2000; 59: 263-68.
- 146) Bylund DB. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 22: 835-43.
- 147) Bylund DB, Regan JW, Faber JE, Hieble JP, Triggle CR, Ruffolo RR Jr. Vascular alpha-adrenoceptors: From the gene to the human. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 533-43.
- 148) Bloor B, Ward D, Belleville J, Maze M. Effects of intravenous dexmedetomidine in humans II. Hemodynamic changes. *Anesthesiology* 1992; 77: 1134-42.
- 149) Macmillan LB, Hein L, Smith M, Piascik M, Limbird L. Central hypotensive effects of the alpha2a adrenergic receptor subtype. *Science* 1996; 273: 801-3.
- 150) Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS, Kobilka BK. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 1996; 273: 803-5.
- 151) Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of α_2 adrenergic receptors subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol* 2002; 283: R287-95.
- 152) McSPI-EUROPE Research Group: Perioperative sympatholysis – beneficial effects of α_2 -adrenoceptor agonist mivazamol on hemodynamic stability and myocardial ischemia. *Anesthesiology* 1997; 86: 346-63.
- 153) Willigers HM, Prinzen FW, Roekaerts P, MD, de Lange S, Durieux ME. Dexmedetomidine decreases perioperative myocardial lactate release in dogs. *Anesth Analg* 2003; 96: 657-64.
- 154) Willigers HM, Prinzen FW, Roekaerts P. The Effects of esmolol and dexmedetomidine on myocardial oxygen consumption during sympathetic stimulation in dogs. *J Card Vascular Anesthesia* 2006; 20: 364-370.
- 155) Guo H, Takahashi S, Cho S, Hara T, Tomiyasu S, Sumikawa K. The Effects of dexmedetomidine on left ventricular function during hypoxia and reoxygenation in isolated rat hearts. *Anesth Analg* 2005; 100: 629 -35.
- 156) Okada H, Kurita T, Mochizuki T, Morita K, Sato S. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts. *Resuscitation* 2007; 74: 538-45.
- 157) Joshi M, T. Ferguson B, Johnson F, Johnson R, Parthasarathy S, Lancaster J. Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 9982-87.
- 158) Bylund D. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 763:1-7.
- 159) Blaxall H, Heck D, Bylund D. Molecular determinants of the alpha-2D adrenergic receptor subtype. *Life Sci* 1993; 53: 255-59.
- 160) Bylund D. Subtypes of alpha1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB J* 1992; 6: 832-39.
- 161) Lorenz W, Lomasney J, Collins S, Regan J, Caron M, Lefkowitz R, Expression of three α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat tissues: implications for α_2 receptor classification. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 599-603.

- 162) Berkowitz D, Price D, Bello E, Page S, Schwinn D, Localization of messenger RNA for three distinct alpha 2-adrenergic receptor subtypes in human tissues. Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology. *Anesthesiology* 1994; 81: 1235-1244.
- 163) Handy D, Flordellis C, Bogdanova N, Bresnahan M, Gavras H, Diverse tissue expression of rat alpha 2-adrenergic receptor genes. *Hypertension* 1993; 21: 861-65.
- 164) El-Ayoubi R, Menaouar A, Gutkowska J, Mukaddam-Daher S, Imidazoline receptors but not alpha2-adrenoceptors are regulated in spontaneously hypertensive rat heart by chronic moxonidine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 446-451.
- 165) Eason M, Liggett S, Human α_2 -adrenergic receptor subtype distribution: widespread and subtype-selective expression of α_2c10 , α_2c4 , and α_2c2 mRNA in multiple tissues. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 70-75.
- 166) Ruffolo R, Sulpizio A, Nichols A, DeMarinis R, Hieble J. Pharmacological differentiation between pre- and postjunctional α_2 -adrenoceptors by SK&F 104078. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 336: 415-8.
- 167) Seitelberger R, Guth B, Heush G, Lee J, Katayama K, Ross Jr J. Intracoronary α_2 -adrenergic receptor blockade attenuates ischemia in conscious dogs during exercise. *Circ Res* 1988; 62: 436-42.
- 168) Downey James, PhD. University of South Alabama. Measuring infarct size by tetrazolium method. <http://www.usouthal.edu/ishr/help/ttc/>
- 169) Klein. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch* 1981; 393: 287-97.
- 170) Collins T, ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 2007; 43: 25-30.
- 171) Vicencio JM, Ibarra C, Estrada M, Chiong M, Soto D, Parra V, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology* 2006; 147: 1386-95.
- 172) Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 19115-19124.
- 173) Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346-356.
- 174) Snapir A, Posti J, Kentala E, Koskenvuo J, Sundell J, Tuunanen H, Hakala K, Scheinin H, Knuuti J, Scheinin M, Effects of low and high plasma concentrations of dexmedetomidine on myocardial perfusion and cardiac function in healthy male subjects. *Anesthesiology* 2006; 105: 902-910.
- 175) Sloan R, Rosenbaum M, O'Rourke D, Oppelt K, Frasier C, Waston C, Allan A, Brown D. High doses of ketamine-xylazine anesthesia reduce cardiac ischemia-reperfusion injury in guinea pigs, *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011; 50: 349-54.
- 176) Haessler R, Kuzume K, Chien G, Wolff R, Davis R, Van Winkle D, Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning, *Cardiovasc Res.* 1994; 28: 1574-80.
- 177) Hausenloy D, Mocanu M, Yellon D, Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 305-312.
- 178) Buffin-Meyer B, Crassous P, Delage C, Denis C, Schaak S, Paris H. EGF receptor transactivation and PI3-kinase mediate stimulation of ERK by α_2A -adrenoreceptor in intestinal epithelial cells: A role in wound healing. *Eur J Pharmacol* 2007; 574: 85-93.

- 179) El-Assal O, Besner G. HB-EGF enhances restitution after intestinal ischemia/reperfusion via PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 activation. *Gastroenterol* 2005; 129: 609-25.
- 180) Roberts R. α 2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in porcine palmar lateral vein: role of phosphatidylinositol 3-kinase and EGF receptor transactivation. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 107-16
- 181) Wheeler L, WoldeMussie E, Lai R. Role of alpha-2 agonists in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2003; 48: S47-S51.
- 182) Karkoulias G, Mastrogianni O, Lympelopoulou A, Paris H, Flordellis C. α 2-adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR. *Cell Signal* 2006; 18: 729-39.
- 183) Cheng K, Zimniak P, Raufman J. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of H508 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 6744-50.
- 184) Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 1997; 16: 7032-44.
- 185) Nicholas AP, Pieribone V, Dagerlind A, Meister B, Elde R, Hökfelt T. *In situ* hybridization A complementary method to radioligand-mediated autoradiography for localizing adrenergic, alpha-2 receptor-producing cells. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 763: 222-42.
- 186) Zweier J, Talukder M. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-90.
- 187) Eser O, Fidan H, Sahin O, Cosar M, Yaman M, Mollaoglu H, Songur A, Buyukbas S, The influence of dexmedetomidine on ischemic rat hippocampus. *Brain Res* 2008; 1218: 250-256.
- 188) Zimmet J, Hare J. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation* 2006; 114: 1531-44.
- 189) Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, Lopez B, Koch W, Chan L, Goldstein BJ, Ma X. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 2007; 115 :1408-16.
- 190) Li D, Qu Y, Tao L, Liu H, Hu A, Gao F, Sharifi-Azad S, Grunwald Z, Ma X, Sun J. Inhibition of iNOS protects the aging heart against beta-adrenergic receptor stimulation-induced cardiac dysfunction and myocardial ischemic injury. *J Surg Res* 2006; 131: 64-72.
- 191) Lee C, Liu X, Zweier J. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275: 9369-76.
- 192) Lee C, Miura K, Liu X, Zweier J. Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275: 38965-72.
- 193) Lefer DJ. Emerging role of nitrite in myocardial protection. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 1127-38.
- 194) Shiva S, Huang S, Grubina R, Ringwood L, MacArthur P, Xu X, Darley-Usmar V, Gladwin M. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res* 2007; 492: 654-61.
- 195) Tota B, Quintieri M, Angelone T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr Med Chem* 2010; 17: 1915-25.

- 196) Andelova E, Bartekova M, Pancza D, Styk J, Ravingerova T. The role of NO in ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24: 411-26.
- 197) Snapir A, Talke P, Posti J, Huiku M, Kentala E, Scheinin M. Effects of nitric oxide synthase inhibition on dexmedetomidine induced vasoconstriction in healthy human volunteers. *Br J Anaesth* 2009; 102: 38-46.
- 198) Calvert J, Lefer D. Myocardial protection by nitrite. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 195-203.
- 199) Porter K, Turner N. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009; 123: 255-78.
- 200) Meszaros J, Gonzalez A, Endo-Mochizuki Y, Villegas S, Villarreal F, Brunton L. Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between Gq and Gs. *Am J Physiol* 2000; 278: C154-62.

10. ANEXO

10.1. Precondicionamiento con xilazina

Xilazina (XLZ) es un fármaco ampliamente utilizado en la práctica médica veterinaria y en la investigación con animales, ya que produce antinocicepción, sedación y relajación muscular. Además es un reconocido agonista de receptores α_2 -adrenérgicos [1,2]. Existe evidencia de que los efectos inducidos por XLZ pueden ser bloqueados por yohimbina (YOH) [3]. XLZ, utilizada como anestésico en combinación con ketamina, ha demostrado reducir los tamaños del infarto del miocardio y mejorar la función hemodinámica de corazones sometidos a I/R, en una forma dosis dependiente [4,5].

El propósito de los siguientes experimentos realizados en un modelo *ex vivo* de I/R miocárdica global consistió en determinar el efecto cardioprotector de XLZ, la reversión de estos efectos mediante YOH y, de esta manera, confirmar que la cardioprotección inducida por los agonistas α_2 -adrenérgicos se produce por estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos. Los experimentos se realizaron en un modelo Langendorff de corazón de rata Sprague-Dawley adulta, como se describe en Materiales y Métodos de este estudio. Cada rata se anestesió con pentobarbital (80 mg/kg IP). Posteriormente, se realizó una esternotomía y se administró heparina de 100 U/kg IV. El corazón se removió rápidamente, montó en una cámara y perfundido por vía retrógrada a través de la aorta ascendente, utilizando una bomba de infusión peristáltica (Gilson Minipuls3, Francia) a flujo constante de 10-14 ml/min para generar una presión de perfusión coronaria (PPC) de 60-70 mmHg, con solución buffer Krebs Henseleit modificado, pH 7,4 a 37° C, en equilibrio con una mezcla de 95% O₂/5% de CO₂. La temperatura del perfusado y del baño de la cámara, se mantuvieron a 37° C. Un balón de látex insertado en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral, se conectó a un transductor de presión y se llenó de solución fisiológica para producir una presión diastólica final en el ventrículo izquierdo (PDFVI) de 5-10 mmHg. El volumen del balón se mantuvo constante durante todo el experimento. Después de 15 min de estabilización, los corazones con PDVI menores de 60 mmHg y frecuencia cardíaca (FC) de menos de 180 latidos por min, se excluyeron del estudio. Los corazones restantes se sometieron a una isquemia normotérmica global, producida por la interrupción del flujo coronario por un período de 30 min, seguida de reperfusión de 120 min.

Para determinar si la cardioprotección inducida por XLZ se revierte por el antagonismo de los receptores α_2 -adrenérgicos, los corazones se asignaron aleatoriamente a uno de tres grupos de estudio (Control, XLZ, YOH/XLZ), después de 20 min de estabilización y antes de la isquemia

global (Fig. Anexo 1). Al final del período de reperfusión, los corazones se perfundieron con trifeniltetrazolio al 1% (TTC) en buffer fosfato (pH 7,4), durante 7 min y luego se sumergieron en esta solución por otros 7 min. Luego los corazones se congelaron a -20°C durante 1 h y se cortaron en seis rebanadas transversales (2 mm) a lo largo del eje largo del ventrículo izquierdo, desde el vértice a la base. Las áreas de infarto se determinaron por la inclusión de los cortes en formaldehído al 10% por 24 h. Posteriormente los cortes se colocaron en un soporte de plexiglás y cubiertos por un cristal. Dos cuñas de 2 mm en las esquinas mantuvieron separadas ambas superficies. Abrazaderas de resorte se utilizaron para presionar ambas superficies, aplastando las rebanadas en un grosor uniforme de 2 mm. Luego, se tomó una fotografía digital de las rebanadas de corazón. Para cada sección de ventrículo, la medición del tamaño del área de infarto, se realizó mediante planimetría con el programa Image J [6]. El área del infarto se expresó como un porcentaje del volumen de los ventrículos (área de riesgo (AR)). La PDFVI, la presión sistólica máxima del ventrículo izquierdo (PSVI), el pico máximo positivo y negativo de la derivada de la presión del VI ($+dP/dt_{\text{max}}$, $-dP/dt_{\text{min}}$), la frecuencia cardíaca (FC) y la PPC se midieron y registraron continuamente, durante todo el experimento, en un ordenador personal, a través de un PowerLab (ML866 ADInstruments, Australia). La presión desarrollada por el VI (PDVI) se calculó de la siguiente manera: $\text{PDVI} = \text{PSVI} - \text{PDFVI}$ (mmHg).

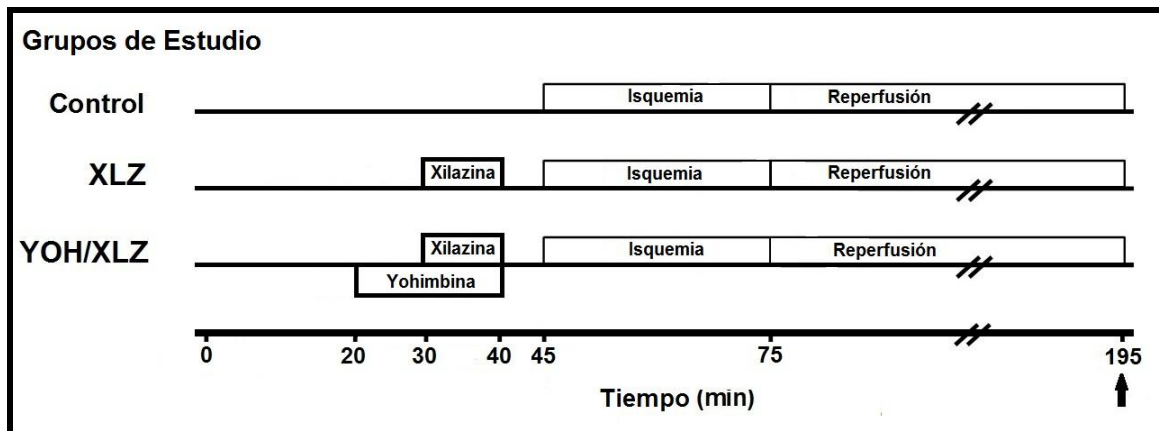


Figura Anexo 1: Protocolo experimental del modelo *ex vivo* de ischemia global 30 min y reperfusión 120 min. Control: sin preconditionamiento, XLZ: preconditionamiento con XLZ $2,4\ \mu\text{M}$ (10 min), YOH/XLZ: preconditionamiento con YOH $5\ \mu\text{M}$ YOH (20 min) y preconditionamiento con XLZ $2,4\ \mu\text{M}$ (10 min). Flecha negra muestra el momento de la medición de datos hemodinámicos y medición del tamaño del infarto del miocardio.

Resultados:

El preconditionamiento con Xilazina disminuyó el tamaño infarto del miocardio en un modelo *ex vivo* de I/R global. Como se muestra en la Fig. Anexo 2, el preconditionamiento con XLZ redujo significativamente el tamaño del infarto en el AR, comparado con los otros grupos en el modelo *ex vivo*. Sin embargo, la reducción inducida por XLZ fue prevenida por YOH.

El preconditionamiento con Xilazina mejora la recuperación funcional del VI en un modelo *ex vivo* de I/R global. La administración de XLZ antes de la I/R miocárdica global, mejoró significativamente la PDVI al final de la reperfusión (Fig. Anexo 3). En la misma dirección, el grupo tratado con XLZ mostró una tendencia a mejorar la $+dP/dt_{max}$ y la $-dP/dt_{min}$, al final de la reperfusión. YOH revirtió los efectos inducidos por XLZ (Fig. Anexo 3).

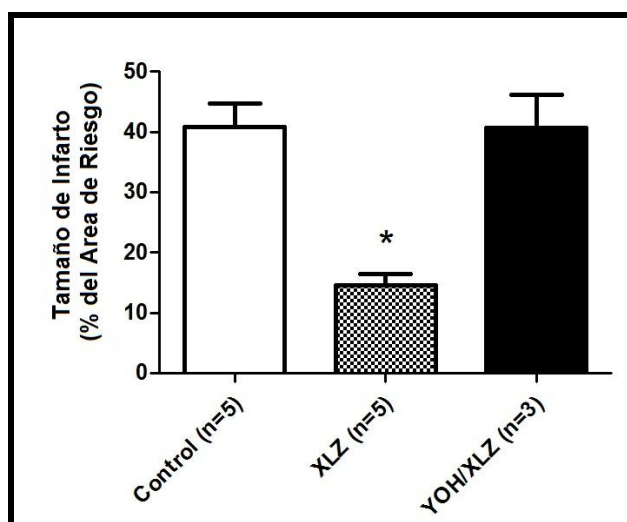


Figura Anexo 2: XLZ induce cardioprotección frente al daño por I/R miocárdica global. Los medias de los tamaños de infarto en el grupo control (40,9%), grupo XLZ (14,6%) y grupo YOH/XLZ (40,7%) después de la I/R miocárdica global, en el modelo *ex vivo*. El análisis con ANOVA de una vía reveló que el preconditionamiento con XLZ, resultó en una reducción significativa del tamaño del infarto en comparación con los otros grupos. Los valores se expresan como media \pm SEM, * $p < 0,05$ v/s control y XLZ YOH/XLZ al final de la reperfusión. (Anova de una vía, Tukey para comparaciones múltiples).

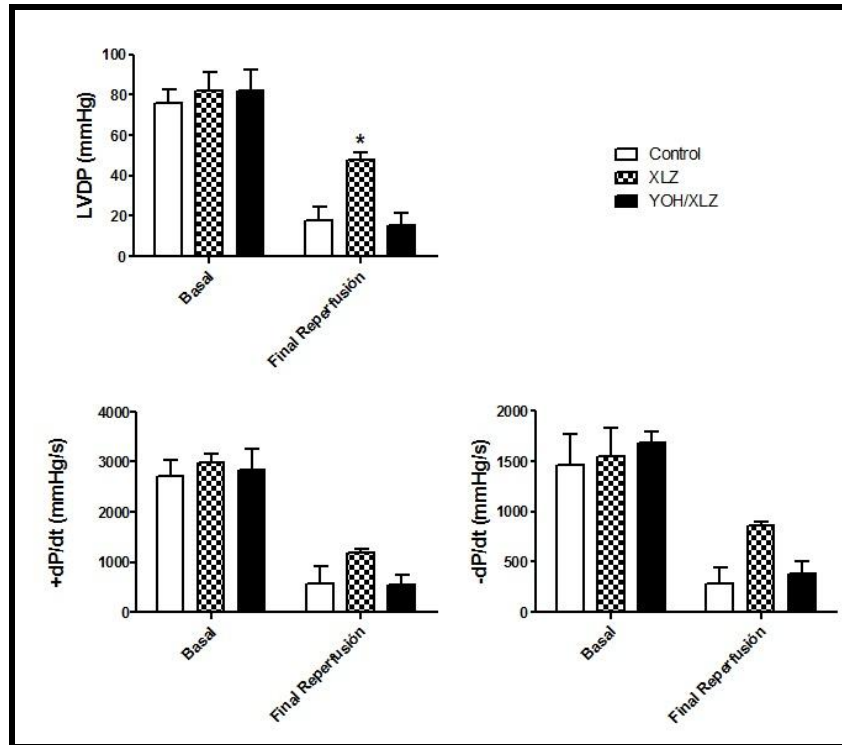


Figura Anexo 3: XLZ mejora la función miocárdica frente al daño por I/R miocárdica global. Las medias de las variables hemodinámicas (PDVI, $+dP/dt_{max}$, $-dP/dt_{min}$), antes del preconditionamiento y al final de la reperfusion de 120 min, en el modelo ex vivo. El análisis de ANOVA (modelo mixto) reveló que en comparación con otros grupos, el grupo XLZ mostró una mejora significativa de la PDVI al final de la reperfusion. Los valores se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ XLZ v/s control y YOH/XLZ, al final de la reperfusion. (ANOVA para mediciones repetidas, Bonferroni para comparaciones múltiples).

Referencias Anexo:

- [1]. Romero T, Duarte I, α_2 -Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat, *Eur J Pharmacol.* 613 (2009) 64-7.
- [2]. Hsu WH. Xylazine-induced depression and its antagonism by alpha adrenergic blocking agents, *J Pharmacol Exp Ther.* 218 (1981)188-92.
- [3]. Melo A, Ferreira I, Rocha C, Grecco R, Chronic activation of central α_2 .adrenoceptors prevents hypertension in DOCA-salt rats, *Auton Neurosci.* 82 (2000) 146-53.
- [4]. Sloan R, Rosenbaum M, O'Rourke D, Oppelt K, Frasier C, Waston C, Allan A, Brown D, High doses of ketamine–xylazine anesthesia reduce cardiac ischemia–reperfusion injury in guinea pigs, *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 50 (2011) 349-54.
- [5]. Haessler R, Kuzume K, Chien G, Wolff R, Davis R, Van Winkle D, Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning, *Cardiovasc Res.* 28 (1994) 1574-80.
- [6]. Collins T, ImageJ for microscopy, *Biotechniques.* 43 (2007) 25-30.