

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE EL DAÑO
CAUSADO POR LA REPERFUSIÓN EN UN MODELO DE
INFARTO EN CORAZÓN AISLADO DE RATA**

Mauricio Andrés Quezada Catalán

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS MENCIÓN FISIOPATOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dra. Gina Sánchez Vergara

2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Mauricio Andrés Quezada Catalán

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas y Biológicas con mención en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de marzo de 2016.

**Prof. Dra. Gina Sánchez Vergara
Director(a) de Tesis
(lugar)**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr.

Prof. Dr.

**Prof. Dr.
Presidente Comisión**

A mi familia, por ser el soporte de mi vida. Y muy especialmente a mis padres, fuente inagotable de apoyo y gestores de cada rasgo positivo que hay en mí.

“Yo soy yo y mi circunstancia, y si no la salvo a ella no me salvo yo”

Meditaciones del Quijote

José Ortega y Gasset

Agradecimientos

ÍNDICE

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Animales Y Métodos.....	17
Resultados.....	22
Discusión.....	37
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados y se produce por un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno a un determinado territorio del músculo cardiaco. El restablecimiento del flujo sanguíneo también produce daño celular y los principales responsables de este daño en una primera etapa son la sobrecarga de calcio y la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. En este trabajo nos centramos en el daño producido por estas especies reactivas.

El uso de antioxidantes para disminuir el daño por estrés oxidativo en la reperfusión ha sido explorado en una serie de modelos, con información contradictoria dependiendo del antioxidante y del protocolo utilizado. Mientras algunos autores han reportado una mayor viabilidad celular y una disminución en la producción de agentes oxidantes en cultivo de cardiomiocitos adultos sometidos a hipoxia o hipoxia/reoxigenación usando dosis de 50 μM de dehidroascorbato, otros han reportado que el uso de ascorbato en protocolos de preconditionamiento isquémico en corazón de cerdo puede incluso anular el efecto protector de esta maniobra.

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar el efecto del ácido ascórbico administrado previo a la isquemia y durante el tiempo que duró la reperfusión, sobre el daño que se produce durante esta última etapa, para describir su efecto en este periodo. Se trabajó con corazones aislados de rata, perfundidos en un sistema de Langendorff y sometidos a diferentes protocolos de isquemia global seguida de reperfusión, en presencia y ausencia de estos agentes antioxidantes. En nuestro modelo, el ácido ascórbico mejora parcialmente la actividad contráctil, evita parcialmente la disminución del contenido total de glutatión, sin modificar la concentración de isoprostanos en el efluente. Además, evita la degradación del receptor de ryanodina, pero no de mitofusina 2 ni de eNOS, y no tiene efecto sobre la incorporación de NEM-Biotina ni sobre la carbonilación de proteínas.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the main causes of death in developed countries. The AMI is caused by an imbalance between the supply and demand of oxygen by the cardiac muscle. The reestablishment of the blood flow generates cellular damage. The agents responsible of cellular damage in the early stage are calcium overload and the generation of reactive oxygen and nitrogen species. In this study, we focused on the damage caused by the reactive oxygen and nitrogen species.

The use of antioxidants agents to diminish the damage by oxidative stress in the reperfusion has been studied under different models with contradictory results. Some researchers have reported higher cellular viability and a reduction on the production of oxidative agents under laboratory conditions. On the other hand, several studies have reported that ascorbate can nullify the protective effect of antioxidants under an ischemic preconditioning protocol.

The main objective of this work was to study the effect of ascorbic acid, administered prior to the ischemic episode, and on the damage produced on the reperfusion stage. We used a Langendorff apparatus with isolated rat hearts under different global ischemic protocols followed by reperfusion. We then applied two different treatments one with and other without antioxidants agents. Our results showed that ascorbic acid has a protective effect by improving the contractile activity, maintaining the total glutathione content and by preserving the isoprostane release. In addition, our findings showed that the ascorbic acid avoids the degradation of the ryanodine receptor but not the degradation of mitofusin 2 or eNOS. We did not find an effect of ascorbic acid over the NEM-Biotine incorporation or over the protein carbonylation.

1.- INTRODUCCIÓN

El infarto agudo de miocardio es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, siendo su principal causa la oclusión trombótica de un vaso dentro del sistema de las arterias coronarias. La isquemia miocárdica aparece cuando el aporte de oxígeno al corazón es insuficiente para cubrir sus necesidades metabólicas. De inmediato se inician alteraciones funcionales y bioquímicas que –de mantenerse el insulto isquémico- conducirán a la muerte celular [Bond *et al*, 1991; Lemasters *et al*, 1996]. La terapia de reperfusión es la única maniobra que puede salvar al músculo isquémico, sin embargo durante su primera etapa gatilla una cascada de eventos que para la célula son nocivos, generando más daño celular, que se traduce en mayor tamaño de infarto y contribuye a la disfunción ventricular característica de esta patología. Se habla de esta manera del daño por isquemia y reperfusión (IR). El daño en este periodo de reperfusión está determinado principalmente por sobrecarga intracelular con calcio y por la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) [Misra *et al*, 2009; Perrelli *et al*, 2011].

Especies reactivas y estrés oxidativo

Un radical libre es una molécula que tiene un electrón desapareado en su orbital externo, lo cual las vuelve inestables y reactivas [Gutteridge y Halliwell, 2001]. Entre estas moléculas nos encontramos con radicales libres del oxígeno tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), generado por varios mecanismos como la oxidación del NADPH por parte de la NADPH oxidasa, oxidación de la xantina o hipoxantina por parte de la xantino oxidasa, oxidación de NADH, NADPH, o $FADH_2$ por el sistema de transporte de electrones de la mitocondria, autooxidación de monoaminas, flavinas y hemoglobina en presencia de metales de transición, reducción del O_2 por parte del citocromo P450 y reducción de O_2 por parte de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cuando hay deficiencia de cofactores o de su sustrato L-arginina. Entre los radicales libres del nitrógeno está el óxido nítrico (NO), producido principalmente por la actividad de la NOS. Estos radicales libres pueden ser transformados en otras especies reactivas no radicalarias tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el

peroxinitrito (ONOO^-). Los ROS y RNS involucran de esta manera a especies radicalarias y no radicalarias. Estos compuestos son muy importantes y en concentraciones fisiológicas participan en una serie de mecanismos de señalización intracelular, diferenciación celular y procesos mitóticos, entre otros. Hablamos de estrés oxidativo (EO) cuando hay un desbalance entre la presencia de pro-oxidantes y antioxidantes en las células en donde, a consecuencia de la alta producción de ROS y RNS, éstos se transforman en un agente citotóxico y dañino [Gutteridge y Halliwell, 2001; Fang *et al*, 2002; Elahi *et al*, 2009].

Cuando se restablece el aporte de oxígeno al inicio de la reperfusión, éste participa en la generación de gran cantidad de estos compuestos. Las mayores fuentes de ROS y RNS en el miocardio reperfundido son: la xantino oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, la NOS, los citocromos mitocondriales, la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y la hemoglobina [Kuzkaya *et al*, 2003; Landmesser *et al*, 2003; Penna *et al*, 2009]. Los mecanismos por los que el EO causa daño en un tejido son variados y van desde la modificación de proteínas y lípidos hasta cambios en la expresión génica y activación de vías proapoptóticas. Es bien sabido que los aminoácidos de las proteínas pueden sufrir diferentes modificaciones al exponerse ante agentes oxidantes. Hay modificaciones oxidativas reversibles como la S-glutationilación, la S-nitrosilación e irreversibles como la carbonilación, la nitración, y la ruptura de enlaces peptídicos. Este cambio en el estado de oxidación de las proteínas se traduce en un cambio funcional y puede transformarse además en una señal de degradación para esa proteína modificada [Donoso *et al*, 2011].

Los ROS y RNS también pueden capturar electrones de los lípidos en las membranas celulares. En la mayoría de los casos esto afecta los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) que poseen átomos de hidrógeno particularmente reactivos. La reacción se inicia por ROS como radical hidroxilo (OH^\cdot), el cual reacciona con un hidrógeno para formar agua y un ácido graso radical. El ácido graso radical es una molécula inestable, de modo que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando un ácido graso radical peroxil el cual a su vez reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un peróxido lípido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este ciclo continúa ya que el nuevo ácido graso radical se comporta de la misma manera [Fukuzawa, 2008; Traber y Stevens, 2011].

Isoprostanos como marcadores de Estrés Oxidativo

La peroxidación no enzimática del ácido araquidónico da lugar a la formación de isoprostanos F2, por lo que también son considerados productos de lipoperoxidación. Aumentan su concentración en varias patologías y debido a su mecanismo de formación, características estructurales y estabilidad, son considerados como uno de los marcadores más confiables de peroxidación lipídica *in vitro* [Jourdan *et al*, 1999], en modelo animal [Mao *et al*, 2013] y en estudios en humanos [Barden *et al*, 1996; Kijima *et al*, 2001; Rodrigo *et al*, 2008]. Si bien estos productos son estructuralmente parecidos a las prostaglandinas (PG, también derivadas del ácido araquidónico) difieren de estas últimas en la orientación *cis* de las cadenas laterales (las PG presentan cadenas laterales en posición *trans*) y además en que son sintetizadas formando parte de un fosfolípido y posteriormente liberadas por acción de una fosfolipasa, a diferencia de las PG que son sintetizadas exclusivamente a partir de ácido araquidónico libre. La medición de estos compuestos puede realizarse por un inmunoensayo mediado por enzima [Milne *et al*, 2008; Rodrigo *et al*, 2013].

Sistema del glutatión como indicador del estado rédox

El tripéptido glutatión en su forma reducida (GSH) es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de las células. Actúa como cofactor de la Glutatión Peroxidasa (GPx) para detoxificar H₂O₂ y además puede eliminar ROS y RNS por vías no enzimáticas. El pool de GSH mitocondrial es una forma de protección en contra del daño oxidativo por reaccionar de manera directa con ROS y RNS, y a la vez porque es un dador de electrones para enzimas antioxidantes. También protege en contra de toxinas a través de la glutatión S-transferasa, la cual convierte xenobióticos electrofílicos y productos de peroxidación lipídica [Shelly, 2013]. El glutatión se encuentra en cantidades variables dependiendo del tipo celular y el compartimiento subcelular, y principalmente en su forma reducida. El glutatión oxidado (GSSG) por su parte, es variable en cantidad y depende de la condición rédox del tejido [Hurd *et al*, 2005; Raza, 2011].

Mitocondrias y daño por isquemia y reperfusión

Se estima que en una mitocondria en condiciones fisiológicas el 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa, con la consecuente formación de $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, cuando la respiración mitocondrial se interrumpe como ocurre durante un proceso isquémico, la producción de $O_2^{\cdot-}$ es mayor y en presencia de NO aumentan las concentraciones de $ONOO^{\cdot-}$. Luego y principalmente durante los primeros minutos de la reperfusión, la producción de ROS y RNS por parte de la mitocondria aumenta de manera dramática, siendo ella uno de los mayores determinantes del EO de este periodo [Misra *et al*, 2009; Boengler *et al*, 2011]. De manera inversa, una de las características del EO a nivel cardiovascular es que altera tanto la función como la dinámica mitocondrial (procesos de fusión y fisión), fenómenos que a su vez controlan actividades tales como síntesis de ATP, mantención del ADN mitocondrial, metabolismo, proliferación, y muerte y sobrevivencia celular [Zheng y Xiao, 2010]. Estos fenómenos de dinámica mitocondrial están mediados por algunas proteínas presentes en la membrana externa tales como la Mitofusina 2 (MFN-2). Está demostrado que un upregulation de MFN-2 en respuesta a EO es capaz de gatillar muerte celular en células musculares lisas de la vasculatura y cardiomiocitos, mientras que su disminución se asocia a fenómenos proliferativos [Guo *et al*, 2007; Shen *et al*, 2007]. A nivel miocárdico además, el EO inducido con H_2O_2 , el infarto, y los fenómenos de IR son suficientes para elevar la expresión de MFN-2 con la consiguiente apoptosis [Zheng y Xiao, 2010]. Los mecanismos de fragmentación de las mitocondrias durante los procesos isquémicos no son del todo conocidos, pero se piensa que el EO podría tener aquí un rol importante. Apoyando esta teoría, células tubulares renales sometidas a isquemia con un pretratamiento con antioxidantes pueden prevenir estos fenómenos de fisión mitocondrial [Ong y Hausenloy, 2010]. De la misma manera, la sobreexpresión de MFN-2 antes de un proceso de IR tiene roles protectivos y disminuye los fenómenos de muerte celular en cultivos [Ong y Hausenloy, 2010]. Wu *et al* demostraron (2010) en cultivo de células neoplásicas pulmonares que el EO mitocondrial afecta la dinámica mitocondrial inhibiendo la fusión, aumentando así los fenómenos apoptóticos. En ese mismo estudio, la exposición a dehidroascorbato (la forma totalmente oxidada del ascorbato de sodio) en concentraciones entre 100-400 μ M anuló el EO inducido por láser, así como también la fisión mitocondrial,

confirmando el rol del EO sobre la dinámica mitocondrial y la importancia de los agentes antioxidantes como protectivos [Wu *et al*, 2010].

Óxido nítrico sintasa

Las NOS son un grupo de enzimas (algunas constitutivas y otras inducibles) todas ellas con dos dominios catalíticos, uno oxigenasa y uno reductasa. Estos dos dominios normalmente funcionan en forma acoplada produciendo a partir de L-arginina, NO y citrulina [Förstermann y Sessa, 2012]. Su actividad depende del nivel de fosforilación de determinados residuos, NADPH y tetrahydrobiopterina (BH4). La forma activa de la enzima es un homodímero estabilizado por BH4 quien también es sustrato para la donación de electrones [Rochette *et al*, 2013]. Cuando la biodisponibilidad de L-arginina disminuye, o la razón entre BH4 y BH2 (tetrahydrobiopterina y dihydrobiopterina) disminuye -por aumento de la forma oxidada-, la enzima se desacopla y en vez de producir NO genera $O_2^{\cdot -}$, aumentando el contenido de ROS. Esto es un hecho clave ya que la BH4 es una molécula particularmente susceptible de ser oxidada en condiciones de EO, factor preponderante en la reperfusión [Kone *et al*, 2003; Kuzkaya *et al*, 2003; Landmesser *et al*, 2003].

A nivel cardíaco y en condiciones fisiológicas, distintas isoformas de NOS han sido descritas en diferentes compartimentos intracelulares. La isoforma endotelial (eNOS) por ejemplo está presente a nivel de los túbulos T (invaginaciones de la membrana del sarcolema) y de las caveolas (regiones de membrana plasmática enriquecidas en lípidos), pero también está expresada en las células endoteliales del corazón [Förstermann y Sessa, 2012]. La isoforma neuronal (nNOS) por su parte, está expresada a nivel de retículo sarcoplasmático. Se ha reportado también en la cara interna de la membrana mitocondrial interna la presencia de una NOS mitocondrial (mtNOS), la que produce NO en concentraciones nM [Zaobornyj y Ghafourifar, 2012]. Cuando se produce la reperfusión, las concentraciones de calcio intramitocondrial aumentan y eso se asocia a una mayor actividad de esta enzima, lo que - junto a una mayor disponibilidad de $O_2^{\cdot -}$ - llevaría a un aumento en la concentración de NO y luego de $ONOO^{\cdot -}$, un marcador de daño por IR que causa modificaciones oxidativas de componentes mitocondriales y liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma. En este

contexto, la mayor producción de NO se asocia también a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, inhibición de la cadena transportadora de electrones a nivel del complejo III (aumentando la producción de $O_2^{\cdot-}$) y por consiguiente, inhibición reversible del complejo I por S-nitrosilación de residuos tioles, entre otras. En su conjunto, todos estos efectos conducen a disfunción mitocondrial, que se traduce en menor producción de ATP y mayor producción de ROS y RNS [Zaobornyj y Ghafourifar, 2012].

Receptor de ryanodina en el daño por isquemia y reperfusión

El receptor de ryanodina (RyR2) es un canal de calcio de estructura homotetramérica presente en la membrana del retículo sarcoplásmico. Participa en el acoplamiento excitación-contracción, y una vez que se activa, su probabilidad de apertura depende de factores tales como presencia de Mg_2^+ , iones y ATP, pH y del estado redox, además de una serie de proteínas con función reguladora [Fauconnier *et al*, 2013]. Está bien descrito en la literatura que los eventos de IR favorecen no sólo los cambios oxidativos asociados al RyR2 –que contribuyen a la sobrecarga de calcio típica de este periodo- sino que también aumenta la degradación de éste por proteasas cisteína dependientes tales como las calpaínas, y también por el sistema del proteosoma, contribuyendo estos dos mecanismos a la disminución en el contenido de RyR2 típica de IR [Pedrozo *et al*, 2010; Singht *et al*, 2012; Fauconnier *et al*, 2013].

Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) es una de las vitaminas con propiedades antioxidantes más importante para la célula. Es una lactona en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, lo que le permite incluso participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas [Rodrigo y Miranda, 2010]. El mecanismo molecular de acción de esta vitamina la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues inhibe la formación de $O_2^{\cdot-}$, y

es el agente que reduce los radicales fenoxilos formados durante la actividad de la vitamina E, restableciéndola. Así, estas dos vitaminas actúan interrumpiendo la reacción en cadena de formación de ROS y RNS a nivel de membrana atrapándolos y reduciéndolos. Esto las diferencia mecánicamente de los antioxidantes preventivos entre los que se encuentran las enzimas peroxidasas, cuyo rol es evitar la iniciación de la secuencia de reacciones de oxidación [Lane y Lawen, 2009; Mandl et al, 2009].

El dehidroascorbato (DHA) corresponde a la forma oxidada del AA una vez que éste cedió dos electrones. Puede entrar a la célula a través de transportadores específicos (SVCT) pero también puede moverse a través de la membrana por los transportadores de glucosa (GLUT). Una vez dentro de la célula, es rápidamente reducido a ascorbato [Rodrigo y Miranda, 2010].

Guaiquil *et al* reportaron en 2004 que el DHA es capaz de inhibir la muerte celular en cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reoxigenación en un modelo *in vitro*, donde también demostraron que los cardiomiocitos acumulan ascorbato principalmente a través del transporte de DHA y que la captación de DHA estaría principalmente mediada por transportadores de glucosa [Guaiquil *et al*, 2004]. Cisternas *et al* (2014) por su parte describieron que las neuronas pueden captar vitamina C ya sea como AA o como DHA. El AA captado por la neurona es rápidamente oxidado a DHA y esto se asocia a una disminución transitoria en los niveles de glutatión intracelular, conducente a estrés oxidativo. Los niveles de glutatión son prontamente restablecidos a través de modificaciones en el metabolismo energético neuronal, aumentando la actividad del ciclo de las pentosas y de esta forma, generando mayores niveles de NADPH que permiten incrementar la actividad de la glutatión peroxidasa [Cisternas *et al*, 2014].

Ascorbato de sodio en la actividad de NOS

Existen evidencias en células endoteliales (en un modelo de hipertensión en ratas) que tanto el AA como la vitamina E evitan la producción de O_2^- proveniente del desacoplamiento de la NOS y de la actividad de la NADPH oxidasa, disminuyendo el EO y logrando así disminuir la disfunción endotelial característica de esta patología. En este estudio, realizado en

cultivo de células de músculo liso vascular obtenidos de anillos de aorta de rata, se registró aumento en la actividad de eNOS tras incubarlas en presencia de 10-100 $\mu\text{mol/L}$ de ascorbato de sodio [Ulker *et al*, 2003]. Por otro lado, existe una cantidad importante de trabajos que indican que existen una dependencia entre las concentraciones de AA y de BH4 [Mortensen y Lykkesfeldt, 2014] y en un modelo *in vitro* de fluido cerebroespinal se demostró que concentraciones milimolares de AA son necesarias para mantener la BH4 en su forma reducida lo que se traduce en una mayor actividad fisiológica de las NOS [Howells y Hyland, 1987].

N-acetil cisteína

La N-acetil cisteína (NAC) es un precursor del aminoácido cisteína que tiene reconocidas propiedades antioxidantes. De hecho, la cisteína es el principal factor limitante en la producción de glutatión y numerosos estudios han demostrado que su aporte por vía oral mejora los niveles de defensas antioxidantes a través de un aumento en la concentración de glutatión [Atkuri *et al*, 2007]. Sin embargo su efecto protector está dado también por su acción como atrapador de ROS gracias a la presencia de su grupo tiol. Existen evidencias que muestran que la utilización de NAC en modelos *in vivo* de IR en rata, disminuye el tamaño de infarto y los niveles de apoptosis, así como de indicadores de EO en circulación. [Santus *et al*, 2014; Şentürk *et al*, 2014; Schmitt *et al*, 2015].

Considerando que durante los primeros minutos de reperfusión se produce un gran aumento en la producción de ROS las cuales se asocian a daño y muerte celular, así como también a alteraciones funcionales, y teniendo en cuenta la capacidad del AA para evitar la formación de ROS y para inactivar rápidamente a estos productos, contribuyendo a minimizar el daño en membranas, proteínas y en última instancia en la sobrevivencia celular, surge la necesidad de investigar el papel que podría cumplir este compuesto en el daño por reperfusión en el infarto agudo de miocardio. De acuerdo a ello, se plantea la siguiente hipótesis:

2.- HIPÓTESIS

“El AA en concentraciones milimolares, evita el estrés oxidativo y protege del daño producido por isquemia-reperfusión en corazón aislado de rata”.

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del uso de AA en el daño producido por isquemia y reperfusión en un modelo de corazón aislado de rata.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar el efecto del AA sobre el tamaño de infarto y la recuperación de la contractilidad después de un evento de isquemia y reperfusión.

Actividades desarrolladas en este objetivo:

- a) Se midió el tamaño de infarto después de 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión, en presencia y ausencia de AA (entre 1 y 10 mM) o DHA (50 μ M).
- b) Durante todo el desarrollo del experimento se midió: desarrollo de presión en el ventrículo izquierdo (DPVI), presión de fin de diástole (PFDVI) y la máxima y mínima derivada (dP/dt).

2.- Evaluar el efecto del AA en el daño oxidativo producido por la isquemia y reperfusión.

Actividades desarrolladas en este objetivo:

En corazones en presencia de AA y/o NAC, después de isquemia y reperfusión se cuantificó:

- a) El contenido de glutatión reducido y oxidado en homogenizado de tejido cardiaco
- b) La concentración de 8-isoprostano en el perfundido del corazón obtenido durante la reperfusión.
- c) El contenido de grupos SH libres de las proteínas obtenidas de los homogenizados de corazones de los distintos protocolos.

d) El contenido de tres proteínas que se degradan durante la isquemia y reperfusión: una del retículo sarcoplasmático (el receptor de ryanodina), una de la membrana externa mitocondrial (MFN-2) y una citoplasmática (eNOS) en homogenizado de tejido cardiaco.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de estudio

En esta tesis se trabajó con un modelo de corazón aislado de rata macho Sprague-Dawley (peso entre 250-300 gr), perfundido en forma retrógrada según el protocolo de Langendorff. Para la extracción del corazón los animales fueron sometidos a anestesia total con pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/Kg de peso), para luego ser fijados en posición supina en una plataforma adecuada para el procedimiento. Posterior a una costotomía, se levantó la pared torácica y se procedió a la extracción del corazón, previa canulación de la aorta. Una vez canulado y aislado, el corazón rápidamente se conectó al aparato de perfusión, recibiendo solución Krebs-Henseleit (en mM: NaCl 118; NaHCO₃ 25; KCl 4,75; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,18; Glucosa 11; y CaCl₂ 1,4) burbujeada con una mezcla CO₂/O₂ (5% y 95%, respectivamente) y mantenida a 37°C. Se procedió entonces al corte y extracción de las aurículas, bloqueo de la vía de conducción atrio-ventricular e instalación de un marcapasos en la pared ventricular izquierda, para luego insertar un balón de llenado regulable en el ventrículo izquierdo el cual a su vez estaba conectado a un transductor que registró los cambios de presión del ventrículo. El balón se llenó hasta conseguir a una presión de fin de diástole entre 5 y 10 mmHg. La manguera de flujo de solución Krebs-Henseleit se conectó también a un transductor que registró la presión de perfusión del corazón durante el desarrollo del experimento. Se trabajó a flujo constante entre 10 a 14 mL/min, para lograr una presión de perfusión de alrededor de 70 mmHg. La frecuencia cardiaca se ajustó a 4 Hz (240 ciclos por minuto) con un marcapaso instalado en la pared del ventrículo.

Protocolos experimentales:

Los corazones fueron sometidos a un protocolo básico con un periodo de estabilización de 20 minutos, luego a una de isquemia global de 30 minutos (I30) y después una de reperfusión de 60 minutos de (R60). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Para tamaño de infarto y recuperación de contractilidad:

Grupo IR: Corazones estabilizados por 20 min, isquemia 30 min, reperfundidos 60 minutos.

Grupo IR AA: Igual que el grupo IR, pero 10 minutos previo a la isquemia se le adicionó 1, 5 ó 10 mM AA a la solución de Krebs (con control de pH) y se mantuvo hasta el final del experimento.

Grupo IR DHA: Igual al grupo anterior pero se utilizó DHA en concentración de 50 μ M

Grupo IR NAC: Igual que el grupo IR, pero 10 minutos previo a la isquemia se le adicionó 1 mM de NAC y se mantuvo hasta el final del experimento.

Grupo IR NAC + AA: Igual que el grupo IR, pero 10 minutos previo a la isquemia se le adicionó 1 mM de NAC junto con ascorbato de sodio 1 mM, combinación que se mantuvo hasta el final del experimento.

Terminado el protocolo se midió el tamaño del infarto.

Grupos experimentales para análisis bioquímico:

Grupo C 110: Corazones perfundidos durante 110 minutos con solución Krebs.

Grupo C AA: Igual que el grupo anterior pero perfundidos con AA 1, 5 ó 10 mM.

Grupo IR: Definido anteriormente.

Grupo IR AA: Definido antes.

Grupo IR NAC + AA: Definido antes.

Terminado el protocolo experimental el corazón se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta posterior análisis.

Tamaño de infarto

Para determinar el tamaño de infarto se utilizó el método del trifeniltetrazolium (TTC) 1% en buffer fosfato pH 7.0, que tiñe el tejido no infartado. Una vez terminado los 60 minutos de reperfusión, el corazón se perfundió con una solución de TTC durante 15 minutos a un flujo de 2 mL/min, posteriormente se colocó 30 min a 0°C, y se cortó en rebanadas. Luego del corte, cada rebanada fue fijada en una solución de formalina al 10% para posteriormente ser escaneada y en esa imagen se midió el área infartada (área no teñida) y el área total de la rebanada. Se midió además el grosor de cada rebanada para calcular los volúmenes respectivos. El tamaño del infarto se expresó como el porcentaje, en volumen, de la zona sin teñir (zona infartado) respecto del volumen total (zona de riesgo) [Domenech *et al*, 1998].

Preparación de homogenizados

Una vez terminado el protocolo el corazón se comprimió rápidamente con una pinza plana y se congeló en nitrógeno líquido. Luego de esto se trituró en un mortero hasta convertirlo en polvo, que se almacenó a -80°C hasta la preparación del homogenizado. Estos homogenizados se prepararon tomando 0,1g de tejido por 0,4 mL de buffer (20 mM MOPS-Tris pH 7; 0,3 M sacarosa; 1% NP-40; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 2mM EGTA) al que se le agregó inhibidores de proteasas (en concentración final: leupeptina 1µg/mL, pepstatina A 1µg/mL) y se homogenizó con un politrón. Posteriormente esta muestra se centrifugó a una velocidad de 1000 x g por 20 minutos a 4°C (para eliminar restos celulares) y el sobrenadante (homogenizado) se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta posterior análisis.

Determinación de 8-isoprostanos

Se determinó la concentración de 8-isoprostano en el efluente recolectado del corazón, usando el Cayman's 8-isoprostane EIA Kit (Cayman Chemical Company). Los resultados se expresaron como ng de 8-isoprostano/mL efluente.

Determinación de Glutación

Se determinó la concentración de GSH total utilizando el método espectro-fotométrico de Griffith. Los resultados se expresaron como nmol de glutación/mg de proteína [Griffith, 1980].

Determinación de proteínas

Se realizó de acuerdo al método de Hartree [Hartree, 1972].

Determinación de grupos SH

Las proteínas provenientes de los distintos protocolos experimentales se trataron con NEM-Biotina 1 mM, por 2 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz, y luego se detuvo la reacción con glutación (1mM). Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras, se transfirieron a membranas de PDVF, se incubaron con estreptavidina peroxidasa, luego se agregó el sustrato de la enzima y se obtuvieron las imágenes luminiscentes en un equipo de adquisición de imágenes (Chemidoc, Bio-Rad) y se compararon los distintos perfiles [Hill *et al*, 2009]. Las señales se normalizaron por la señal de GAPDH.

Cuantificación de Proteínas por Western Blot

Las proteínas provenientes de los distintos protocolos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% para MFN-2 y eNOS y en gradiente 4-8% de acrilamida para el receptor de ryanodina, luego se transfirieron a membrana de PDVF para ser incubadas con los distintos anticuerpos [Domenech *et al*, 2003].

Análisis estadístico y cálculo del tamaño de la muestra

Debido a que las muestras no tienen un mismo tamaño muestral en cada uno de los experimentos, se decidió hacer un ANOVA con un test no paramétrico (Kruskal-Wallis), seguido de un post test de Dunn. Se rechazó la hipótesis nula con un valor de $P < 0,05$.

Criterios de exclusión

Fueron excluidos los corazones que durante el periodo de estabilización desarrollaron una presión intraventricular menor a 60 mmHg, o una presión de perfusión inferior a 50 mmHg [Skrzypiec-Spring et al, 2007].

6.- RESULTADOS

6.1.- El AA en el tamaño de infarto en corazón aislado de rata: Para evaluar el efecto del AA sobre el daño por IR en miocardio, se sometió a los distintos grupos de corazones aislados y previamente estabilizados en un sistema de Langendorff a un periodo de isquemia de 30 minutos seguido de una reperfusión de 60 minutos. Luego se determinó el tamaño del infarto perfundiendo los corazones con TTC, que es un colorante que tiene afinidad sólo por miocardio viable, dejando de color blanco las zonas infartadas. En la Figura 1A se muestra una imagen representativa de dos corazones sometidos a IR, con y sin AA. Nuestros resultados muestran que el tamaño de infarto del grupo IR sin tratamiento es de $41,17 \pm 8,8$ (N=6), de manera similar a datos obtenidos en la literatura [Riquelme et al, 2016]. Ninguno de los grupos tratados con AA ya sea solo ($23,7 \pm 6\%$; N=3) o en combinación con NAC ($18,5 \pm 7,7\%$; N=3) reducen significativamente el tamaño de infarto respecto del grupo IR, que sí resultó menor en el grupo que se trató solo con NAC 1 mM ($16,7 \pm 6,5\%$; N=3) (Figura 1B). Para confirmar lo anterior, debemos aumentar el N muestral. Adicionalmente se probaron concentraciones de AA 10 mM ($66 \pm 12,1\%$; N=3) y 5 mM ($44 \pm 18,2\%$; N=4), sin que modificaran el tamaño de infarto en relación al grupo IR (datos no mostrado). El análisis de nuestros resultados en su conjunto sugieren que la presencia de AA no logra tener efectos cardioprotectores.

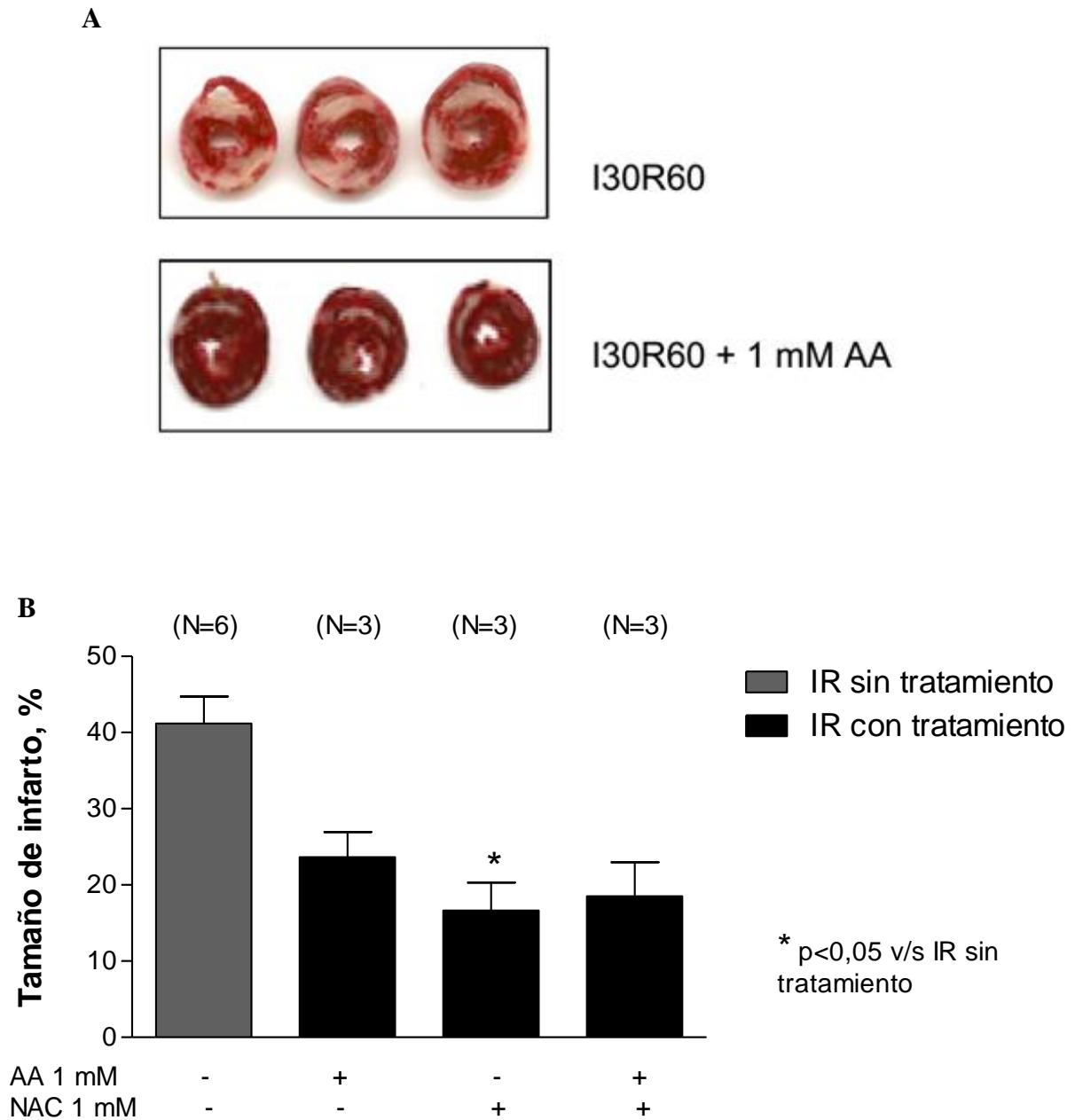


Figura 1: El AA no disminuye el tamaño de infarto en corazón aislado de rata sometido a isquemia-reperfusión. (A) se muestran tres rebanadas representativas de dos corazones teñidos por el método de TTC. Arriba un corazón IR y abajo un corazón que recibió AA. La zona roja corresponde a miocardio viable y la región blanca a miocardio infartado. En (B) La barra gris corresponde al grupo IR y las barras negras a los grupos IR tratados con agentes antioxidantes. Para cada grupo se graficó el valor promedio más el EMS; Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * $p < 0,05$ v/s Control.

6.2.- El AA es capaz de mejorar parcialmente el desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (DPVI), pero no revierte la caída del +dP/dT inducida por isquemia-reperfusión en corazón aislado de rata: Se midieron los cambios que se producen en la recuperación de función del ventrículo izquierdo posterior a un episodio de IR. En el grupo Control, el DPVI al final de la reperfusión fue de $78,6 \pm 14,2$ mm Hg (N=5), y disminuyó a $8,8 \pm 2,2$ mm Hg en el grupo sometido a IR (N=12). El grupo IR con AA ($29,7 \pm 18,5$ mm Hg; N=7) no muestra diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo Control, mientras que los dos grupos que recibieron NAC, ya sea solo ($39,4 \pm 18,1$ mm Hg; N=7) o en combinación con AA ($34 \pm 18,5$ mm Hg; N=8) muestran una mayor recuperación del DPVI en comparación al grupo IR sin tratamiento (Figura 2A).

La primera derivada con respecto al tiempo (+dP/dt) es otro parámetro hemodinámico importante que mide la velocidad de contracción del ventrículo izquierdo. En el grupo Control alcanza un valor de 2929 ± 1109 mm Hg/s (N=7). Cuando los corazones son sometidos a IR, este valor baja a 408 ± 97 mm Hg/s (N=12). El grupo tratado con AA, con un valor de 985 ± 390 mm Hg/s (N=6) tiene un promedio menor al grupo Control, en tanto que los grupos tratados con NAC, ya sea solo (1150 ± 294 mm Hg/s; N=6) o con AA (2057 ± 1313 mm Hg/s; N=7) se observan aumentados respecto al grupo IR sin tratamiento (Figura 2B).

En conjunto, estos resultados sugieren que habría un beneficio relativo asociado al uso de AA. Por sí solo no parece aumentar el DPVI probablemente debido a la comparación de grupos con N muestrales bajos. Si está presente NAC, ya sea solo o con AA, sí se evidencia una diferencia estadísticamente significativa versus el grupo IR. Por otro lado el AA por sí solo no modifica la +dP/dt, pero su acción mejora en presencia de NAC, ya que al co-administrados generan una diferencia respecto del grupo IR sin tratamiento.

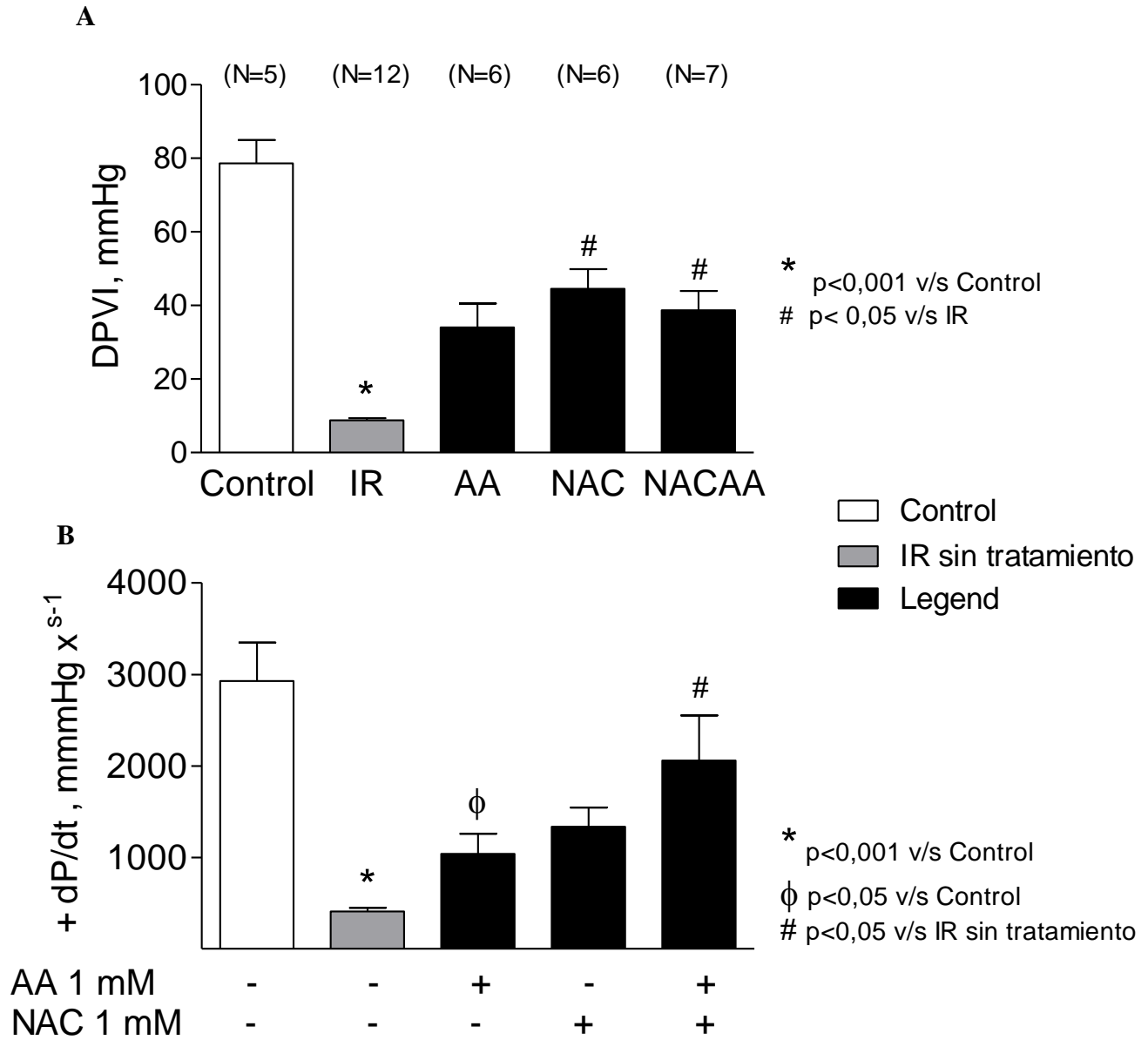


Figura 2: El AA por sí solo recupera parcialmente el desarrollo de presión con corazones sometidos a isquemia-reperusión, pero no mejora el +dP/dt. En (A) y (B): La barra blanca representa al grupo Control, la barra gris corresponde al grupo IR y las barras negras a los grupos IR tratados con agentes antioxidantes. Cada barra representa el valor promedio más el EMS; Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * p < 0,001 v/s Control; φ p < 0,05 v/ Control; # p < 0,05 v/s IR sin tratamiento. Para ambos gráficos, los valores se obtuvieron inmediatamente antes de terminar el protocolo.

6.3.- El AA logra revertir de manera parcial la disminución de GSH en corazones de rata aislados y sometidos a IR: Posterior al estudio del efecto del AA sobre el tamaño del infarto y las variables hemodinámicas, se investigó cuál era su efecto sobre algunos indicadores de EO en homogenizado de tejido miocárdico. Considerando que el glutatión es un importante sistema antioxidante en la célula y que se ha reportado que los corazones sometidos a IR muestran una disminución de la relación entre GSH/GSSG [Okazaki *et al*, 2011], se procedió a cuantificar la concentración total de GSH. La concentración promedio (en nmol/mg de proteínas) en el grupo Control fue de $39,6 \pm 5,3$ (N=12), mientras que el grupo sometido a IR disminuye el contenido de glutatión a $26,6 \pm 6,3$ (N=11). El contenido promedio de glutatión del grupo sometido a IR y tratado con AA sube a $37,5 \pm 7,3$ (N=4), y a $34,6 \pm 11,9$ en el grupo IR tratado con NAC (N=5). El grupo tratado con la mezcla de antioxidantes presenta un promedio de $50,9 \pm 7$ (N=4) siendo mayor al grupo IR (Figura 3). Analizados en conjunto, los datos indican que el AA tiene un efecto moderado manteniendo el contenido de glutatión, y que el AA y el NAC tienen un efecto aditivo sobre el contenido de glutatión total respecto del grupo IR.

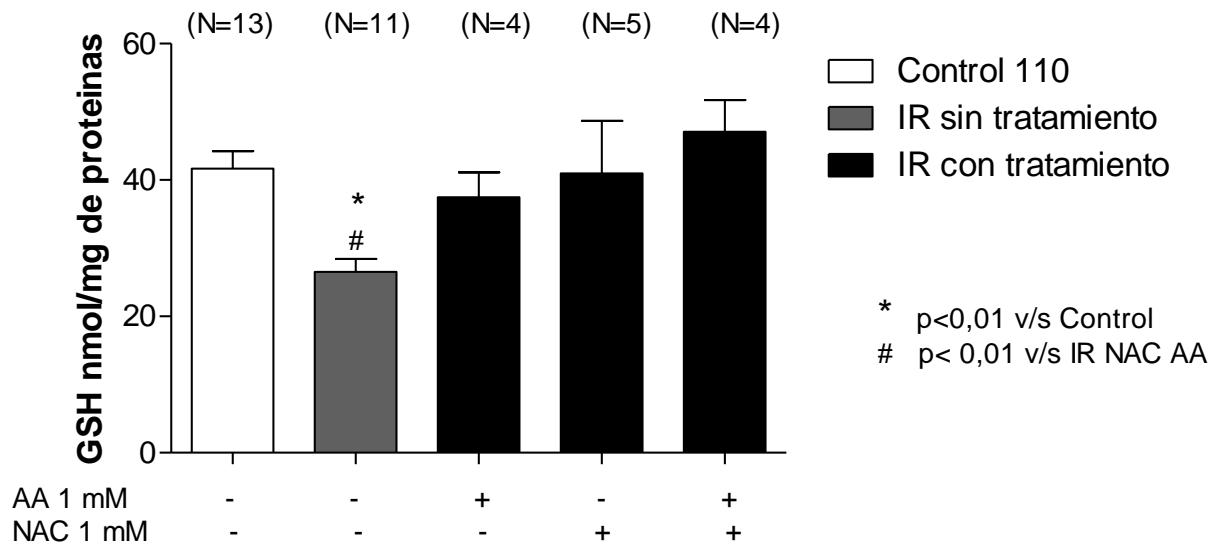


Figura 3: El AA revierte de manera parcial la disminución de GSH inducida por IR. La barra blanca representa al grupo Control, la barra gris corresponde al grupo IR sin tratamiento y las barras negras a los grupos IR tratados con agentes antioxidantes. Cada barra representa el valor promedio más el EMS. Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * p < 0,01 v/s Control, # p < 0,01 v/s IR NAC AA

6.4.- El AA utilizado en concentración 10 mM aumenta la concentración de 8-isoprostanos en el efluente de corazón aislado de rata sometido a IR: Para estudiar el efecto del AA sobre el daño oxidativo en membranas, se evaluó la liberación de un marcador estable y reproducible que refleja el efecto del EO sobre las membranas, los isoprostanos [Rodrigo *et al*, 2013]. Para esto se usó el kit Cayman's 8-isoprostane EIA de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La concentración promedio de 8-isoprostanos en el efluente del grupo Control fue de $2,6 \pm 1$ ng/mL (N=7), no se modificó cuando se midió a los 15 minutos de reperfusión en corazones no tratados con antioxidantes ($2,2 \pm 1,2$ ng/mL; N=7), ni tampoco a los 60 minutos de reperfusión en el mismo grupo ($6,7 \pm 3$ ng/mL; N=3). El grupo que recibió AA 1 mM a los 15 minutos de reperfusión presenta una concentración promedio de $3,4 \pm 1,8$ ng/mL (N=6), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas respecto de los grupos anteriormente descritos. Sin embargo, cuando los corazones se reperfunden con AA en concentración de 10 mM, la concentración de isoprostanos aumenta a ($22,2 \pm 7,3$ ng/mL; N=6), siendo mayor al grupo control y al grupo IR sin antioxidantes medido a los 15 minutos (Figura 4). Nuestros datos sugieren que en este modelo, el AA tiene un efecto dosis dependiente sobre el daño oxidativo sobre las membranas. A dosis bajas no modifica la liberación de isoprostanos pero a concentraciones altas podría estar aumentando el daño oxidativo sobre las membranas.

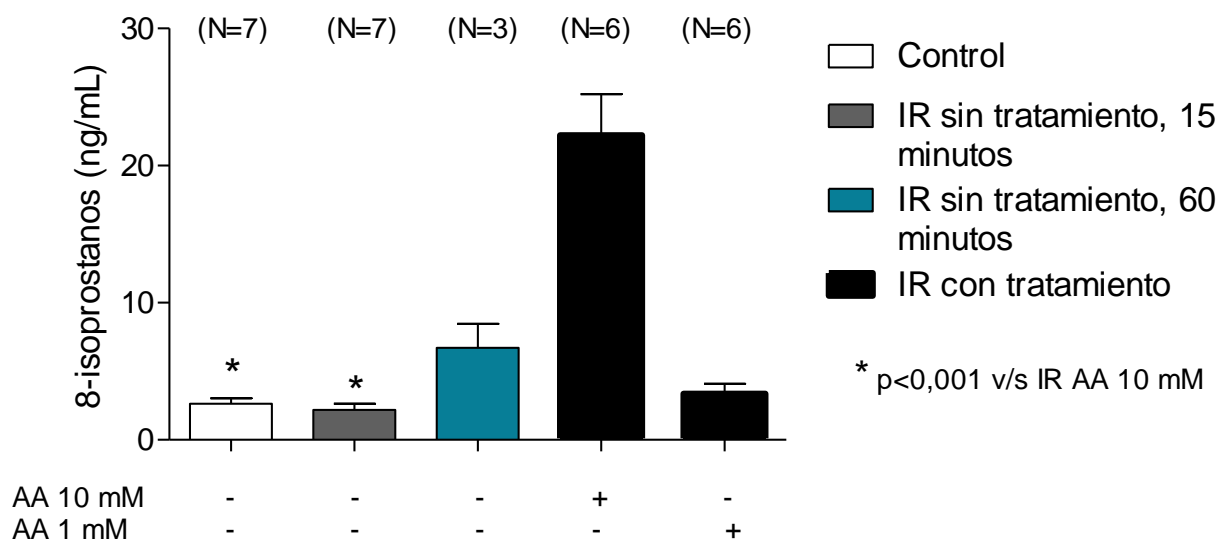


Figura 4: El AA 10 mM aumenta la concentración de 8-isoprostanos en el perfundido de corazón. La barra blanca representa al grupo Control a los 65 minutos de experimento, la barra gris al grupo IR a los 15 minutos de reperusión y la barra azul en el grupo IR a los 60 de reperusión. Las barras negras a los grupos IR que sí recibieron AA, y medido a los 15 minutos de reperusión. En todos los grupos, se representa el promedio más el EMS. Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * $p < 0,001$ v/s IR AA 10 mM.

6.5.- El AA no modifica el contenido de proteínas carboniladas en corazón aislado de rata sometido a IR: Para evaluar el daño oxidativo de IR específicamente sobre proteínas, estudiamos el nivel de carbonilación, teniendo en cuenta que reportes previos ya habían indicado que protocolos de IR aumentan la carbonilación en proteínas mitocondriales [He *et al*, 2016]. Para esto se utilizaron homogenizados de corazón de rata, preparado en un buffer con inhibidores de proteasas y fosfatasas. El sobrenadante se alicuotó y en él se determinó la concentración de proteínas. Posteriormente se realizó electroforesis en geles comerciales que permitieron normalizar por la totalidad de proteínas de la muestra y luego se hizo un Western blot contra proteínas carboniladas en el mismo gel. El valor de la señal de cada carril se corrigió por su cantidad de proteínas totales.

El contenido promedio en el grupo IR fue de $1,3 \pm 1,3$ (N=6). En el grupo IR AA fue de $0,6 \pm 0,2$ (N=4), para el grupo IR NAC fue de $1,3 \pm 1,1$ (N=6), y en el grupo IR NAC+AA fue de $1,5 \pm 1,3$ (N=5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos (Figura 5). En su conjunto los datos sugieren que el AA no modifica significativamente el nivel de carbonilación de proteínas en los distintos protocolos utilizados.

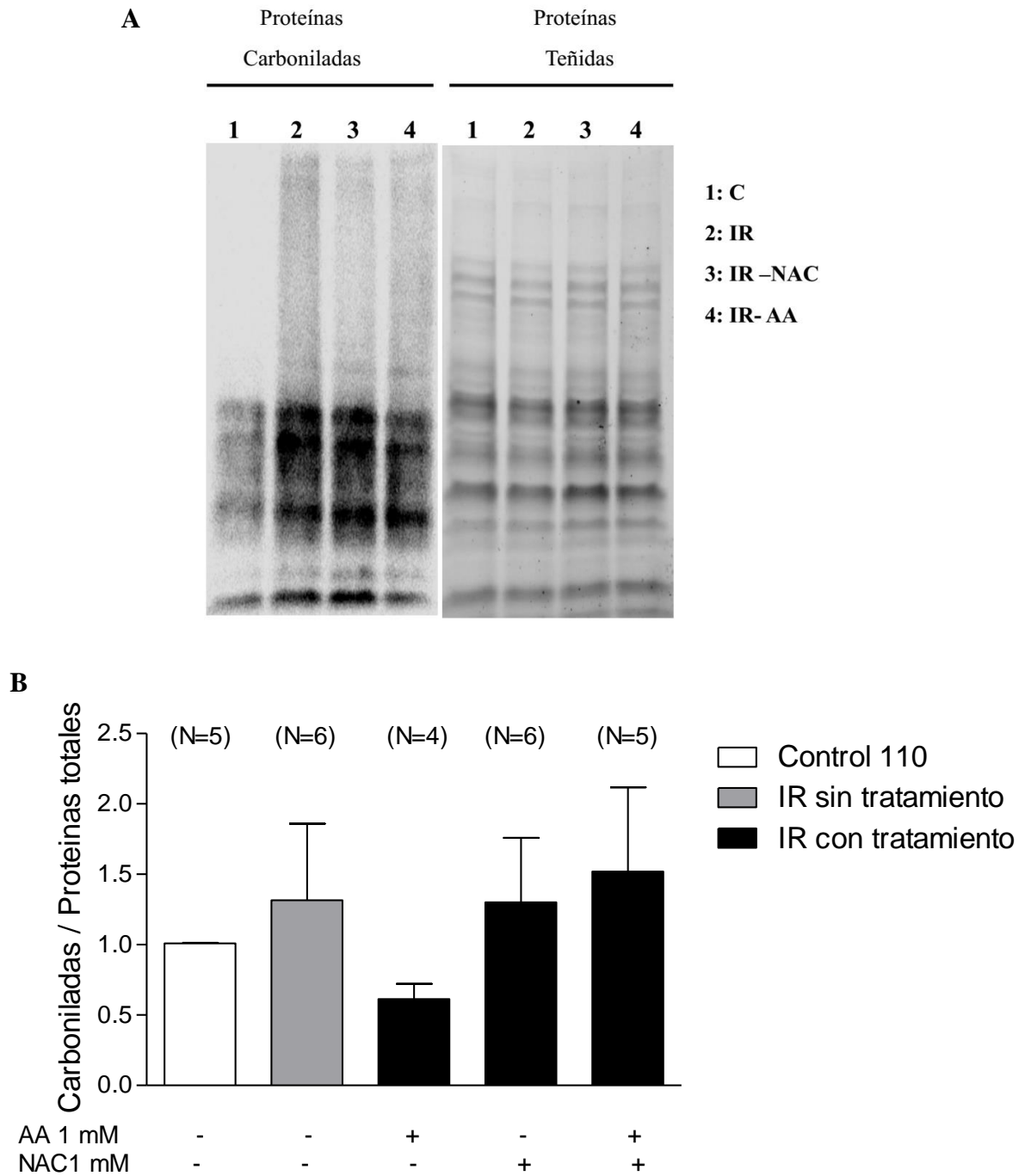


Figura 5: El AA no modifica el contenido de proteínas carboniladas. En (A), un Western blot representativo de la intensidad de la señal en los diferentes carriles. Se normalizó por las proteínas totales cargadas. (B) Se observa el promedio más el EMS corregido por proteínas totales en cada uno de los grupos analizados. La barra blanca corresponde al grupo Control, la barra gris al grupo IR y las barras negras a los grupos IR tratados con antioxidantes. Kruskal-Wallis.

6.6.- El AA no logra modificar por sí solo ni asociado a NAC la incorporación de NEM-Biotina a las proteínas de homogenizado de corazón aislado de rata sometido a IR:

Teniendo en cuenta que los grupos tioles de las proteínas son particularmente susceptibles de daño por EO, y que durante los episodios de IR varias proteínas del cardiomiocito ricas en grupos tioles se ven afectadas por la sobreproducción de ROS [Eaton *et al*, 2002], se investigó el rol que tienen la IR y el tratamiento con antioxidantes sobre la cantidad de grupos SH en las proteínas de corazones sometidos a diferentes tratamientos. Para esto se procedió a incubar alícuotas provenientes de homogenizados de corazón en un medio con NEM-Biotina de acuerdo a la metodología explicada previamente en la sección materiales y métodos, y la señal de cada una de las muestras se normalizó por su señal de GAPDH. El contenido promedio en el grupo Isquemia fue de $1,9 \pm 0,6$ (N=4), en el grupo IR fue de $1,8 \pm 0,8$ (N=4), en el grupo IR AA fue de $1,9 \pm 0,4$ (N=4), en el grupo IR NAC (N=3) fue de $1,4 \pm 0,4$, y en el grupo IR NAC+AA fue de $1,8 \pm 1,1$ (N=5). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados ni respecto del Control (Figura 6). En su conjunto, nuestros datos indican que cuando se cuantifica la totalidad del carril correspondiente a cada muestra, no se aprecia diferencia entre los distintos tratamientos.

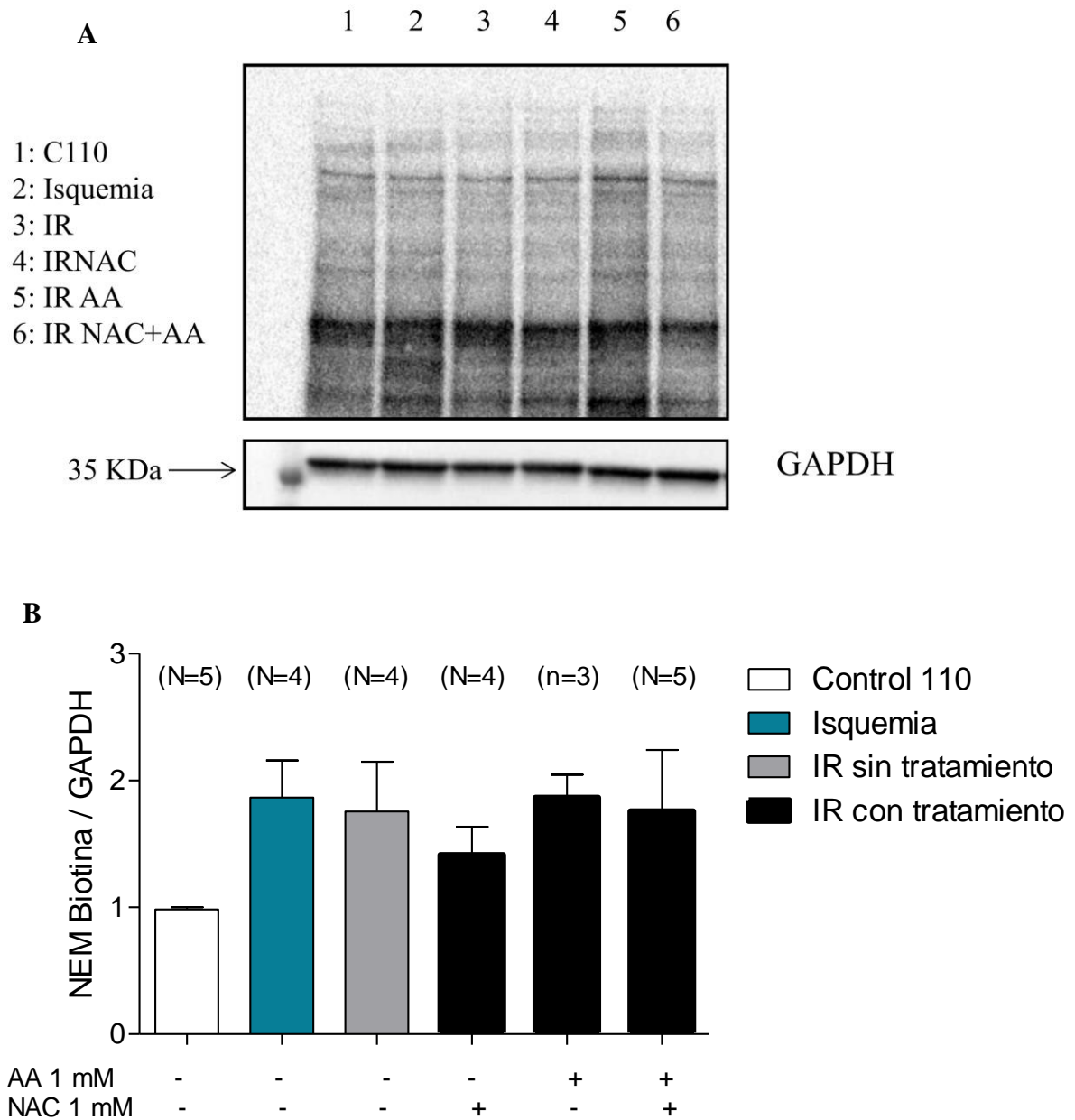


Figura 6: El AA no modifica por sí solo ni asociado a NAC la incorporación de NEM-Biotina a las proteínas de homogenizado de corazón. (A) Western blot característico para la cuantificación de NEM-Biotina. La intensidad de señal de los carriles es similar en todos los grupos analizados. (B), La barra blanca corresponde al grupo Control, la azul al grupo Isquemia, la barra gris corresponde al grupo IR sin tratamiento y la negra a los grupos IR con tratamiento antioxidante. Para cada grupo de grafica el contenido promedio de NEM-Biotina normalizado por GAPDH más el EMS. Kruskal-Wallis.

6.7.- El AA no logra revertir la disminución en el contenido de MFN-2 inducido por IR en homogenizado de corazón de rata sometido a IR: Teniendo en cuenta que la disfunción mitocondrial induce EO, se estudió una proteína que participa en la regulación de la función y la dinámica mitocondrial, MFN-2, ya que reportes previos indican que su contenido disminuye en modelos de isquemia cerebral [Peng *et al*, 2015]. Para esto se hizo una electroforesis y posteriormente un Western blot para cuantificar los niveles de MFN-2. Se usó GAPDH como control de carga. En el grupo de corazones que fueron sometidos a IR el contenido promedio bajó a $0,49 \pm 0,2$ (N=4) v/s el Control (N=10), y lo mismo ocurre en el grupo IR con AA ($0,5 \pm 0,2$; N=4) (Figura 7B). El análisis de estos datos indica que en este modelo, la degradación de MFN-2 se produce por un mecanismo que no es modificado por el AA.

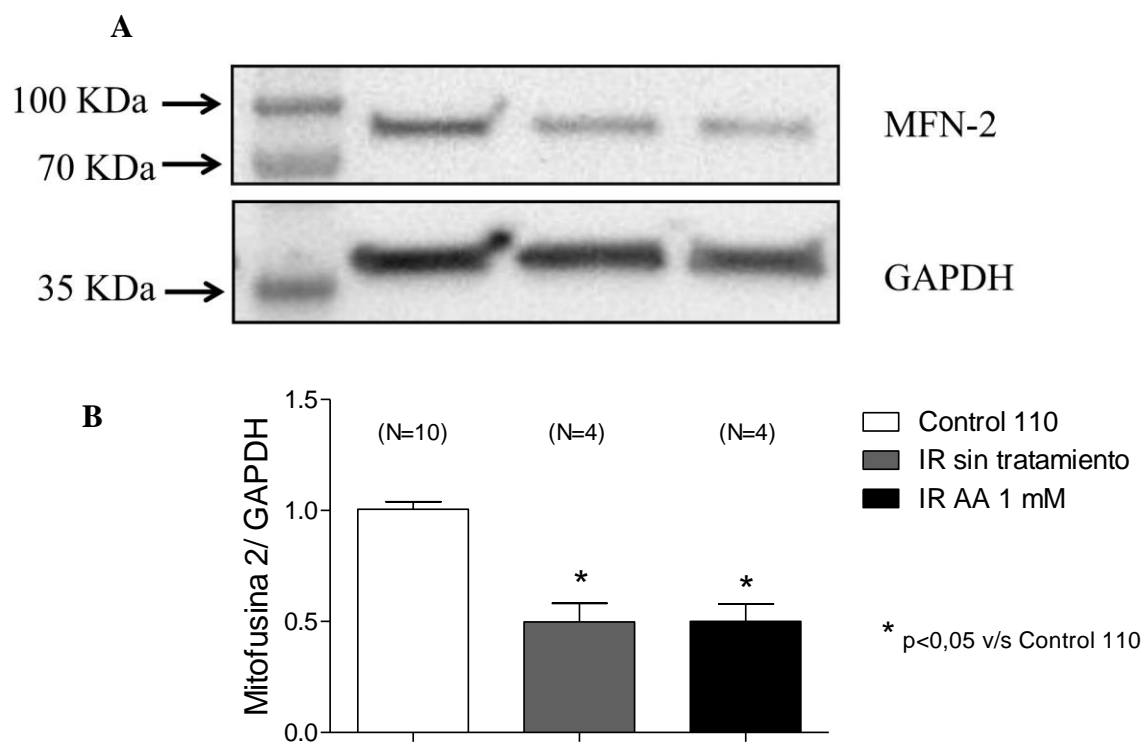


Figura 7: El AA no logra revertir la disminución en el contenido de MFN-2 inducido por IR. (A) un Western blot representativo donde se observa la disminución en la intensidad de las bandas respecto del Control en los grupos IR e IR AA. Se ocupó GAPDH como control de carga. (B) el contenido promedio normalizado por GAPDH + SEM en los diferentes grupos analizados. La barra blanca corresponde al Control, la gris al grupo IR, y la negra al grupo IR con AA. Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * $p < 0,05$ v/s Control 110.

6.8.- El AA no logra revertir la disminución en el contenido de eNOS que induce IR:

Teniendo en cuenta que eNOS participa de manera normal en la mantención del tono vascular y que el AA en concentraciones similares a las usadas en nuestro trabajo se reflejan en una mayor actividad biológica [Mortensen y Lykkesfeldt, 2014], se evaluó el contenido de eNOS en corazones de rata sometidos a IR. En la Figura 8B se aprecia que IR (N=4) disminuye el contenido de eNOS a $0,6 \pm 0,2$ en relación al Control (N=6). El tratamiento con AA no logra revertir esa disminución ($0,7 \pm 0,2$, N=4). Estos datos nos sugieren que el mecanismo de degradación de eNOS durante un episodio de IR no es afectado por el AA en las concentraciones y por el tiempo usado en este estudio.

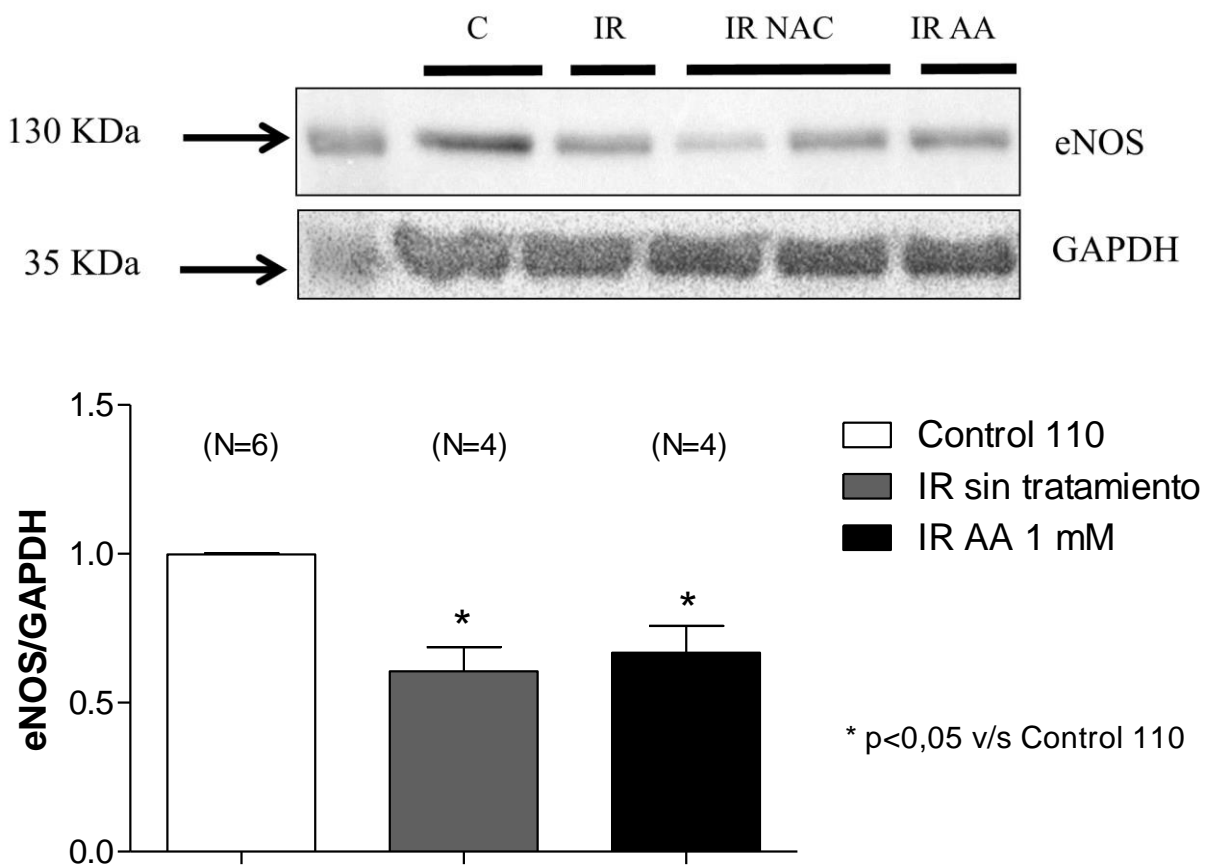


Figura 8: El AA no revierte la disminución en el contenido de eNOS que induce IR. (A) Un Western blot característico donde se pueden ver las distintas intensidades de banda en relación al Control. Se ocupó GAPDH como control de carga. El grupo IR NAC no fue incluido en el gráfico por la alta variabilidad que tenía. (B) El contenido promedio normalizado por GAPDH más EMS de cada uno de los grupos analizados en este trabajo. La barra blanca corresponde al Control, la barra gris al grupo IR y la barra negra al grupo IR que recibió AA. Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * $p < 0,05$ v/s Control 110.

6.9.- El AA revierte parcialmente la disminución en el contenido de RyR2 inducido por IR en corazón aislado de rata: Finalmente quisimos investigar qué ocurría con el RyR2, teniendo en cuenta que participa en fenómenos de sobrecarga de calcio en el cardiomiocito durante la reperfusión, que tiene grupos SH muy susceptibles de modificación oxidativa, y porque reportes previos indican que los fenómenos de IR lo dañan por mecanismos específicos de degradación proteica [Pedrozo *et al*, 2010]. La IR (N=10) disminuye el contenido de RyR2 a $0,6 \pm 0,1$ respecto al Control (N=12), y el tratamiento con AA ($0,9 \pm 0,2$; N=3) revierte parcialmente esta situación (Figura 9). Nuestros datos sugieren que el AA tiene un efecto benéfico asociado a los mecanismos que participan de la degradación del RyR2.

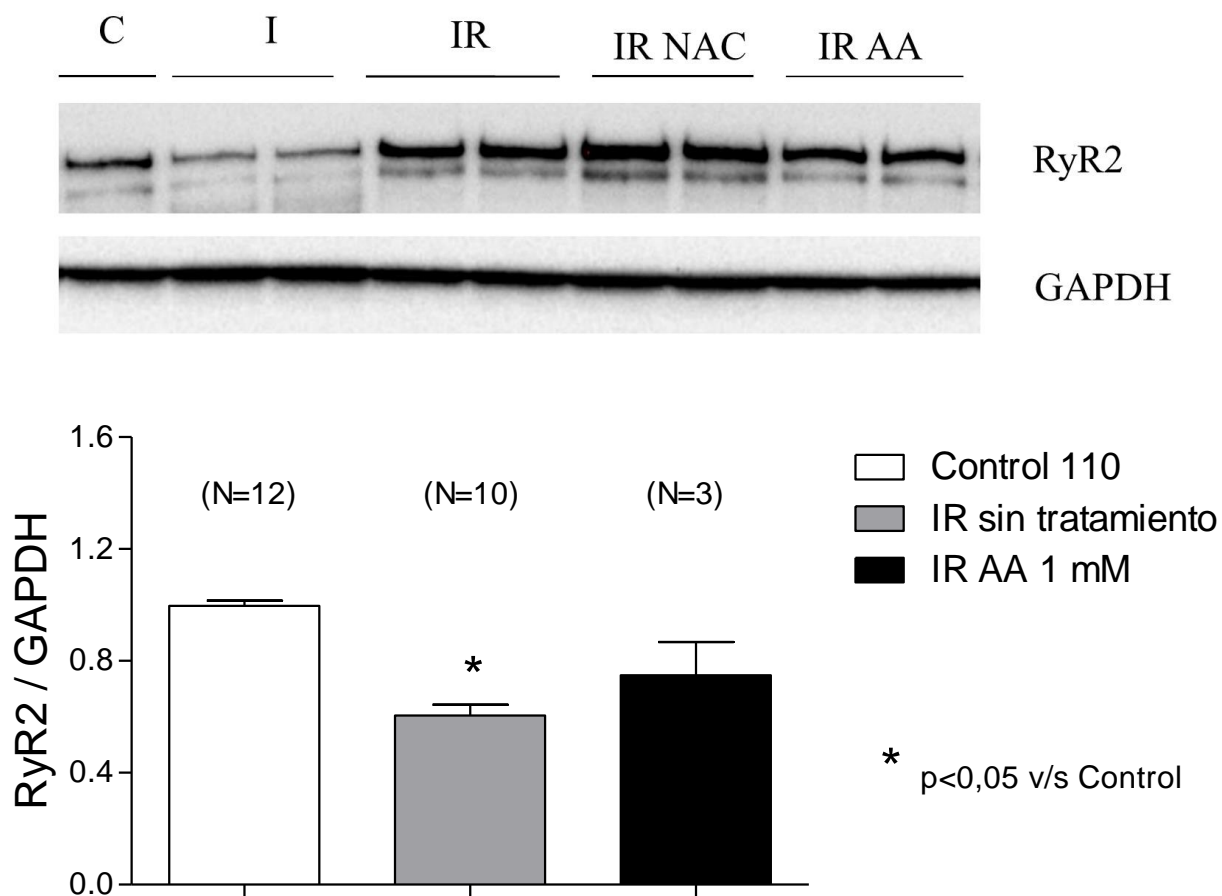


Figura 9: El AA revierte parcialmente la disminución en el contenido de RyR2 inducido por IR. (A) Un Western blot típico donde se observa la intensidad de banda en los grupos analizados. Se normalizó por GAPDH. (B) se ve el valor promedio del contenido de RyR2 normalizado por GAPDH más el EMS en los diferentes grupos analizados. La barra blanca corresponde al Control, la gris al grupo IR, y la negra al grupo IR con AA. Kruskal-Wallis, post test de Dunn, * p < 0,05 v/s Control 110

DISCUSIÓN

Los resultados indican que en nuestro modelo, el AA muestra un efecto protector moderado sobre las variables hemodinámicas estudiadas, mejorando el desarrollo de presión aunque sin un efecto muy marcado sobre la velocidad de contracción. Bioquímicamente hablando, los datos obtenidos indican que es capaz de mejorar el contenido de glutatión, sin modificar la concentración de 8-isoprostano en el efluente -cuando se usa en concentración de 1 mM-, que no tiene mayor efecto sobre indicadores de daño oxidativo sobre proteínas (carbonilación e incorporación de NEM-Biotina) y que si bien protege contra la degradación del RyR2, no tiene efectos sobre la degradación de MFN-2 ni de eNOS. Por otro lado, utilizado en concentración 10 mM, aumenta la liberación de isoprostanos al efluente.

La vitamina C ha mostrado tener efectos cardioprotectores en modelos de fibrilación ventricular y shock eléctrico en rata [Tsai *et al*, 2011], en oclusión coronaria en ratas y en cultivo de cardiomiocitos [Guaiquil *et al*, 2004]. El tamaño de infarto se ha usado como un indicador de cardioprotección, y en el caso de la vitamina C, Guaiquil *et al* (2004) demostraron efectos cardioprotectores usando DHA (trabajando en isquemia regional *in vivo*) en ratas. Okazaki *et al* (2011) por su parte, en un modelo de rata diabética utilizaron los mismos antioxidantes que en el presente trabajo (aunque con protocolos diferentes), encontrando una disminución del tamaño del infarto en el grupo de ratas diabéticas tratadas con AA pero no en el grupo de ratas control tratadas con este antioxidante, proponiendo que el efecto benéfico de estos antioxidantes depende del balance nitroso-redox que exista en la célula, y que este efecto sólo se evidencia cuando existe una condición previa de EO. Por otro lado algunos autores han reportado incluso que su uso puede revertir el efecto protector del preconditionamiento isquémico en modelos de isquemia regional *in situ* en cerdos [Skyschally *et al*, 2002] o en conejos [Tsovolas *et al*, 2008]. En el modelo utilizado en el presente estudio, los corazones recibieron AA sólo por 10 minutos previo al periodo isquémico, a diferencia del trabajo realizado por Okazai (AA 1 mM, perfundido 30 minutos antes del periodo de isquemia global), lo que podría generar una disminución aguda y moderada de antioxidantes previo al periodo de isquemia, situación a la que se le han descrito efectos benéficos a través de mecanismos preconditionantes [Skyschally *et al*, 2002].

Como precursor de glutatión, el NAC ha probado efectos protectivos en una serie de modelos. Se ha evidenciado que atenúa el daño por I/R en corazón diabético [Okazaki *et al*, 2011; Wang *et al*, 2013], mejora los parámetros de funcionalidad y los indicadores de inflamación en un modelo *in vivo* de daño por IR renal en rata [Nitescu *et al*, 2006], disminuye el EO y marcadores proinflamatorios en pacientes humanos sometidos a cirugía con bypass cardiopulmonar [Orhan *et al*, 2006] y recientemente y en modelo de corazón aislado de rata, que disminuye el tamaño de infarto, los niveles de apoptosis y marcadores de EO [Şentürk *et al*, 2014]. En un estudio previo con un modelo similar al nuestro en que se utilizó NAC como agente cardioprotector, no se logró evidenciar este efecto como una disminución del tamaño del infarto. Sin embargo en dicho estudio el NAC fue administrado en concentraciones de 0,1 mM (una décima parte de lo utilizado por nosotros) previo al periodo isquémico [Okazaki *et al*, 2011]. Se ha descrito en modelos de corazón aislado de conejo que el NAC tiene efectos protectores dosis dependientes [Ferrari *et al*, 1991] lo cual permitiría explicar la diferencia de resultados entre los obtenidos por nuestro estudio y por Okazaki *et al* (2011). Por otro lado un muestral bajo aumenta la dispersión y hace más difícil establecer una significancia estadística. Si se compara sólo el grupo IR con el IR AA en un t test sí arroja diferencias significativas, por lo que creemos que aumentando el N muestral podríamos llegar a tener significancia estadística.

El mecanismo por el cual el AA produciría protección sería mediante el aumento moderado de ROS, asociado al agotamiento de glutatión intracelular. En 2002 Skyschally *et al* propusieron que el cambio en la concentración de ROS asociado a vitamina C podría modificar la señalización asociada a muerte o sobrevida celular en el tejido cardiaco. El principal metabolito captado por cardiomiocitos es DHA [Guaiquil *et al* 2004], y ese DHA consume glutatión para reciclado a ascorbato [Cisternas *et al*, 2014]. En nuestro modelo, la totalidad del oxígeno contenido en la solución Krebs está disuelto en agua a diferencia de la sangre donde se transporta casi de manera exclusiva unido a Hemoglobina. Esto podría implicar una mayor probabilidad de autooxidación del ascorbato con la consecuente formación de DHA o de radical ascorbilo, por lo que estas condiciones podrían estar sometiendo a la célula a un agente que promueve el agotamiento de defensas antioxidantes y de esta manera gatillar señales de sobrevida dependientes de un aumento moderado de ROS en el tejido miocárdico.

El contenido de glutatión disminuye durante el daño por reperfusión [Haramaki *et al*, 1998] y el tratamiento con AA y NAC ha mostrado tener efectos benéficos asociado a esto [Okazaki *et al*, 2011]. Gao *et al* (2002) utilizaron un modelo de corazón aislado de rata para evaluar el efecto del AA 1 mM sobre el contenido de glutatión en el tejido miocárdico sometido a I/R, sin encontrar diferencias en el contenido de GSH entre el grupo que recibió AA y aquel que sólo recibió el vehículo, sin embargo en el citado trabajo, el AA se administró solamente durante el periodo de reperfusión, a diferencia del nuestro. El tamaño de muestra utilizado en nuestro trabajo (4-5, para los grupos con antioxidantes) difiere del utilizado por Gao *et al* (10), por lo que sería interesante aumentar el número de observaciones para poder hacer un análisis más profundo de los resultados, y poder avanzar hacia una descripción de los mecanismos que podrían estar operando en la preservación del contenido de glutatión observada en nuestro trabajo.

El nivel de isoprostanos en diferentes tejidos y líquidos biológicos es un marcador robusto del daño de membranas causado por el EO, y un aumento de su concentración en estas muestras se ha asociado a una serie de patologías o condiciones donde el EO está presente [Milne *et al*, 2008]. Mao *et al* (2013) en un modelo de isquemia regional en corazón de rata diabética describió que el uso de NAC co-administrado con alopurinol reduce los niveles de F2 isoprostanos tanto en tejido cardíaco como en plasma, a las dos horas de reperfusión en ratas diabéticas, llegando a igualarse al grupo control. Además, se ha reportado en pacientes humanos con obstrucción coronaria total que los niveles de isoprostano plasmático aumentan transitoriamente posterior a la angioplastia, no así en aquellos que tenían oclusión coronaria parcial [Kijima *et al*, 2001]. Otro estudio en pacientes humanos infartados y tratados con vitamina C previo a la realización de angioplastia muestra que los niveles de isoprostanos urinario aumentan posterior a la angioplastia hasta llegar a un peak a los 60-90 minutos y que luego comienzan a disminuir [Guan *et al*, 1999]. En nuestro trabajo no encontramos diferencia estadísticamente significativa en la concentración de isoprostanos en los grupos IR medidos a los 15 y 60 minutos, pero se aprecia una tendencia clara y probablemente aumentando el N muestral sí habrá significancia. Interesantemente, la concentración de isoprostanos medida a los 15 minutos de reperfusión en el grupo tratado con AA 10 mM es mayor en relación al grupo control (medido a los 65 minutos) y al grupo IR medido a los 15 minutos. Como se comentó anteriormente, si el AA al ser captado como DHA y metabolizado de manera

intracelular genera agotamiento de glutatión dosis dependiente, una concentración alta de AA favorecerá una mayor depleción de glutatión, y teniendo en cuenta que el glutatión es esencial para mantener a la vitamina E en su estado reducido vía reciclaje de vitamina C [Kalyanaraman, 2013], podríamos estar favoreciendo el daño en membranas biológicas y por lo tanto mayor probabilidad de auto peroxidación de fosfolípidos y formación de estos mediadores.

Altos niveles de oxidación en grupos SH han sido encontrados en cardiomiocito cultivado con agentes oxidantes, específicamente afectando a proteínas del aparato contráctil [Kalász *et al*, 2015]. Ceconi *et al* (2000) describió en un modelo de corazón aislado de conejo que el contenido de grupo SH disminuye en isquemia y en la reperfusión en relación a los corazones en medios aeróbicos, aunque por un método de absorbancia, diferente a la determinación realizada en este trabajo a través de Western blot [Ceconi *et al*, 2000]. En nuestros datos, no encontramos diferencia en la cantidad de SH libres al evaluar la incorporación de NEM biotinilado a las proteínas provenientes de los distintos protocolos, posiblemente debido a que sólo algunos grupos SH de algunas proteínas se modifican, y al evaluar la incorporación total de NEM, estos cambios no logran ser detectados.

La carbonilación de proteínas se ha considerado un marcador de EO en distintas condiciones, especies y órganos [Arreguín *et al*, 2012; Fedorova *et al*, 2013], incluyendo daño por IR en corazón [Aksentijević *et al*, 2014]. He *et al* [2016] demostró que un agente que protege contra el daño por I/R es capaz de atenuar el nivel de carbonilación a nivel mitocondrial en corazones sometidos a I/R a los 30 minutos de reperfusión. Se han encontrado también menores niveles de carbonilación en tejido miocárdico de pacientes sometidos a cirugía cardiaca con circulación extracorpórea que habían recibido suplemento dietario con vitamina C [Castillo *et al*, 2010]. Kumar *et al* (2013) reportó un aumento en el nivel de carbonilación en corazones aislados de ratón sometidos a isquemias de 20 minutos seguidas de reperfusión de 5 ó 30 minutos, aunque no especifica si hizo cuantificación total de grupos carbonilos [Kumar *et al*, 2013]. Para evaluar el efecto en la carbonilación de proteínas debemos aumentar el número de experimentos debido a la alta dispersión de los resultados, que probablemente se ven afectados también por el hecho de estar cuantificando el carril con todas las proteínas celulares lo que no permitiría identificar aquellas que tienen más probabilidad de carbonilarse.

En este trabajo hemos observado que el contenido de RyR2 disminuye por la IR, de modo similar al reporte de otros autores, ya sea en corazón de rata [Temsah *et al*, 1999; Singh *et al*, 2004] o en cardiomiocito neonatal [Pedrozo *et al*, 2010]. En 2004, Sanvicens *et al* describieron que el uso de un antioxidante (CR-6) -un scavenger, tal como los agentes utilizados en este trabajo- era capaz de disminuir la actividad de las calpaínas, y entre los mecanismos que proponen para este efecto está la protección de proteínas del retículo contra ROS [Sanvicens *et al*, 2004]. Por su parte en 2008, Toh *et al* describieron en neurona en cultivo que el estrés oxidativo es capaz de aumentar la actividad de las calpaínas. De esta manera, un posible mecanismo por el cual el AA protege al RyR2 podría ser por una menor activación de calpaínas secundaria a atrapamiento de ROS, lo cual es sustentado por la preservación del contenido de glutatión dado por AA en esta tesis.

Entre las limitaciones que tiene este trabajo, está en primer lugar un tamaño muestral que no es igual en las distintas determinaciones que se realizaron, lo cual aumenta la variabilidad y disminuye la probabilidad de encontrar significancia. Por otro lado, como ya se comentó, el hecho que la totalidad del oxígeno esté diluido en la solución Krebs, podría estar afectando el estado redox con que el AA llega al corazón y entonces quizás estaríamos favoreciendo la generación de un ambiente con mayor tendencia a la oxidación. Considerando estos dos puntos, el AA muestra efectos protectivos en algunas de las variables estudiadas, por lo que se requieren más estudios para aclarar el mecanismo por el cual estaría generando protección.

CONCLUSIONES

- 1.- El AA mejora el DPVI en relación al grupo IR

- 2.- El AA tiene un efecto moderado mejorando el contenido de glutatión total en corazón de rata sometido a IR.

- 3.- El AA tiene un efecto dosis dependiente sobre la liberación de 8-isoprostanos medidos a los 15 minutos de reperfusión. En concentración de 1 mM no modifica su liberación pero cuando se administra en concentraciones de 10 mM, sí lo hace.

- 4.- El AA no modifica la incorporación de NEM-Biotina o la carbonilación de proteínas en este modelo.

- 5.- El AA es capaz de evitar parcialmente la disminución del RyR2, sin modificar el contenido de MFN-2 ni eNOS.

BIBLIOGRAFÍA

Aksentijević D, Zervou S, Faller K, McAndrew D, Schneider J, Neubauer S, Lygate C. “Myocardial creatine levels do not influence response to acute oxidative stress in isolated perfused heart”. *PLOS ONE*. 9 (10) e109021, 2014.

Arreguín F, García N, Hernández-Reséndiz S, Buelna-Chontal M, Correa F, Olín-Sandoval V, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverrí J, Zazueta C. “Attenuation of oxidant damage in the postconditioned heart involves non-enzymatic response and partial catalytic protection”. *Experimental Physiology*. 97 (10): 1119–1130, 2012.

Atkuri K, Mantovani J, Herzenberg L, Herzenberg L. “N-acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency”. *Current Opinion in Pharmacology*. 7(4): 355–359, 2007.

Barden A, Beilin L, Ritchie J, Croft K, Walters B, Michael C. “Plasma and urinary 8-iso-prostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy”. *Clinical Science*. 91 (6): 711–718, 1996.

Boengler K, Heusch G, Schulz R. “Mitochondria in Postconditioning”. *Antioxidants & Redox Signaling*. 14: 863 – 880, 2011.

Bond J, Herman B, Lemasters J. “Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179: 798 – 803, 1991.

Castillo R, Rodrigo R, Perez F, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, Navarrete R, Villalabeitia E, Sanz J, Baeza C, Aguayo R. “Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation”. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 108: 256–262, 2010.

Ceconi C, Bernocchi P, Boraso A, Cargnoni A, Pepi A, Curello S, Ferrari R. “New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage”. *Cardiovascular Research*. 47: 586–594, 2000.

Cisternas P, Silva-Álvarez C, Martínez F, Fernández E, Ferrada L, Oyarce K, Salazar K, Bolaños J, Nualart F. “The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism”. *Journal of Neurochemistry*. 129: 663–671, 2014.

Domenech R, Macho P, Vélez D, Sánchez G, Liu X, Dhalla N. “Tachycardia preconditions the infarct size in dogs. Role of adenosine and protein kinase C”. *Circulation*. 97: 786–794, 1998.

Domenech R, Sánchez G, Donoso P, Parra V, Macho P. “Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca_2^+ dynamics: a mechanism for preconditioning?”. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 35(12): 1429-1437, 2003.

Donoso P, Sánchez G, Bull R, Hidalgo C. “Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS”. *Frontiers in Bioscience*. 16: 553 – 67, 2011.

Eaton P, Byers H, Leeds N, Ward M, Shattock M. “Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion”. *The Journal of Biological Chemistry*. 22 (12): 9806-11, 2002

Elahi, M, Kong Y, Matata B. “Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2 (5) 259-269, 2009.

Fang Y, Yang S, Wu G. “Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition”. *Nutrition*. 18: 872–879, 2002.

Fauconnier J, Roberge S, Saint N, Lacampagne A. "Type 2 ryanodine receptor: A novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion". *Pharmacology and Therapeutics*. 138: 323–332, 2013.

Fedorova M, Bollineni R, Hoffmann R. "Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies". *Mass Spectrometry Reviews*. 33: 79–97, 2014.

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Alfieri O, Pardini A, Marzollo P, Visioli O. "Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents". *American Journal of Medicine*. 30 (3):95-105, 1991.

Förstermann U, Sessa W. "Nitric oxide synthases: regulation and function". *European Heart Journal*. 33: 829–837, 2012.

Fukuzawa K. "Dynamics of Lipid Peroxidation and Antioxidation of α -Tocopherol in Membranes". *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 54: 273 – 285, 2008.

Gao F, Yao C, Gao E, Mo Q, Yan W, Mclaughlin R, Lopez B, Christopher T Ma X. "Enhancement of Glutathione Cardioprotection by Ascorbic Acid in Myocardial Reperfusion Injury". *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 301 (2):543–550, 2002.

Griffith OW. "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine". *Analytical Biochemistry*. 106: 207 – 212, 1980.

Guaiquil V, Golde D, Beckles D, Mascareno E, Siddiqui M. "Vitamin c inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts". *Free Radical Biology & Medicine*. 37 (9): 1419–1429, 2004.

Guan W, Osanai T, Kamada T, Ishizaka H, Hanada H, Okumura K. “Time Course of Free Radical Production After Primary Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction and the Effect of Vitamin C”. *Japanese Circulation Journal*. 63: 924 – 928, 1999.

Guo X, Chen K, Guo Y, Liao H, Tang J, Xiao R. “Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway”. *Circulation Research*. 101: 1113–1122, 2007.

Gutteridge J, Halliwell B. “Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 899: 136-147, 2000

Haramaki N, Stewart D, Aggarwal S, Ikeda H, Reznick A, Packer L. “Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion”. *Free Radical Biology and Medicine*. 25:329–333, 1998.

Hartree EF. “Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response”. *Analytical Biochemistry*. 48: 422 – 427, 1972.

He H, Huh J, Wang H, Kang Y, Lou J, Xu Z. “Mitochondrial events responsible for morphine's cardioprotection against ischemia/reperfusion injury”. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1 (290): 66-73, 2016.

Hill B, Reily C, Oh J, Johnson M, Landar A. “Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome”. *Free Radical Biology and Medicine*. 47(6):675-83, 2009.

Howells D, Hyland K. “Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: Prevention of autoxidation during storage and analysis”. *Clinica Chimica Acta*. 167 (1): 23–30, 1987.

Hurd TR, Filipovska A, Costa NJ, Dahm CC, Murphy MP. “Disulphide formation on mitochondrial protein thiols”. *Biochemical Society Transactions*. 33: 1390 – 1393, 2005.

Jourdan K, Evans T, Goldstraw P, Mitchell J. “Isoprostanes and PGE₂ production in human isolated pulmonary artery smooth muscle cells: concomitant and differential release”. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13 (9):1025-1030, 1999.

Kalász J, Pásztor E, Fagyas M, Balogh Á, Tóth A, Csató V, Édes I, Papp Z, Borbély A. “Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes”. *Free Radical Biology and Medicine*. 84: 116-127, 2015.

Kalyanaraman B. “Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms”. *Redox Biology* 1: 244–257, 2013.

Kijima Y, Hashimura K, Matsu-ura Y, Kato Y, Yasuda T, Ueda T, Orita Y, Fukunaga M. “Transcardiac 8-iso-prostaglandin F (2 alpha) generation from acute myocardial infarction heart: insight into abrupt reperfusion and oxidant stress”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 64 (3): 161-6, 2001.

Kone B, Kunczewicz T, Zhang W, Yu Z. “Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide”. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 285: 178 – 190, 2003.

Kumar V, Kleffmann T, Hampton M, Cannell M, Winterbourn C. “Redox proteomics of thiol proteins in mouse heart during ischemia/reperfusion using ICAT reagents and mass spectrometry”. *Free Radical Biology and Medicine*. 58: 109–117, 2013.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. “Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase”. *The Journal of Biological Chemistry*. 25: 22546 – 22554, 2003.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. “Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension”. *The Journal of Clinical Investigation*. 111: 1201-1209, 2003.

Lane DJR, Lawen A. “Ascorbate and plasma membrane electron transport— Enzymes vs efflux”. *Free Radical Biology and Medicine*. 47: 485 – 495, 2009.

Lemasters J, Bond J, Chacon E, Harper I, Kaplan S, Ohata H, Trollinger D, Herman B, Cascio W. “The pH paradox in ischemiareperfusion injury to cardiac myocytes”. *EXS*. 76: 99 –114, 1996.

Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. “Vitamin C: update on physiology and pharmacology”. *British Journal of Pharmacology*. 157: 1097 – 1110, 2009.

Mao X, Wang T, Liu Y, Irwin M, Ou J, Liao X, Gao X, Xu Y, Ng K, Vanhoutte P, Xia Z. “N-acetylcysteine and allopurinol confer synergy in attenuating myocardial ischemia injury via restoring HIF-1 α /HO-1 signaling in diabetic rats”. *PLoS One*. 18;8(7), 2013.

Milne G, Yin H, Morrow J. “Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway”. *The Journal Of Biological Chemistry*. 283 (23): 15533–15537, 2008.

Misra M, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R. “Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes”. *Medical Science Monitor*. 15: 209 – 219, 2009.

Mortensen A, Lykkesfeldt J. “Does vitamin C enhance nitric oxide bioavailability in a tetrahydrobiopterin-dependent manner? *In vitro*, *in vivo* and clinical studies”. *Nitric oxide*. 36: 51-57, 2014.

Okazaki T, Otani H, Shimazu T, Yoshioka K , Fujita M, Iwasaka T. “Ascorbic acid and N-acetyl cysteine prevent uncoupling of nitric oxide synthase and increase tolerance to ischemia/reperfusion injury in diabetic rat heart”. *Free Radical Research*. 45(10): 1173–1183, 2011;

Ong S, Hausenloy D. “Mitochondrial morphology and cardiovascular disease”. *Cardiovascular Research*. 88: 16–29, 2010.

Orhan G, Yapici N, Yuksel M, Sargin M, Senay S, Yalçın A, Aykaç Z, Aka S. “Effects of N-acetylcysteine on myocardial ischemia-reperfusion injury in bypass surgery”. *Heart Vessels*. 21(1):42-7, 2006.

Park J, Choi H, Min J, Kim B, Lee S, Yun J, Choi M, Chang K, Lee D. “Loss of mitofusin 2 links beta-amyloid-mediated mitochondrial fragmentation and Cdk5-induced oxidative stress in neuron cells”. *Journal of Neurochemistry*. 132 (6): 687-702, 2015.

Pedrozo Z, Sánchez G, Torrealba N, Valenzuela R, Fernández C, Hidalgo C, Lavandero S, Donoso P. “Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802. 356–362, 2010.

Peng C, Rao W, Zhang L, Wang K, Hui H, Wang L, Su N, Luo P, Hao Y, Tu Y, Zhang S, Fei Z. “Mitofusin 2 ameliorates hypoxia-induced apoptosis via mitochondrial function and signaling pathways”. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 69: 29 - 40, 2015.

Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P. “Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787. 781– 793, 2009.

Perrelli M, Pagliaro P, Penna C. “Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species”. *World Journal of Cardiology*. 3(6): 186 – 200, 2011.

Raza H. “Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease”. *FEBS Journal*. 278: 4243 – 4251, 2011.

Riquelme J, Westermeier F, Hall A, Vicencio J, Pedrozo Z, Ibacache M, Fuenzalida B, Sobrevia L, Davidson S, Yellon D, Sánchez G, Lavandero S. “Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism”. *Pharmacol Research*. 103: 318-327, 2016.

Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard J, Lorgis L, Cottin Y, Vergely C. “Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets?” *Pharmacology & Therapeutics*. 140 (3): 239-257, 2013.

Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Bächler J. “Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension”. *Clinical Science (London)*. 114 (10): 625-634, 2008.

Rodrigo R, Miranda A. “Vitamin C: Nutritional Role, Supplementation in Pathophysiological States and Side Effects (Nutrition and Diet Research Progress)”. Nova Science Pub inc. 103p, 2010.

Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. “Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage”. *Disease Markers*. 35(6): 773-790, 2013.

Sanvicens N, Gómez-Vicente V, Masip I, Messeguer A, Cotter T. “Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6”. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (38): 39268-39278, 2004.

Şentürk T, Çavun S, Avcı B, Yermezler A, Serdar Z, Savcı V. “Effective inhibition of cardiomyocyte apoptosis through the combination of trimetazidine and N-acetylcysteine in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion injury”. *Atherosclerosis*. 237(2):760-766, 2014.

Shelly C. “Glutathione Synthesis”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830 (5): 3143–3153, 2013.

Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, Cheng H, Chen K, Xiao R. “Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis”. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 23354–23361, 2007.

Singh R, Chohan P, Dhalla N, Netticadan T. “The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart”. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 37: 101–110, 2004.

Singh R, Hryshko L, Freed D, Dhalla N. “Activation of proteolytic enzymes and depression of the sarcolemmal Na⁺/K⁺-ATPase in ischemia-reperfused heart may be mediated through oxidative stress”. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 90: 249–260, 2012.

Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelağ A, Schulz R. “Isolated heart perfusion according to Langendorff —Still viable in the new millennium”. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 55: 113 – 126, 2007.

Skyschally A, Schulz R, Pres P, Korth H, Heusch G. “Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid”. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 284: 698–703, 2003.

Temsah R, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, Dhalla N. “Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemicreperfused rat heart”. *American Journal of Physiology*. 277: 584–594, 1999.

Toh T, Chen M, Armugam A, Peng Z, Li Q, Jeyaseelan K, Cheung N. “Antioxidants: promising neuroprotection against cardiotoxin-4b-induced cell death which triggers oxidative stress with early calpain activation”. *Toxicon*. 51(6): 964-973, 2008.

Traber MG, Stevens JF. “Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective”. *Free Radical Biology and Medicine*. 51: 1000– 1013, 2011.

Tsai M, Huang C, Tsai C, Chen H, Lee H, Cheng H, Hsu C, Wang T, Chang W, Chen W. “Ascorbic acid mitigates the myocardial injury after cardiac arrest and electrical shock”. *Intensive Care Medicine*. 37(12): 2033-2040, 2011.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. “Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities”. *Hypertension*. 3: 534 -539, 2003

Wang T, Mao X, Li H, Qiao S, Xu A, Wang J, Lei S, Liu Z, Ng K, Wong G, Vanhoutte P, Irwin M, Xia Z. “N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the Jak/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial postischemic injury in diabetes”. *Free Radical Biology and Medicine*. 63: 291-303, 2013

Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D. “Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission–fusion proteins”. *FEBS Journal*. 278: 941–954, 2011.

Zaobornyj T, Ghafourifar P. “Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence”. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 303: 1283–1293, 2012.

Zheng M, Xiao R. “Role of mitofusin 2 in cardiovascular oxidative injury”. *Journal of Molecular Medicine*. 88:987–991, 2010.