

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“Papel de la vía eNOS-óxido nítrico en el efecto pre-
condicionante cardíaco de dexmedetomidina”**

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

Por:

Jaime Andrés Riquelme Meléndez

Directores de Tesis

Dra. Gina Sánchez V.

Dr. Sergio Lavandero G.

Universidad de Chile

**SANTIAGO-CHILE
2015**

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 presentada por el candidato:

Jaime Andrés Riquelme Meléndez

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 _____

Dr. Sergio Lavandero _____

Comisión Informante:

Dr. Ramón Rodrigo (Presidente) _____

Dra. Paola Casanello _____

Dra. Virginia Fernández _____

Dr. Rody San Martín _____

Dr. Jorge Jalil _____

Dedicada a mi hermana Paola.

Nada es imposible.

Publicaciones

Riquelme JA, Westermeier F, Hall AR, Vicencio JM, Pedrozo Z, Ibacache M, Fuenzalida B, Sobrevía L, Davidson SM, Yellon DM, Sánchez G, Lavandero S. **Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism.** Pharmacol Res, 2015. (en revisión).

Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, Zheng Y, Riquelme JA, Kearney J, Sharma V, Multhoff G, Hall AR, Davidson SM. **Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury.** J Am Coll Cardiol, 2015. 65: 1525-36.

Zepeda R, Kuzmicic J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, Pedrozo Z, Chiong M, Sánchez G, Lavandero S. **Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen-dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury.** J Cardiovasc Pharmacol 2014. 63:477-87.

Troncoso R, Díaz-Elizondo J, Espinoza SP, Navarro-Marquez MF, Oyarzún AP, Riquelme JA, Garcia-Carvajal I, Díaz-Araya G, García L, Hill JA, Lavandero S. **Regulation of cardiac autophagy by insulin-like growth factor 1.** IUBMB. Life. 2013, 65:593-601.

Presentaciones en Congresos

2015

Riquelme JA, Westermeier F, Hall AR, Vicencio JM, Pedrozo Z, Ibacache M, Fuenzalida B, Sobrevia L, Davidson SM, Yellon DM, Sánchez G, Lavandero S. **Dexmedetomidine preconditions the myocardium through an endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide/cyclic GMP dependent protein kinase pathway.** XXV^o Congreso Interamericano de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Diciembre, Santiago, Chile.

Westermeier F, Riquelme JA, Utreras-Mendoza Y, Romero D, Sánchez G, Lavandero. **Adenosine receptor 1 mediates insulin-induced glucose uptake in adult rat cardiomyocytes.** XXXVIII Reunión Annual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Septiembre, Puerto Varas, Chile.

2014

Pedrozo Z, Morales CR, Riquelme JA, Gillette TG, Lavandero S, Hill JA. **Polycystin-1 regulates L-type calcium channel stabilization during mechanical stretch in cardiomyocytes.** I Congreso Panamericano de Ciencias Fisiológicas, Agosto, Foz de Iguazú, Brasil.

Westermeier F, Vásquez-Trincado C, Riquelme JA, Valladares D, Jaimovich E, Lavandero S. **Adenosine regulates insulin-induced glucose uptake in neonatal rat cardiomyocytes.** XXXVII Reunión Annual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Septiembre, Puerto Varas, Chile.

2013

Riquelme JA, Montecinos L, Hassi M, Fernandez C, Ibacache M, Pedrozo Z, Sánchez G and Lavandero S. **Nitric oxide production mediates dexmedetomidine-induced cardiac preconditioning**. XII PABMB Congress. Noviembre, Puerto Varas, Chile.

Financiamiento

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiopatología Cardíaca de la Dra. Gina Sánchez de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares del Dr. Sergio Lavandero, perteneciente al Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y en el Hatter Cardiovascular Institute del Professor Derek Yellon en University College London.

Para su realización, este trabajo fue apoyado y financiado por los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT Doctorado Nacional 2011-2015 (Jaime Riquelme).
- Beca CONICYT de pasantía Doctoral Julio – Diciembre, 2014 (Jaime Riquelme).
- Proyecto FONDECYT 1130407 (Dra. Gina Sánchez).
- Proyecto FONDAP 15130011 (Dr. Sergio Lavandero).

Agradecimientos

En primer lugar, gracias a Cecilia Meléndez Quiroga y a Jaime Riquelme Núñez. El amor y sabiduría con el que fui formado, me han hecho una persona feliz y sus incansables esfuerzos por darme todas las oportunidades para desarrollarme, me permiten el día de hoy escribir esta tesis doctoral y perseguir aquella búsqueda de conocimiento que ellos mismos estimularon en mí.

A Paola Riquelme Meléndez, por ser mi ejemplo a seguir desde que éramos niños y por potenciar mi desarrollo personal y académico. Fue ella la que me convenció de tomar la decisión de tocar las puertas de la Gloriosa Universidad de Chile para comenzar mi formación como científico. Asimismo, esta tesis y la publicación de la misma, fueron escritas en un computador que ella me regaló, en un momento en el que yo no tenía la posibilidad de adquirir uno.

Gracias a Anaís Tolosa Calderón, por todo el cariño y paciencia que me ha entregado a lo largo de los años. Por celebrar todos mis triunfos y levantarme tras las derrotas. Su tenacidad, su generosidad y la dulzura de su amor, me han hecho una mejor persona.

Quisiera manifestar mi más profundo agradecimiento a mis tutores de tesis. Al Dr. Sergio Lavandero, por confiar en mí, abrir las puertas de su Laboratorio y darme todas las oportunidades para desarrollar el máximo de mi potencial. Sin duda que su gran optimismo y profesionalismo se han transmitido hacia mi persona y el día de hoy asumo todos los desafíos con la misma actitud. Asimismo, también le agradezco por presentarme a la Dra. Gina Sánchez, quién ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis y para mi formación personal y científica. La Dra. Sánchez ha sido muy generosa conmigo, ayudándome en un sinnúmero de ocasiones y su ejemplo me enseñó a trabajar con rigurosidad, profesionalismo y orientando siempre el trabajo hacia la calidad.

A la comisión evaluadora de esta tesis, los profesores Ramón Rodrigo, Jorge Jalil, Virginia Fernández, Rody San Martín y Paola Casanello, por aceptar participar de este trabajo

cumpliendo un rol formador de máxima calidad. Su retroalimentación y agudos y constructivos aportes, permitieron mejorar la calidad de este trabajo.

Gracias a Francisco Westermeier. No hay duda de que ninguno de mis recientes logros sería posible sin la ayuda de él. Es un verdadero agrado trabajar con un científico creativo, ordenado, proactivo y muy inteligente. Sin embargo, más importante que todo eso, Francisco es mi amigo y estoy orgulloso de eso.

Quiero expresar mi máximo reconocimiento a Fidel Albornoz y Gindra Latorre. El trabajo de ambos ha sido clave para desarrollar esta tesis y su inagotable alegría, así como su simpatía y empatía, me han hecho sonreír durante todos estos años y pienso que todos los miembros del laboratorio somos afortunados por contar con tan dilectas personas en el equipo de trabajo.

Gracias a Guillermo Arce y Rodrigo Durán. Han sido años de arduo trabajo en equipo. Su rigurosidad y dedicación, sus lecciones de vida, su incondicional apoyo y excelente sentido del humor, han generado una amistad que me enorgullece y que sin duda perdurará en el tiempo.

Gracias a la Profesora Paulina Donoso, y Luis Montecinos por toda su ayuda. Los quiero, respeto y admiro mucho y considero un privilegio poder trabajar con ellos y aprender de su excelente calidad humana y científica.

Finalmente, deseo agradecer a mis amigos y amigas: Yennifer Ávalos, Jimena Canales, César Vásquez, Zully Pedrozo, Mario Navarro, Mario Pavez, Elisa Villalobos, Sabrina Sepúlveda, Stefanie Chalmers, Alfredo Sagredo, Eduardo Sagredo, Daniela Santander, José Miguel Vicencio, Adrew Hall, Andrea Herrera, Cristóbal Gómez, Beatriz Piquer, Mauricio Muñoz, Javier Sepúlveda, Gustavo Campos y Daniel Burgos. Durante todos estos años, he recibido su ayuda, consejo, ánimo, cariño y sabiduría. Los quiero mucho y me considero muy afortunado por poder contar con su linda amistad.

Índice

	Página
Resumen.....	12
Summary.....	13
1. Introducción.....	14
1.1. Infarto del miocardio.....	14
1.2. Alteraciones moleculares en isquemia-reperfusión (IR) cardíaca.....	14
1.3. Cardioprotección y pre-condicionamiento.....	17
1.4. Interacción endotelio-cardiomiocito y su papel en la protección frente a IR cardíaca.....	20
1.5. Cardioprotección por la vía eNOS/NO/PKG.....	20
1.6. Pre-condicionamiento farmacológico: Dexmedetomidina.....	23
2. Hipótesis.....	24
3. Objetivo general.....	24
4. Objetivos específicos.....	24
Objetivo específico 1.....	24
Objetivo específico 2.....	24
Objetivo específico 3.....	25
5.- Materiales y métodos.....	25
5.1 Reactivos.....	25
5.2 Animales.....	25
5.3.- Modelo <i>ex vivo</i> de isquemia reperfusión global.....	25
5.4.- Protocolos experimentales.....	26
5.5. Medición de tamaño de infarto.....	27

5.6. Medición de la función del ventrículo izquierdo.....	28
5.7. Obtención de homogenizados de tejidos.....	28
5.8. Western blot y determinación de dímeros de eNOS e iNOS.....	28
5.9. Determinación de nitritos por reacción de Griess.....	29
5.10. Cultivo primario de cardiomiocitos de rata.....	29
5.11. Co-cultivo de cardiomiocitos de rata adulta con células HUVEC.....	30
5.12. Células HUVEC primarias y formación de L-citrulina.....	30
5.13. Apertura de PTPM.....	31
5.14. IR simulada <i>in vitro</i>	31
5.15. Muerte celular.....	32
5.16. PCR a tiempo real (qPCR).....	32
5.17. Análisis estadístico.....	32
6. Resultados.....	33
6.1 Dexmedetomidina activa la vía eNOS/NO en corazón aislado de rata adulta.....	33
6.2 Dexmedetomidina reduce el tamaño de infarto a través de un mecanismo dependiente de la vía eNOS/NO/PKG.....	35
6.3 Dexmedetomidina mejora la recuperación de la función ventricular en IR cardíaca a través de un mecanismo dependiente de la vía eNOS/NO/PKG.....	37
6.4 Dexmedetomidina no protege de la muerte celular en cardiomiocitos sometidos a sIR.....	39
6.5 Dexmedetomidina requiere la presencia del endotelio para proteger al cardiomiocito frente a sIR.....	41

7. Discusión.....	44
7.1 Activación de la vía eNOS/NO inducida por dexmedetomidina.....	44
7.2. Pre-condicionamiento con dexmedetomidina mediante la vía eNOS/NO/PKG.....	45
7.3 Dexmedetomidina protege al cardiomiocito de IR de forma indirecta a través del endotelio.....	47
7.4. Limitaciones del estudio.....	48
8. Conclusiones.....	51
9. Referencias.....	52

Índice de Figuras

Fig. 1. Protocolo experimental para experimentos en sistema Langendorff.....	27
Fig. 2. Dex aumenta la dimerización de eNOS y producción de nitritos en corazones aislados.....	34
Fig. 3. Dex reduce el tamaño de infarto a través de la vía eNOS/NO/PKG en corazones aislados de rata adulta sometidos a IR.....	36
Fig 4. Dex mejora los parámetros hemodinámicos a través de la vía eNOS/NO/PKG en corazones aislados de rata adulta sometidos a IR global.....	38
Fig. 5. Dex no retrasa la apertura del PTPM ni reduce la muerte celular en cardiomiocitos.....	40
Fig. 6. Dex requiere del endotelio para reducir la muerte celular en cardiomiocitos posterior a sIR	42
Fig. 7. Dex activa a NOS en el endotelio y no en el cardiomiocito a través de un mecanismo dependiente de la activación del receptor α 2-adrenérgico.....	43
Fig. 8. Modelo Propuesto.....	48

Resumen

Dexmedetomidina (Dex) es un agonista alfa₂ adrenérgico altamente selectivo utilizado como coadyuvante en anestesia. Se ha descrito que además de su efecto sedante, Dex pre-condiciona el corazón frente a isquemia-reperfusión (IR). Sin embargo, no se ha establecido con claridad el mecanismo farmacológico implicado en la protección miocárdica con Dex y si este mecanismo se lleva a cabo de forma directa o indirecta en el cardiomiocito. El endotelio y la vía óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)/óxido nítrico (NO)/ proteína kinasa dependiente de GMP cíclico (PKG) han sido descritos como factores clave para disminuir el daño por reperfusión. Los objetivos de este trabajo se enfocaron en estudiar si la vía eNOS/NO/PKG es responsable del efecto cardioprotector inducido por Dex y si este pre-condicionamiento en el cardiomiocito requiere la presencia del endotelio. Para evaluar esto, se utilizaron corazones aislados de rata en sistema Langendorff y fueron tratados con Dex (10 nM) durante 25 min y se determinó la formación de dímeros de eNOS y la producción de NO. Posteriormente, los corazones fueron sometidos a 30 min de isquemia global y 120 min de reperfusión. Además, la participación de la vía eNOS/NO/PKG fue evaluada. Dex indujo la activación de eNOS y generación de NO. Asimismo, Dex disminuyó el tamaño de infarto ($16 \pm 10\%$) en comparación a los corazones no tratados y sometidos a IR ($42 \pm 12\%$) y mejoró los parámetros funcionales del ventrículo izquierdo al final de la reperfusión, pero este efecto se revirtió cuando Dex fue co-administrada con los inhibidores de la vía eNOS/NO/PKG. Además, Dex no redujo la muerte celular en cardiomiocitos de rata adulta sometidas a IR simulada (sIR) ($65 \pm 8\%$) en comparación a las células control ($63 \pm 8\%$). Sin embargo, Dex disminuyó la muerte celular co-cultivando cardiomiocitos con células endoteliales pre-tratadas con Dex ($39 \pm 6\%$). Por lo tanto, los resultados sugieren que Dex induce su efecto preconditionante cardíaco activando la vía eNOS/NO/PKG y este efecto farmacológico requiere la interacción del cardiomiocito con el endotelio.

Summary

Dexmedetomidine (Dex) is a highly selective alpha₂ adrenergic receptor agonist used as a coadjutant in anesthesia. It has been described that Dex acts not only as a sedative, but it can also pre-condition the heart against ischemia-reperfusion (IR). However, the pharmacological mechanisms that mediate the myocardial protection with Dex and whether this action happens directly or indirectly on the cardiomyocyte, remains to be fully elucidated. The endothelium and the nitric oxide synthase (eNOS)/nitric oxide (NO)/cyclic GMP dependent kinase (PKG) pathway have been described as key factors to reduce reperfusion injury. The aims of this work are focused on studying if the eNOS/NO/PKG pathway is responsible for the cardioprotection induced by Dex and whether this pre-conditioning happens directly on the cardiomyocyte or requires the presence of the endothelium. To evaluate this, isolated rat hearts using the Langendorff system were treated for 25 min with Dex 10 nM and the formation of eNOS dimers and production of NO was assessed. Then, the hearts were subjected to 30 min of global ischemia, followed by 120 min of reperfusion. Also, the role of the eNOS/NO/PKG was studied. Dex triggered the activation of eNOS and generation of NO. Moreover, Dex reduced the infarct size ($16 \pm 10\%$) compared to untreated hearts ($42 \pm 12\%$) and improved the functional parameters of the left ventricle at the end of reperfusion, but this effect was reversed when Dex was co-administered with the eNOS/NO/PKG inhibitors. Also, Dex did not reduced cell death on adult rat cardiomyocytes subjected to simulated IR (sIR) ($65 \pm 8\%$) compared to control cells ($63 \pm 8\%$). However, Dex reduced cell death when cardiomyocytes were co-cultured with endothelial cells pre-treated with Dex ($39 \pm 6\%$). Therefore, our results suggest that Dex induces its cardiac pre-conditioning effect activating the eNOS/NO/PKG pathway and this pharmacological effect requires the interaction between the cardiomyocyte and the endothelium.

1. Introducción

1.1. Infarto del miocardio

El infarto del miocardio es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, pudiendo ser un evento menor en una enfermedad crónica o manifestarse como un evento catastrófico que resulte en muerte súbita o en deterioro hemodinámico severo. El criterio para su diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente, detección de niveles de biomarcadores cardíacos (preferentemente troponinas), síntomas de isquemia, alteraciones electrocardiográficas específicas o evidencia imagenológica de pérdida de función de miocardio viable o movimiento anormal de la pared ventricular [1].

El término infarto del miocardio refleja la muerte por necrosis de cardiomiocitos generada por una isquemia prolongada, la cual se define como un desbalance entre el suministro y demanda de la perfusión, es decir, de oxígeno y nutrientes [2]. Si los cardiomiocitos se someten a breves períodos de isquemia, éstos no mueren, lo cual se define como la fase reversible de la isquemia. Sin embargo si ésta se prolonga, los cardiomiocitos entran en lo que se conoce como la fase irreversible, ya que la consecuente reperfusión no revierte el daño generado por la isquemia [3, 4]. Entre los síntomas de isquemia se encuentran dolor en el pecho y/o brazo en respuesta a un esfuerzo o en reposo. El malestar puede prolongarse por alrededor de 20 min y puede asociarse a disnea, náusea, vómito o mareos [2].

1.2. Alteraciones moleculares en isquemia-reperfusión (IR) cardíaca

Los procesos de isquemia se caracterizan por una baja severa o absoluta de los niveles de oxígeno en los tejidos, lo cual genera un predominio de la glicólisis anaerobia por sobre el metabolismo aeróbico mitocondrial en las células dañadas por isquemia.

Posteriormente, el aumento de la concentración intracelular de lactato y la disminución del pH por acumulación de protones (H^+) llevan a una inhibición de la glicólisis [5].

El metabolismo de los nucleótidos de adenina se altera durante la isquemia, generándose una depleción de ATP cuya magnitud depende de la severidad de la isquemia. Estas bajas en los niveles de ATP y nucleótidos de adenina se deben a una inadecuada velocidad de producción de ATP en relación a la demanda de energía del corazón y tiene como consecuencia, una disminución de la contractibilidad del miocardio, hasta llegar a un estado acontráctil del tejido. El ADP acumulado se degrada a AMP y éste, en adenosina, la cual difunde hacia el extracelular, generando la pérdida del 40% del pool de adenosina en la célula [6].

La acidosis metabólica inducida por la isquemia favorece la activación del intercambiador de Na^+/H^+ , que transporta protones hacia el espacio extracelular y mueve Na^+ hacia el citosol, produciendo su acumulación. Sin embargo, el Na^+ no puede ser expulsado, ya que la Na^+/K^+ ATPasa se encuentra inhibida producto de la falta de ATP. Las concentraciones de K^+ en el espacio extracelular aumentan, como consecuencia de la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa y el eflujo de este ión hacia el extracelular, siendo este último evento, un mecanismo regulador del equilibrio osmótico [6-9]. La actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , que usualmente transporta calcio hacia el exterior de la célula, se encuentra inhibida o revertida, producto de la disminución del gradiente de Na^+ , generándose una acumulación de Ca^{2+} en el citosol. El incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} también se favorece por la despolarización de la membrana inducida por la isquemia, lo que permite la apertura de los canales de calcio tipo-L, generando un mayor influjo de Ca^{2+} en el cardiomiocito [10].

A pesar de que la mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) se generan durante la reperfusión, durante la isquemia se produce anión superóxido a través de los complejos I y III de la mitocondria [11].

La reperfusión, por definición, alivia o reduce el daño generado por la isquemia, en la medida de que ésta ocurra pronto tras la oclusión de la arteria coronaria. Sin embargo, si la isquemia es prolongada, la reperfusión puede resultar en una serie de complejos fenómenos que pueden tener efectos perjudiciales en el cardiomicito [12, 13]. Durante la reperfusión, se genera una restauración parcial del contenido de ATP, proveniente de la fosforilación de ADP a ATP. Además, al retornar el oxígeno a las células isquémicas, se produce un marcado aumento en la producción de ROS. El miocardio isquémico presenta una pérdida de enzimas con actividad antioxidante. Además, contiene grandes cantidades de hipoxantina, que es convertida a xantina por la xantina-oxidasa, lo cual puede llevar a la formación de anión superóxido y radical hidroxilo, que en grandes cantidades, ejercen un efecto dañino en la célula [6, 11].

El daño del miocardio en procesos de isquemia y reperfusión involucra aumento de las concentraciones de Ca^{2+} y de las ROS intracelulares, aumentando la peroxidación de la membrana celular, lo que llevaría a la pérdida de la integridad de la célula, con un consecuente mayor ingreso de Ca^{2+} a ésta. Luego de que se inicia la reperfusión, el tejido cardíaco puede funcionar normal, atontado o morir por necrosis o apoptosis [10].

En procesos de isquemia y reperfusión, se activan mecanismos que pueden convertir a la mitocondria en la causa de la muerte del cardiomicito por apoptosis o necrosis. Este efecto es mediado por la apertura de un poro no específico ubicado en la membrana interna de la mitocondria, llamado poro de transición de permeabilidad mitocondrial

(PTPM). Este megacanal multiproteico conecta la matriz mitocondrial con el citoplasma. Las condiciones generadas en la isquemia que favorecen su apertura son el incremento en el Ca^{2+} intra-mitocondrial, la depleción del pool de adenina y la rápida y extensa formación de ROS. Finalmente, el retorno a los niveles normales del pH en la célula durante la reperfusión gatilla la apertura del poro, generando la pérdida de la permeabilidad de la membrana interna, lo cual se traduce en dos grandes consecuencias. En primer lugar, se genera una edematización de la mitocondria, llevando a la ruptura de la membrana externa mitocondrial con la consecuente liberación de proteínas como citocromo- c y otros factores que median la muerte celular por apoptosis. En segundo lugar, la membrana interna se hace permeable a protones, lo que lleva a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, causando que la ATP sintasa revierta su dirección y genere la hidrólisis del ATP. La consecuente baja de ATP genera una disrupción de la homeostasis del metabolismo y la activación de fosfolipasas, nucleasas y proteasas que llevarán a la muerte celular por necrosis si el PTPM no se cierra a tiempo [14, 15].

1.3. Cardioprotección y pre-condicionamiento

El daño por isquemia del miocardio solía considerarse irreversible, sin embargo, en la actualidad se ha mostrado que al someter el tejido cardíaco a estrés por falta de oxígeno o al privarlo de sustratos, por periodos cortos, se activan mecanismos endógenos de supervivencia celular. Estos mecanismos moleculares favorecen condiciones fisiológicas de adaptación a la isquemia, fenómeno que es conocido como “atontamiento” o hibernación del miocardio [16]. En 1986, Murry *et al* mostraron que es posible hacer que el miocardio sea menos susceptible al daño por isquemia y reperfusión dado que protegieron al corazón, sometiéndolo a breves períodos de isquemia antes de exponerlo a una isquemia prolongada, fenómeno que se denominó como pre-condicionamiento isquémico (PI). El

tamaño de infarto se redujo aproximadamente a un 25% respecto a los corazones no tratados con este PI [17]. La forma clásica de PI (pre-condicionamiento temprano) ocurre inmediatamente terminada la maniobra pre-condicionante, sin embargo, también se ha descrito una segunda ventana de pre-condicionamiento (pre-condicionamiento tardío), que se lleva a cabo entre las 24 a 72 h y se relaciona con la expresión de genes que codifican para la expresión de proteínas de sobrevida celular [18]. Asimismo, Zhao *et al* describieron en el año 2003, que aplicando los mismos breves ciclos de isquemia inmediatamente después de una isquemia de larga duración, también era posible reducir el daño por IR, fenómeno que se conoce como post-condicionamiento isquémico (PostCI) [19].

En cuanto a los mecanismos que median los efectos del Pre y PostCI, se ha mostrado que durante la reperfusión se activan cascadas de señalización de proteínas pro-sobrevida entre las cuales destacan la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y las proteínas kinasas AKT y ERK1/2. Esta vía se denomina RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinases) [20]. Sin embargo, dicha activación no es suficiente para generar cardioprotección y se requiere un estímulo farmacológico para aumentar la activación de la vía RISK [21]. Además, también se ha descrito la participación de otras proteínas como PKC- ϵ , PKG, p70S6K y GSK-3 β . En ese contexto, se ha indicado que adenosina, bradikinina y opioides actúan en paralelo para gatillar un estado de pre-condicionamiento a través de la activación de la proteína kinasa C (PKC). Mientras que adenosina se vincula directamente a PKC, los opioides y bradikinina lo hacen a través de una compleja vía de señalización: PI3K-AKT, óxido nítrico (NO), guanilato ciclasa soluble (sGC), canales de potasio dependientes de ATP (K-ATP) y activación de la PKC por señalización redox. La protección se deriva de la inhibición de la formación del PTPM a través de la activación de

las quinasas de sobrevivencia AKT y ERK1/2, cuya inhibición del PTPM se ejerce por medio de la fosforilación de GSK-3 β [20, 22].

A pesar de que actualmente existe evidencia de que tanto el pre-condicionamiento como el post-condicionamiento tendrían una potencial aplicación en contextos clínicos, tales como la cirugía cardíaca [23], son maniobras invasivas y de difícil ejecución en la práctica clínica.

En 1993 se describió el preconditionamiento isquémico remoto (RIPC, por su sigla en inglés). El RIPC consiste en generar breves ciclos de IR en un tejido u órgano lejano (ej.: extremidades superiores o inferiores), permitiendo proteger el miocardio a la distancia. Después de 20 años de investigación, el mecanismo por el cual se genera el RIPC, aún no se establece con claridad. En dicho contexto, actualmente se consideran tres variables interrelacionadas: A) El estímulo de RIPC promueve la liberación de autacoides en el tejido remoto que activan una vía neuronal aferente. B) Un factor humoral transmitido por la sangre y una vía neuronal dirigida hacia el órgano blanco y C) Un tejido blanco sobre el cual el factor circulante activa cascadas de señalización celular descritas como cardioprotectoras en Pre y PostCI [24, 25]. En la actualidad existe evidencia de que el factor que media el RIPC puede ser el factor derivado del estroma-1 α (SDF-1 α) [26], nitritos [27], miRNA-144 [28] y exosomas [29]. Ensayos clínicos han probado el efecto beneficioso del RIPC en la protección frente al infarto del miocardio, sin embargo, dichos estudios se consideran una prueba de concepto, a la espera de los resultados de otros ensayos clínicos a gran escala que actualmente se llevan a cabo [23].

1.4. Interacción endotelio-cardiomiocito y su papel en la protección frente a IR cardíaca

Los cardiomiocitos corresponden aproximadamente al 75% del volumen total del corazón, pero en cantidad de células equivalen a menos del 40% [30], por cuanto el corazón también está compuesto de fibroblastos, células endoteliales y células musculares lisas [31]. En dicho contexto, las células endoteliales superan en número a los cardiomiocitos. Además, la distancia entre un cardiomiocito y la célula endotelial más cercana es de 1 μm , lo cual establece un radio de difusión de alrededor de 3-12 μm de cada célula endotelial hacia los cardiomiocitos [30, 31]. Esto permite que una molécula de señalización celular, como el NO, se genere en el endotelio y pueda difundir a los cardiomiocitos, ya que a pesar de tener una vida media de 20 s, puede difundir en un rango entre 150-300 μm en un lapso de 4-20 s [30]. La interacción entre el endotelio y el cardiomiocito tiene un papel importante en la protección frente a IR. En dicho sentido, la presencia de células endoteliales es un factor clave en la protección de cardiomiocitos sometidos a IR *in vitro* [32].

1.5. Cardioprotección por la vía eNOS/NO/PKG

El NO se sintetiza en el corazón a partir de una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de las NOS: neuronal (nNOS,) endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) [33, 34]. Las tres isoformas comparten 50 a 60% de homología a nivel de aminoácidos. Tienen un extremo N-terminal con dominios de unión a hemo, L-arginina y tetrahidrobiopterina (BH₄), una región central de unión a calmodulina (CaM) y un C-terminal con dominios de unión a NADPH, FAD y FMN [34]. eNOS es una proteína de 135-kDa que se encuentra unida a la membrana plasmática por medio de miristoilación y palmitoilación en la región N-terminal de la proteína y puede ser regulada dinámicamente a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. La forma

activa de la eNOS consiste en dos subunidades idénticas que forman un homodímero [34, 35].

La síntesis de NO se genera a través de la conversión de L-arginina + O₂ a NO + L-citrulina. Esta reacción depende de cofactores como BH₄ y NADPH. En ausencia de BH₄, la NOS se desacopla y genera anión superóxido en lugar de NO [36]. Más allá del rol fisiológico del NO como agente vasodilatador, éste posee propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas, antiapoptóticas, antiproliferativas y antiplaquetarias [35]. Actualmente, se postula que el NO ejerce un papel importante en protección frente a procesos de IR cardíaca, por cuanto éste atenuaría el daño en el miocardio [37].

En el contexto de lo indicado, los dadores de NO en conejos sometidos a isquemia y reperfusión cardíaca generan preconditionamiento tardío [38]. Asimismo, la administración durante 7 días de nitritos en la dieta de ratones mostró restaurar los niveles fisiológicos de NO e inducir cardioprotección frente al daño por IR [39]. Estos antecedentes concuerdan con la hipótesis que afirma que el NO actúa en la segunda ventana de pre-condicionamiento (24 a 72 h) [40]. Cabe mencionar que también se ha descrito atenuación del daño miocárdico de ratas en fase temprana, en un modelo de IR *ex-vivo* por medio de la preservación de la eNOS y de la producción de NO inducida farmacológicamente por liriodenina [41]. En dicho sentido, eNOS es una enzima que ejerce un papel protector en el pre-condicionamiento temprano [42, 43], mientras que iNOS se ha evidenciado como un factor pre-condicionante tardío [44, 45].

El NO también puede activar a la sGC y generar GMP cíclico (cGMP) y éste, a su vez, activa a la proteína kinasa dependiente de cGMP (PKG). La sGC es una proteína heterodimérica con una subunidad α y una subunidad β . La isoforma más prevalente es el

heterodímero $\alpha 1\beta 1$. El NO se une al dominio hemo protoporfirina-IX ubicado en la región N-terminal de la subunidad $\beta 1$. La unión del NO genera la activación de los dominios catalíticos de las subunidades α y β , que producen grandes cantidades de cGMP a partir de GTP. Es importante indicar que el cGMP es degradado por la fosfodiesterasa-5, lo que lleva a la inactivación de la PKG [46, 47].

PKG es un homodímero de dos subunidades idénticas. Existen dos tipos de PKG: PKG I y PKGII con masas de 75 y 85 kDa, respectivamente. La primera es el isotipo prominente en el sistema cardiovascular y existen dos isoformas, α y β . Cada subunidad de la PKG contiene: (1) un dominio N-terminal que media la homodimerización, supresión de la actividad kinasa en ausencia de cGMP y un dominio de interacción con otras proteínas, (2) un dominio regulatorio que contiene dos sitios no idénticos de unión a cGMP y (3) un dominio catalítico con actividad serina/treonina kinasa. La unión de cGMP al dominio regulatorio induce un cambio de conformación que libera la inhibición del sitio catalítico por el N-terminal y permite la fosforilación de proteínas sustrato, tales como: VASP, fosfolambano (PLB), receptor para IP3 (RIP3), receptor de rianodina (RyR), troponina, receptor de tromboxano A2, canales de calcio tipo L y canales de potasio dependientes de calcio, fosfatasa de la cadena liviana de la miosina y los canales de potasio dependientes de ATP, éstos últimos se encuentran abajo de la PKC ϵ [48].

Los incrementos de la concentración intracelular de cGMP y la consecuente activación de PKG se han descrito como posibles blancos terapéuticos en IR, ya que la PKG regula la homeostasis del Ca^{2+} , promueve la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP y genera el reclutamiento de Bcl-2, que es una proteína con efectos antiapoptóticos [47]. Se ha mostrado ampliamente que el inhibidor de la fosfodiesterasa-5, sildenafil, atenúa el daño al miocardio en modelos de isquemia y reperfusión cardíaca *in vitro* y *ex*

vivo y que este efecto es mediado por la PKG y una cascada de señalización que involucra la activación de AKT, ERK1/2, GSK-3 β , Bcl-2 y la apertura de canales de potasio dependientes de ATP [49-51].

1.6. Pre-condicionamiento farmacológico: Dexmedetomidina

Dexmedetomidina (Dex) es un agonista α_2 -adrenérgico, de carácter lipofílico y con mayor afinidad por los receptores α_2 -adrenérgicos que la clonidina. Su mecanismo de acción consiste en inhibir a la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de cAMP. Este fármaco inhibe la transmisión central noradrenérgica, efecto que es propio de los agonistas α_2 , por lo que es ampliamente utilizado como coadyuvante en anestesia. Existen 3 isotipos de receptor α_2 -adrenérgico: a, b y c. En el sistema cardiovascular, Dex genera un efecto bifásico en la presión arterial, generándose primero una vasoconstricción dependiente de los receptores α_{2b} post-sinápticos y una posterior disminución en la presión arterial y frecuencia cardíaca, atribuible a la simpátolisis gatillada por la estimulación de los receptores α_{2a} [52-59].

Existe evidencia que Dex tiene un efecto pre-condicionante, por cuanto redujo el daño del miocardio y mejoró la función ventricular en un modelo *ex-vivo* de isquemia-reperfusión cardíaca global. Este efecto aparentemente pre-condicionante se le atribuyó a la respuesta bifásica del fármaco, cuya vasoconstricción pudo haber tenido un efecto similar al pre-condicionamiento isquémico [60]. Asimismo, se ha demostrado que Dex protege del daño del miocardio en un modelo de IR regional y se determinó que la administración del fármaco estimuló la fosforilación de proteínas de la vía RISK: PI3K, AKT, ERK 1/2 y eNOS, siendo el efecto protector anulado al co-administrar Dex con un inhibidor de PI3K o el antagonista del receptor α_2 -adrenérgico yohimbina. También se estableció que los subtipos de receptor α_2 adrenérgico a y c se expresan en el cardiomiocito, sugiriendo un

posible efecto directo sobre el miocardio, en lugar de ser atribuible al sistema nervioso [61].

En resumen, es importante señalar que se ha descrito que Dex estimula la producción de NO en células endoteliales [62-64]. Asimismo, Dex genera la fosforilación de eNOS en la serina 1177 y dicho evento se asocia con su activación [34]. Sin embargo, no existen reportes que relacionen esta vía transduccional con la protección generada por Dex en IR cardíaca y el papel del endotelio en dicho efecto.

2. Hipótesis: La reducción del daño miocárdico por isquemia-reperfusión generada por dexmedetomidina, requiere la participación del endotelio y es mediada por activación de la vía óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)/óxido nítrico (NO).

3. Objetivo general: Determinar el papel del endotelio y la vía eNOS/NO en la atenuación del daño por isquemia-reperfusión cardíaca generada por dexmedetomidina en la rata.

4. Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Evaluar si dexmedetomidina activa a eNOS y aumenta los niveles de NO en corazón aislado de rata.

Objetivo específico 2: Investigar si la vía eNOS/NO media el efecto pre-condicionante de dexmedetomidina en isquemia - perfusión cardíaca *en corazón aislado de rata*.

Objetivo específico 3: Determinar si el pre-condicionamiento generado por dexmedetomidina en el cardiomiocito requiere la presencia del endotelio.

5.- Materiales y métodos

5.1 Reactivos:

Anticuerpo contra GAPDH, L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME), 2phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO), (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-,12epoxy 1Hdiindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pyrrolo[3,4-i] [1,6] benzodiazocine-10-carboxylic acid, methyl ester (KT5823), cloruro de trifeniltetrazolio, laminin, M-199 e insulina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Dexmedetomidine.HCl fue obtenida de Hospira, Chile. Anticuerpo contra eNOS fue comprado de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticuerpo contra iNOS fue adquirido de BD transduction laboratories El kit colorimétrico para Oxido Nítrico fue comprado en Abcam (Cambridge, MA).

5.2 Animales

El presente estudio se ajusta a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (8va Edición, 2011) y fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Las ratas fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

5.3.- Modelo *ex vivo* de isquemia reperusión global:

De acuerdo al protocolo de perfusión retrograda con sistema Langendorff [65], ratas Sprague-Dawley (250-350 g) se anestesiaron con pentobarbital (80 mg/kg IP). 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 solución tampón Krebs Henseleit que contiene (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 se mantuvieron a 37° C. 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 para producir una presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PFD) de 5-10 mmHg. Con el fin de realizar la isquemia global del corazón, se detuvo la bomba de infusión peristáltica, lo que resultó en el cese absoluto del flujo coronario.

Los corazones se estabilizaron durante 20 min, se sometieron a una isquemia global de 30 min, y 120 min de reperfusión, en algunos se midió el tamaño del infarto y otros se congelaron a -80° C para posterior análisis.

5.4.- Protocolos experimentales:

Para evaluar si Dex activa eNOS y genera NO, y para probar si la vía eNOS/NO/PKG media el efecto pre-condicionante del fármaco, se asignaron ratas para los distintos grupos experimentales (Figura 1).

Modelo ex vivo

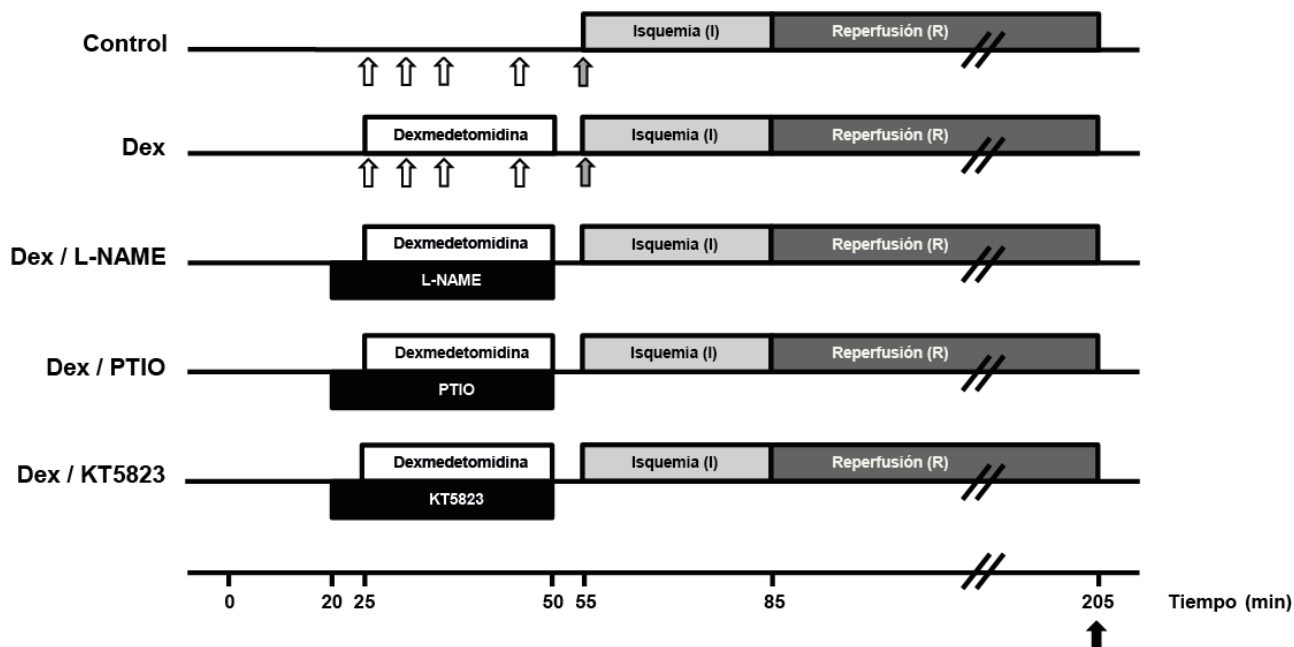


Fig. 1. Protocolo experimental para experimentos en sistema Langendorff. Corazones aislados de rata se asignaron aleatoriamente a los distintos grupos experimentales. Control: perfusión de buffer Krebs-Henseleit durante 30 min. Dex: tratamiento con Dex (10 nM) durante 25 min. Dex/L-NAME: tratamiento con L-NAME (100 nM) durante 30 min y co-administración de Dex (10 nM) durante 25 min. Dex/PTIO: tratamiento con PTIO (100 nM) durante 30 min y co-administración de Dex (10 nM) durante 25 min. Dex/KT5823: Tratamiento con KT5823 (1 μ M) durante 30 min y co-administración de Dex (10 nM) durante 25 min. Posterior a los tratamientos, todos los corazones fueron sometidos a 30 min de isquemia global y 120 min de reperusión. La flechas blancas indican determinación de nitritos, flechas grises muestran análisis de muestras por Western blot y flechas negras muestran determinación de tamaño de infarto y función del ventrículo izquierdo

5.5. Medición de tamaño de infarto:

Al final de la reperusión en el modelo *ex vivo*, los corazones se perfundieron con 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1% (Sigma Chemical) en tampón fosfato, ajustado a pH 7,4, a 37°C [66]. Posteriormente se conservaron a -20°C por 1 h. Luego, se cortaron los corazones en rebanadas y suspendidos en formalina al 10% durante toda la noche para su fijación. Al día siguiente, las rebanadas se ubicaron de forma ordenada respecto a la forma del corazón entre dos placas de vidrio, con un espaciador de 1,5 mm, y se escanearon para

finalmente ser medidos mediante planimetría utilizando el software Image J. El tamaño del infarto se expresó como volumen infartado (área no teñida) respecto del volumen total del corazón (sumatoria de los volúmenes de cada rebanada).

5.6. Medición de la función del ventrículo izquierdo:

La función del ventrículo izquierdo se determinó en el modelo *ex vivo*. La presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la presión de fin de diástole (PFDVI), el máximo de positivos y negativos de la derivada de la presión del VI (+dP/dt max, -dP/dt min), la frecuencia cardíaca (FC) y la presión de perfusión (PP), se midieron y registraron continuamente durante todo el período experimental. Los datos recogidos se guardaron y analizaron en un ordenador personal utilizando el software PowerLab (ML866 ADInstruments, Australia) [61].

5.7. Obtención de homogenizados de tejidos:

Los ventrículos de ratas adultas congelados en nitrógeno líquido se homogeneizaron en tampón frío con inhibidores de fosfatasa y proteasas (en mM): MOPS-Tris pH 7 (20), Sacarosa (300), EDTA (2), EGTA (2) Na₃VO₄ (10), NaF (80), Na₄P₂O₇ (20), Nonidet P-40 del 1% (v/v), SDS 0,1% (v/v) y los inhibidores de proteasas leupeptina y pepstatina (1:1000), pH final 7,4. Luego las muestras se homogenizaron en Douncer vidrio-teflón y posteriormente, se centrifugaron a 1000 x g durante 20 min a 4° C. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas por el método de Hartree [67]. Las fracciones solubles se guardaron congeladas a -80° C, para posterior análisis por Western blot.

5.8. Western blot y determinación de dímeros de eNOS e iNOS:

La dimerización de eNOS se evaluó utilizando electroforesis de baja temperatura (LT-SDS-PAGE) según la técnica descrita [68]. Los niveles de la forma dimerizada de eNOS e

iNOS en los ventrículos de ratas adultas se determinaron por Western blot, al final del periodo de acondicionamiento farmacológico y previo a los periodos de isquemia y reperfusión. Para la electroforesis y el análisis de Western blot, los lisados de los tejidos se ajustaron por proteínas (20 µg), separadas por LT-SDS-PAGE (8%). Los geles se mantuvieron previamente a 4°C y la cámara de electroforesis se mantuvo en una fuente con hielo, de manera tal que se mantuviese la temperatura del gel (<10°C) hasta ser transferidos a membranas de PVDF. Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA al 5% p/v en TBS-Tween 0,2% por 1 h. Las membranas se incubaron con anticuerpos contra la forma total (1:1000) de eNOS e iNOS, así como también un anticuerpo contra GAPDH como control de carga (1:20000). Después de un período de incubación adicional con los correspondientes anticuerpos secundarios anti IgG de conejo o ratón, conjugado a peroxidasa de rabanito (1:5000), 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.

5.9. Determinación de nitritos por reacción de Griess:

Se cuantifico la concentración de nitritos (marcador de NO [69]) en el efluente coronario a distintos tiempos (0, 5, 10 y 20 min post administración de Dex y 5 min post lavado con buffer Krebs-Henseleit) por medio de la reacción de Griess, utilizando el kit ab65328 Nitric Oxide Assay Kit Colorimetric (Abcam).

5.10. Cultivo primario de cardiomiocitos de rata:

Ratas adultas Sprague-Dawley (250–350 g) se anestesiaron con pentobarbital (80 mg/kg IP), y los corazones se aislaron y perfundieron de forma retrograda a través de la aorta. Los cardiomiocitos se aislaron administrando una infusión de colagenasa tipo II, según la técnica descrita [70]. Luego, las células se sembraron en placas con laminina e incubadas

durante 16 – 24 h a 37°C en condiciones de 95% oxígeno y 5% CO₂. Las células se mantuvieron en medio M-199 (M7653, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal de ternero y 1% penicilina – estreptomycin (Sigma).

5.11. Co-cultivo de cardiomiocitos de rata adulta con células HUVEC:

Células HUVEC se sembraron en insertos con poros de 4 µm (Millipore) para placas de 6 pocillos en medio EBM-2 suplementado con EGM™ -2 SingleQuots™ y se mantuvieron en incubador durante 24 h. Posteriormente, los insertos se incubaron con o sin Dex 10 nM durante 5 min. Posteriormente, se trasladaron a placas con cardiomiocitos y co-cultivados durante 15 min. Finalmente, los cardiomiocitos se sometieron a I/R *in vitro* por 3 h de isquemia y 1 h de reperfusión.

5.12. Células HUVEC primarias y formación de L-citrulina:

Cordones umbilicales humanos fueron obtenidos inmediatamente posterior a la entrega de embarazos normales de último término del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica en Santiago, Chile. El aislamiento de células HUVEC fue realizado según la técnica ya descrita [71]. Las células fueron cultivadas hasta el pasaje 2 en M-199, suplementado con D-glucosa 5 mM, suero newborn calf 10%, suero fetal calf 10%, L-glutamina 3,2 mM y penicilina-estreptomycin 100 U/ml. Las células fueron cultivadas con el mismo medio conteniendo suero newborn calf 1% durante 12 h previo a los experimento para determinar formación de L-citrulina.

El contenido intracelular de L-citrulina fue determinado en cardiomiocitos de rata adulta y HUVECs primarias utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) [72]. Ambos tipos celulares fueron pre-tratados durante 30 min con o sin L-NAME (100 µM) y yohimbina (10 µM), que es un antagonista α₂- adrenérgico. Luego, las células fueron estimuladas con Dex (10 nM) durante 20 min en buffer HEPES, conteniendo (in mM):

HEPES (50), NaCl (100), KCl (5), CaCl₂ (2,5), MgCl₂ (1) suplementado con L-arginina (100 μM). Posteriormente, cardiomiocitos de rata adulta y HUVECs fueron homogenizadas y el contenido de proteínas fue determinado utilizando un método de Lowry modificado. El contenido de L-citrulina fue evaluado según el protocolo ya descrito [71], utilizando una columna analítica (C18: 4,6 mm × 250 mm) (HiQsil; KYA Tech, Japón) acoplada a un sistema HPLC (PU2089s; Jasco, Tokyo, Japón) y la fluorescencia fue medida a longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 455 nm, respectivamente.

5.13. Apertura de PTPM:

Los experimentos de apertura del PTPM se realizaron según el protocolo descrito en [73]. Cardiomiocitos aislados de rata adulta se incubaron por 20 min con 3 μM tetrametilrodamina (TMRM), catión lipofílico que se localiza en la mitocondria. TMRM se preparó en metanol, previo a su dilución en buffer Tyrode, conteniendo (en mM): NaCl (137), KCl (5,4), MgCl₂ (0,4), CaCl₂ (1), glucose (10), Hepes (10) pH 7,4. Luego, las células se incubaron en presencia o ausencia de Dex (10 nM) durante 5 min. La iluminación con láser del fluoróforo fue realizada a través de microscopía confocal con un láser de 543 nm, lo cual induce estrés oxidativo en la mitocondria y apertura del PTPM, la cual se asocia a una liberación de la tinción roja TMRM desde la mitocondria hacia el citosol, resultando en un aumento de la fluorescencia celular.

5.14. IR simulada *in vitro*:

Cardiomiocitos de rata adulta se incubaron con una solución que simula las alteraciones que se generan durante isquemia, conteniendo (en mM): NaCl (128), NaHCO₃ (2,2), KCl (14,8), MgSO₄ (1,2), K₂HPO₄ (1,2), CaCl₂ (1), ácido láctico (10) (pH 6,4). Posteriormente, las placas con cardiomiocitos se introdujeron en una cámara de hipoxia que contenía 95% N₂ y 5% CO₂ durante 3 h. Luego, las células se mantuvieron en un incubador durante 1 h

con medio normóxico, conteniendo (en mM): NaCl (118), NaHCO₃ (22), KCl (2,6), MgSO₄ (1,2), K₂HPO₄ (1,2), CaCl₂ (1), glucosa (10) (pH 7,4) [29].

5.15. Muerte celular:

La muerte de cardiomiocitos se evaluó determinando la incorporación de yoduro de propidio con microscopía fluorescente, según protocolo descrito por Vicencio *et al*, 2015 [29].

5.16 PCR a tiempo real (qPCR):

Cardiomiocitos de rata adulta fueron estimulados con Dex 10 nM durante 0.5, 1, 2 y 3 h. PCR a tiempo real fue realizado utilizando SYBR Green (Applied Biosystems), según el protocolo ya descrito [74]. Los datos obtenidos para cada transcrito fueron normalizados a rRNA 18S como control interno, usando el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Los partidores utilizados fueron los siguientes:

- eNOS (rata) sentido GATGTGGCTGTCTGCATGGATCT
- eNOS (rata) antisentido GTCACCTTTGGCCAGCTGGTAACT

- iNOS (rata) sentido TTGGTACATGGGCACCGAGATTG
- iNOS (rata) antisentido CAGCTGCATTGATCTCGGTGACA

5.17. Análisis estadístico:

Los resultados se muestran como imágenes representativas o como el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando t test o ANOVA de una o dos vías con post-test de Tukey o Bonferroni, respectivamente. Las diferencias se consideraron significativas con P<0.05.

6. Resultados

6.1 Dexmedetomidina activa la vía eNOS/NO en corazón aislado de rata adulta

Para estudiar si Dex activa eNOS y estimula la producción de NO, corazones aislados de rata adulta se trataron con una infusión de Dex 10 nM durante 25 min y posteriormente se generó un lavado de 5 min con buffer Krebs-Henseleit. Los resultados muestran que Dex aumentó la producción de nitritos a los 5, 10 y 20 min de administración del fármaco en comparación a corazones no tratados (Fig 2A), y éste aumento se mantuvo al menos hasta los 5 min de terminada la infusión de Dex (Fig 2B). Para confirmar los resultados, se evaluó la dimerización de eNOS e iNOS (estado activo de la enzima [34, 75]) por Western blot utilizando electroforesis de baja temperatura (LT-SDS-PAGE) y se observó que Dex indujo mayor formación del estado dimérico de eNOS en comparación al grupo Control (Fig. 2C). La formación de dímeros de iNOS se mantuvo inalterada en ambos grupos (Fig. 2D). Por lo tanto, los resultados sugieren que Dex activa la vía eNOS/NO en corazón aislado de rata adulta.

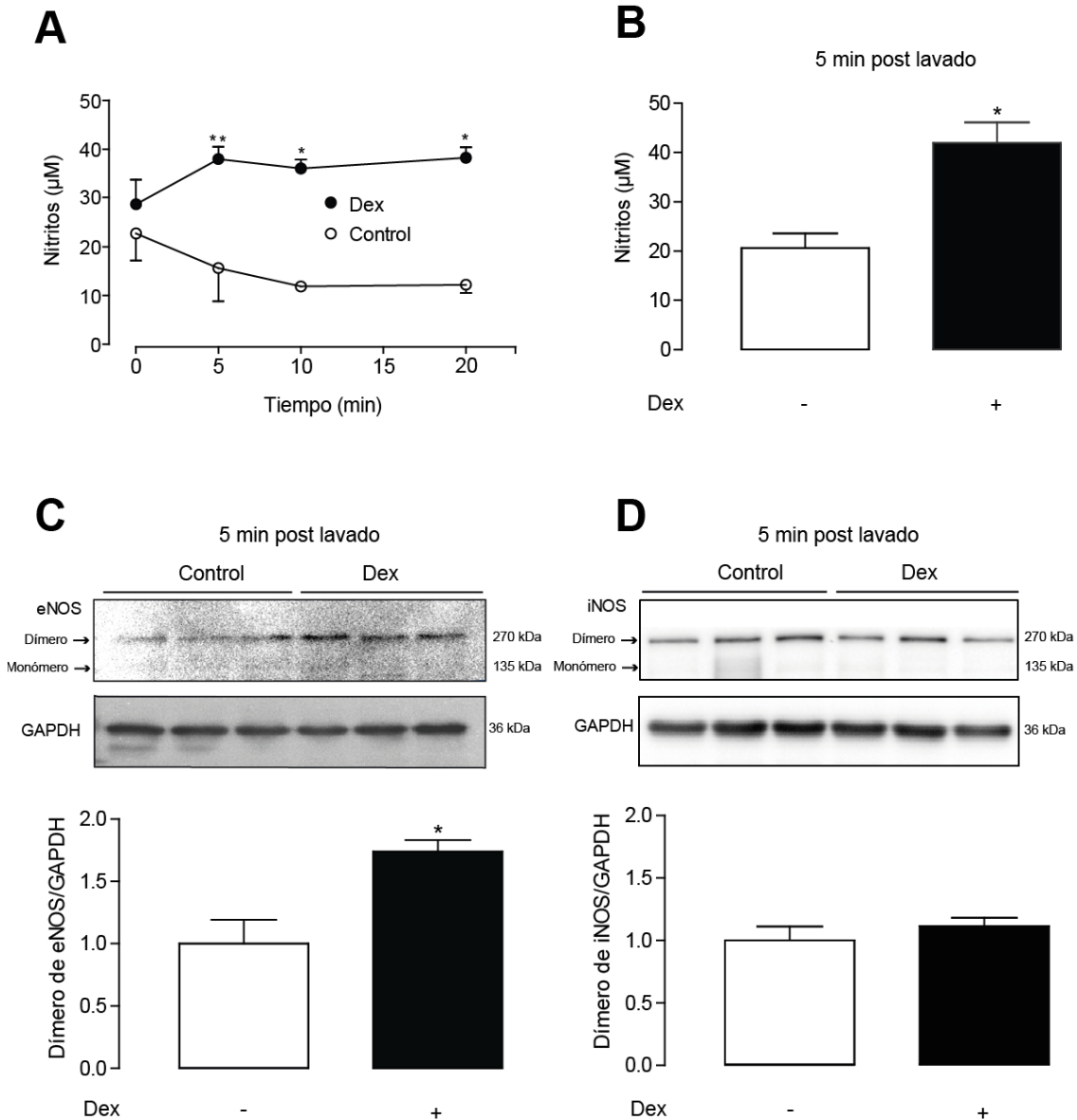


Fig. 2. Dex aumenta la dimerización de eNOS y producción de nitritos en corazones aislados. A: Concentración de nitritos a distintos tiempos en corazones controles (círculos blancos), y tratados con Dex (círculos negros); cada punto corresponde al promedio \pm EMS de 3 a 6 determinaciones. (B) Concentración de nitritos 5 min después de haber terminado la perfusión con Dex, las barras representan el valor promedio \pm SEM de 4 y 6 determinaciones. (C) Panel superior: Western blot representativo de dímeros de eNOS en homogenizados de corazón. En el panel inferior se muestra la cuantificación de los dímeros de eNOS normalizados por GAPDH, las barras representan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones. (D) La misma descripción de C, aplicada a iNOS. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs Control. Los datos se analizaron por t test pareada con dos colas (A y B) y no pareada de una cola, seguido por post-test de Mann-Whitney (C).

6.2 Dexmedetomidina reduce el tamaño de infarto a través de un mecanismo dependiente de la vía eNOS/NO/PKG

Con el fin de evaluar el papel de la vía eNOS/NO en el efecto pre-condicionante de Dex, corazones aislados de rata adulta se trataron con Dex 10 nM durante 25 min en presencia o ausencia de L-NAME 100 nM (inhibidor de NOS) y PTIO 100 nM (atrapador de NO). Posteriormente, los corazones se expusieron a 30 min de isquemia global y 120 min de reperfusión y se midió el tamaño de infarto. Dex redujo el tamaño de infarto ($16 \pm 10\%$) respecto a los corazones no tratados ($42 \pm 12\%$, $P < 0.05$, $n=5$) y este efecto se revertió por la co-administración de L-NAME y PTIO ($42 \pm 7\%$ y $48 \pm 13\%$, respectivamente, $n=4$, n.s. con respecto a corazones no tratados) (Fig 3). Para explorar el mecanismo ríu debajo de la vía eNOS/NO implicado en la cardioprotección con Dex, ésta se co-administró con KT5823 1 μM (inhibidor de PKG) y se observó que la reducción del tamaño de infarto también se revirtió al inhibir PKG (44 ± 16 , $N=4$, n.s. con respecto a corazones no tratados) (Fig. 3).

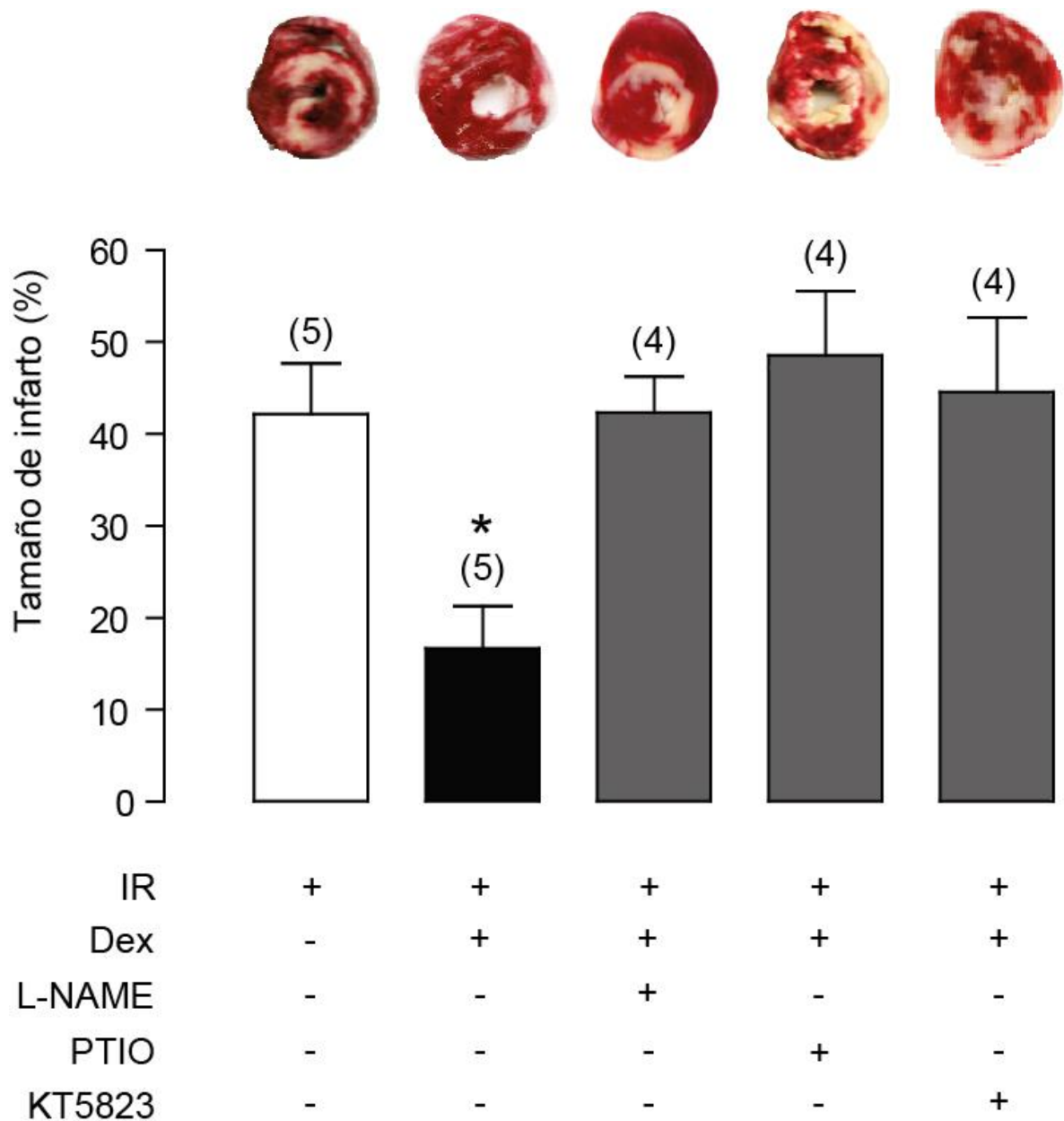


Fig. 3. Dex reduce el tamaño de infarto a través de la vía eNOS/NO/PKG en corazones aislados de rata adulta sometidos a IR. Imágenes representativas de rebanadas de corazón (panel superior). Porcentaje promedio de tamaño de infarto en grupos IR, Dex, Dex/L-NAME, Dex/PTIO y Dex/KT5823 posterior a 30 min de isquemia global y 120 min de reperusión. Los corazones se tiñeron con TTC 1% al final de la reperusión. El número de experimentos se muestra en cada barra (panel inferior). *P<0,05 vs. IR, Dex/L-NAME, Dex/PTIO y Dex/KT5823. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de post-test de Tukey. Las barras de los gráficos representan el promedio \pm SEM.

6.3 Dexmedetomidina mejora la recuperación de la función ventricular en IR cardíaca a través de un mecanismo dependiente de la vía eNOS/NO/PKG

Para confirmar estos resultados, se determinó la recuperación de la función del ventrículo izquierdo. Los resultados muestran que Dex mejora la recuperación de PDVI, PFDVI, +dP/dtmax, y -dP/dtmin al final de la reperfusión en comparación a corazones no tratados (Fig 4 A-D). Sin embargo, la co-administración de Dex con los inhibidores de la vía eNOS/NO/PKG revierten la recuperación de PDVI, PFDI y +dP/dtmax. En conjunto, estos resultados sugieren que Dex protege frente IR cardíaca por un mecanismo dependiente de la vía eNOS/NO/PKG.

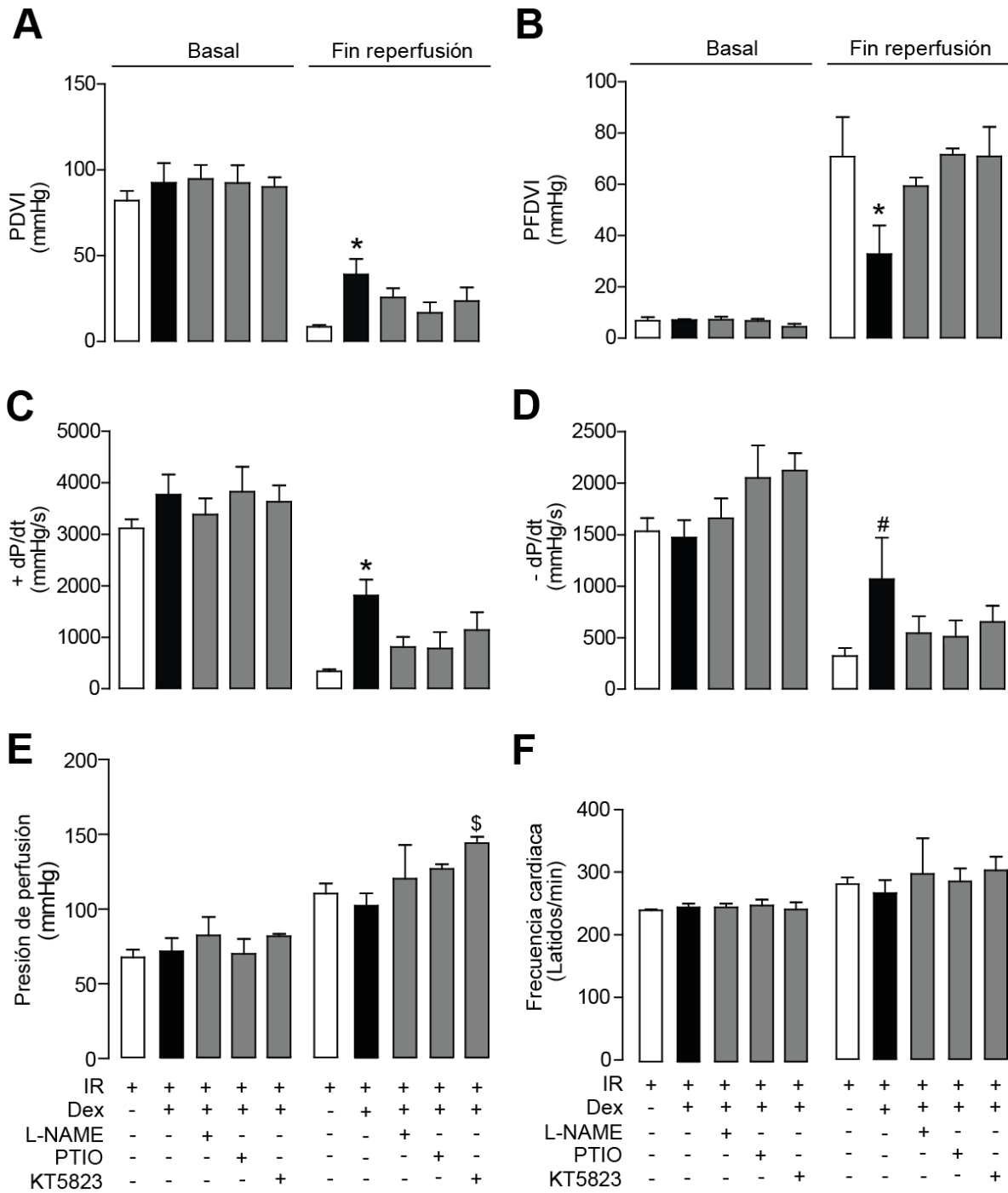


Fig 4. Dex mejora los parámetros hemodinámicos a través de la vía eNOS/NO/PKG en corazones aislados de rata adulta sometidos a IR global. Valores promedio de parámetros que miden recuperación funcional del ventrículo izquierdo (A) PDVI, (B) PFDVI, (C) +dP/dt max, (D) -dP/dt min, (E) PP y (F) FC de los grupos I/R, Dex, Dex/L-NAME, Dex/PTIO y Dex/KT5823 en condiciones basales al final de la reperusión (n = 3-5 experimentos independientes). *P<0,05 vs IR, Dex/L-NAME, Dex/PTIO y Dex/KT5823. #P<0,05 vs IR. \$P<0,05. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de dos vías, seguido de post-test Bonferroni. Las barras de los gráficos representan el promedio \pm SEM.

6.4 Dexmedetomidina no protege de la muerte celular en cardiomiocitos sometidos a sIR

Para evaluar si Dex ejerce su efecto protector de forma directa en el cardiomiocito, se evaluó la capacidad del fármaco de retrasar la apertura del PTPM, que es un factor clave en el inicio de la muerte celular en reperfusión [14, 15, 76]. Para evaluar esto, cardiomiocitos de rata adulta se incubaron con TMRM 3 μ M durante 20 min. Posteriormente, se estimularon con Dex 10 nM durante 5 min y se determinó el tiempo de apertura del PTPM utilizando microscopía confocal. Los resultados muestran que Dex no retrasó la apertura del PTPM (Fig 5A). Asimismo, la muerte celular de cardiomiocitos sometidos 1 h de isquemia y 3 h de reperfusión *in vitro* (simulada) se elevó al $63 \pm 8\%$ en comparación a la condición de normoxia ($18,7 \pm 0,3\%$) y Dex 10 nM no redujo estos valores ($65 \pm 8\%$, n.s. vs sIR, n= 3) (Fig. 5B). Por lo tanto, los resultados sugieren que Dex ejerce su efecto cardioprotector por una vía indirecta sobre el cardiomiocito.

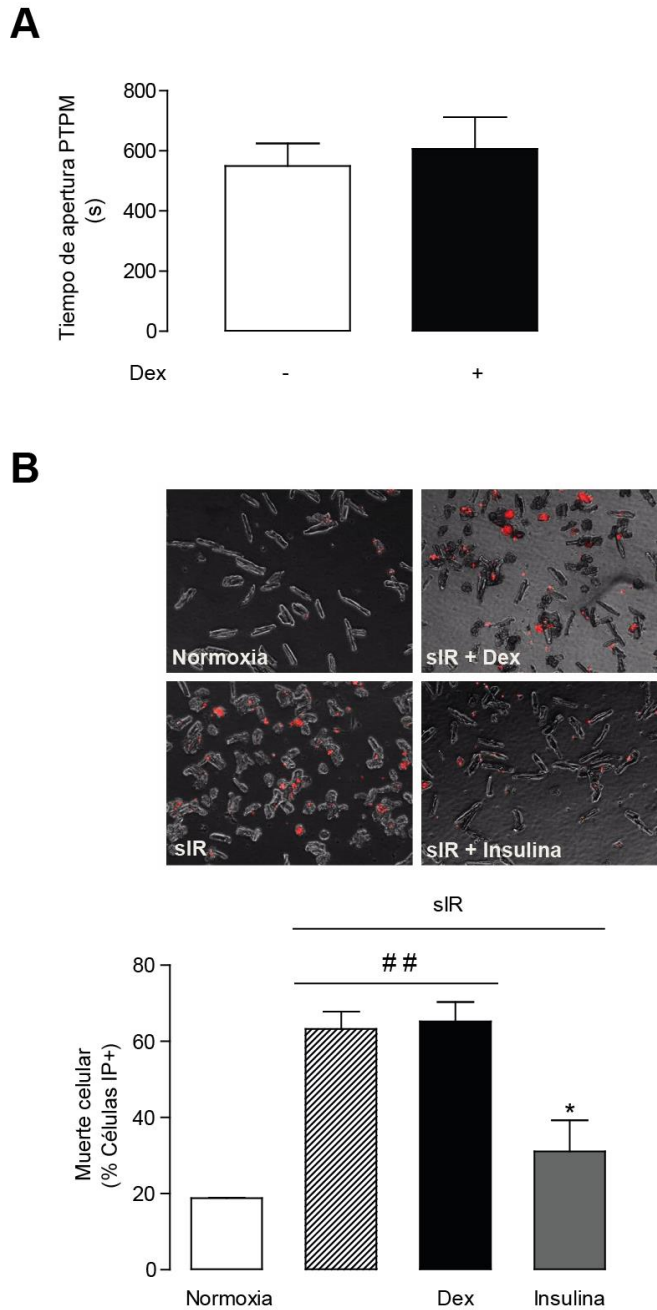


Fig. 5. Dex no retrasa la apertura del PTPM ni reduce la muerte celular en cardiomiocitos. (A) cardiomiocitos de rata adulta (CAR) se incubaron con TMRM (3 μ M) durante 20 min y fueron tratados con o sin Dex (10 nM) durante 5 min y la apertura del PTPM se evaluó utilizando microscopía confocal (n = 3 experimentos independientes). (B) Imágenes representativas de CRA tratados con o sin Dex (10 nM) durante 15 min y sometidas a 3 h de isquemia simulada y 1 h de reperusión. Insulina (10 nM) se utilizó como control positivo (izquierda). La muerte celular se evaluó cuantificando el porcentaje de células positivas a yoduro de propidio (IP+) (derecha) (n = 3 experimentos independientes). $^{##}P < 0,001$ vs normoxia. $^{*}P < 0,05$ vs siR and siR + Dex. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía, seguido de post-test de Tukey. Las barras de los gráficos representan el promedio \pm SEM.

6.5 Dexmedetomidina requiere la presencia del endotelio para proteger al cardiomiocito frente a sIR

El papel de la interacción entre el endotelio y el cardiomiocito en el preconditionamiento con Dex se estudió co-cultivando cardiomiocitos de rata adulta con células HUVEC pre-tratadas con o sin Dex 10 nM durante 15 min. Luego, los cardiomiocitos se sometieron a sIR y se determinó la cantidad de células positivas a yoduro de propidio utilizando microscopía fluorescente. El co-cultivo de células endoteliales con cardiomiocitos no disminuyó la muerte celular ($64 \pm 10\%$ n.s. vs sIR $n=4$). Sin embargo, cuando las células endoteliales se pre-trataron con Dex 10 nM durante 5 min, previo a su co-cultivo con cardiomiocitos, la muerte celular se redujo significativamente respecto a sIR ($39 \pm 6\%$ $P<0,05$, $n=4$) (Fig 6). Con el fin de complementar los resultados obtenidos y explorar los posibles mecanismos asociados a la protección celular con Dex dependiente del endotelio, se estimularon cardiomiocitos con Dex 10 nM durante 0.5, 1, 2 y 3 h y se evaluaron los niveles de mRNA de eNOS e iNOS. Los resultados muestran que Dex no aumentó la transcripción de ninguna de las dos isoformas de la NOS evaluadas en el cardiomiocito (Fig 7A,B). Luego, se evaluó la activación de NOS en respuesta a Dex en cardiomiocitos y células endoteliales. Para estudiar esto, HUVECs primarias y cardiomiocitos de rata adulta fueron estimuladas con Dex 10 nM co-administrada con o sin L-NAME (100 μ M) o yohimbina (10 μ M) durante 20 min y la formación de L-citrulina fue medida utilizando HPLC. Los resultados sugieren que Dex activa a NOS a través de un mecanismo dependiente del receptor α 2-adrenérgico en el endotelio, mas no en el cardiomiocito (Fig 7C,D).

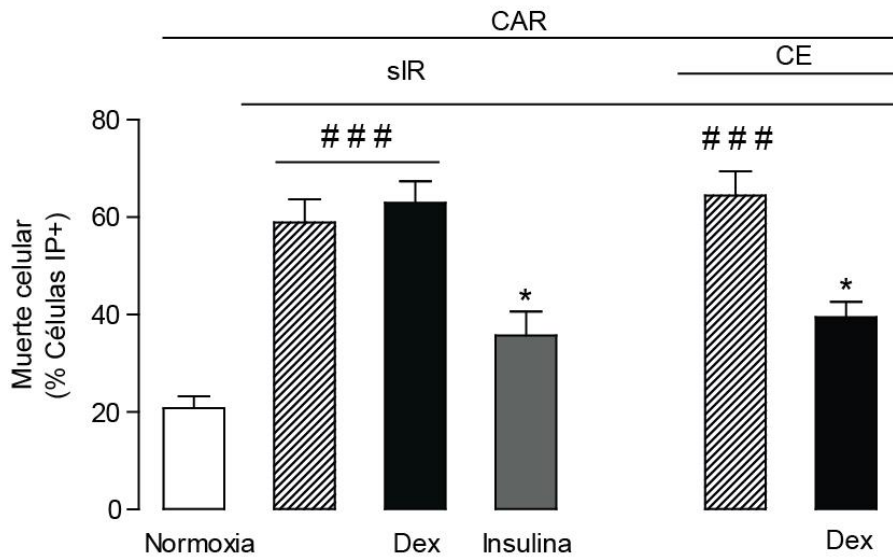
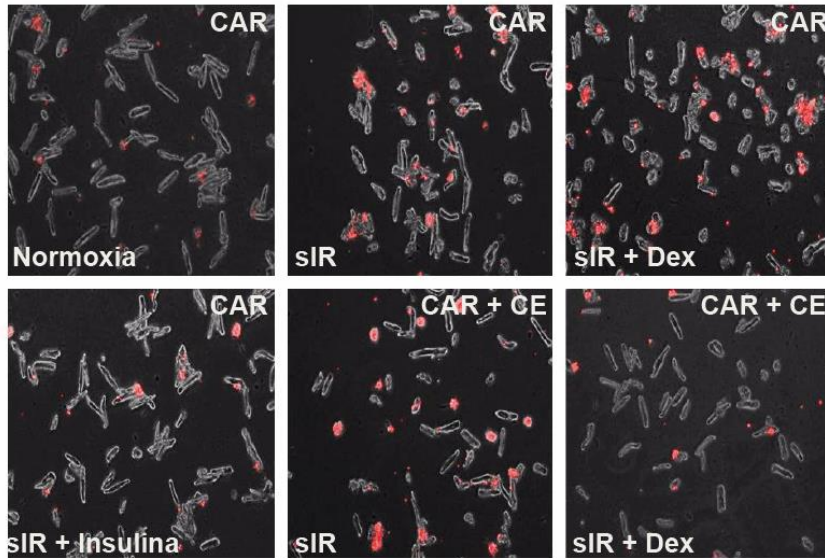


Fig. 6. Dex requiere del endotelio para reducir la muerte celular en cardiomiocitos posterior a sIR Imágenes representativas de CAR co-cultivadas durante 15 min con HUVECs (CE) pre-tratadas con o sin Dex 10 nM durante 5 min. Transwells co-cultivados fueron removidos y los cardiomiocitos se expusieron a sIR (panel superior). Cuantificación del porcentaje de células IP+ (panel inferior) (n = 4 experimentos independientes). ###P<0,0001 vs. normoxia. *P<0,05 vs. sIR, sIR + co-cultivadas 15 min y sIR + Dex. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de post-test de Tukey. Las barras de los gráficos representan el promedio \pm SEM.

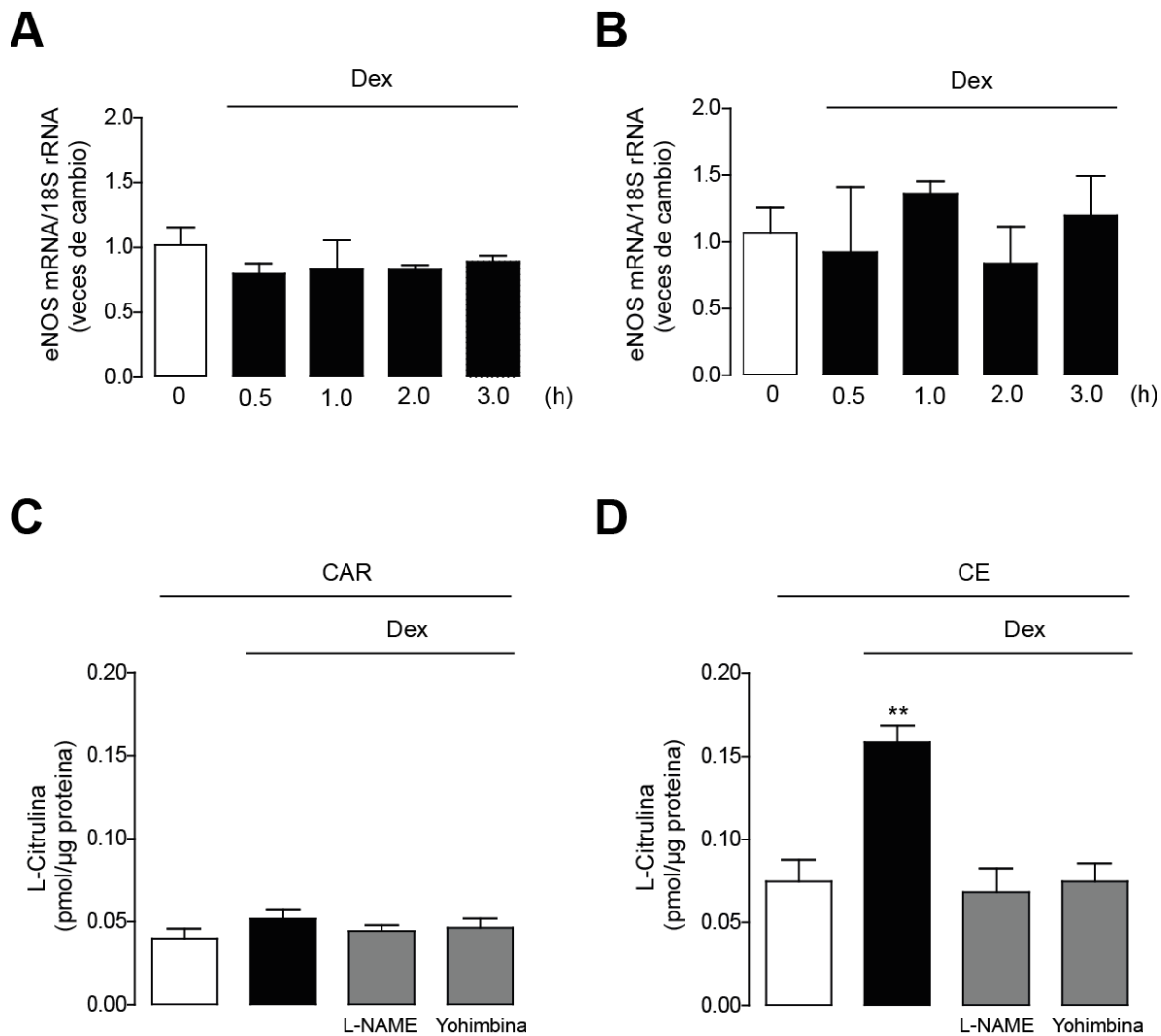


Fig. 7. Dex activa a NOS en el endotelio y no en el cardiomiocito a través de un mecanismo dependiente de la activación del receptor α 2-adrenérgico (A) Niveles de mRNA de eNOS e iNOS (B) en cardiomiocitos (CAR) estimulados con Dex 10 nM durante 0.5, 1, 2, y 3 h ($n = 3$ experimentos independientes). (C) Cardiomiocitos y HUVECs primarias (CE) (D) fueron pre-tratadas durante 30 min con L-NAME 100 μ M o yohimbina 10 μ M. Luego, CAR y CE fueron estimuladas con Dex 10 nM durante 20 min y el contenido de L-citrulina se midió por HPLC. ($n = 3$ experimentos independientes). ** $P < 0.002$ vs. Control, Dex + L-NAME y Dex + yohimbina. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de post-test de Tukey. Las barras de los gráficos representan el promedio \pm SEM.

7. Discusión

Los hallazgos más importantes del presente trabajo muestran que Dex promovió la activación de eNOS y producción de óxido nítrico en corazón de rata adulta. Asimismo, el mecanismo implicado en la reducción del tamaño de infarto y mejora en la recuperación del ventrículo izquierdo posterior a IR generado por Dex, depende de la vía eNOS/NO/PKG. Además, los resultados muestran que Dex protege al cardiomiocito de forma indirecta a través de un mecanismo que requiere la interacción entre el endotelio y el cardiomiocito.

7.1 Activación de la vía eNOS/NO inducida por dexmedetomidina

Los resultados muestran que Dex gatilló la producción de NO en el corazón (Fig. 2A-B). Este hallazgo concuerda con lo descrito en estudios previos que muestran que Dex promueve la generación de NO en células endoteliales. [62, 64]. En dicho contexto, Ibacache *et al* describieron que Dex estimula la fosforilación de eNOS en Ser1177 en el miocardio [61], que es un sitio descrito como activador de la enzima [34]. Por otro lado, el presente estudio mostró la activación de eNOS determinando su estado dimérico (Fig. 2C), confirmando lo descrito por Ibacache *et al*. Además, Dex promovió la activación de eNOS, mas no de iNOS (Fig. 2D). Asimismo, Dex tampoco indujo un aumento de los niveles de mRNA de iNOS en el cardiomiocito (Fig 7B), lo cual concuerda con la hipótesis que sostiene que eNOS se relaciona a fenómenos de pre-condicionamiento temprano [42, 43], mientras que la isoforma inducible de la NOS se asocia a la respuesta tardía o genómica, conocida como la segunda ventana de protección [40, 44, 45, 77]. Además, cabe destacar que tanto la activación de eNOS, como la producción de NO en respuesta a Dex, se mantuvieron 5 min posterior a la administración de dicho fármaco, lo cual confirma su carácter pre-condicionante.

7.2. Pre-condicionamiento con dexmedetomidina mediante la vía eNOS/NO/PKG

El efecto protector de Dex ha sido demostrado frente a IR renal, pulmonar, cerebral, hepática, intestinal, cardíaca y músculo esquelético [78-85]. Actualmente, existen algunos estudios que han comenzado a dilucidar el mecanismo por el cual Dex ejerce su protección. Al respecto, se ha observado que Dex reduce el daño por IR renal modulando la vía JAK/STAT y en IR pulmonar, la vía TLR4/MyD88/MAPK [80, 86]. Asimismo, en IR cerebral, Dex redujo el daño mediante la activación de la vía RISK [78].

En cuanto al corazón, se ha mostrado la importancia de los canales de K⁺ mitocondriales dependientes de ATP [87] en la cardioprotección generada por Dex. Asimismo, también se ha descrito la participación de la vía RISK [61]. En el contexto de lo indicado, a pesar de que la activación de eNOS y generación de NO en respuesta a Dex ya se encuentra descrito [62, 64], no existen estudios publicados que vinculen esta vía al efecto pre-condicionante de Dex. Los resultados del presente trabajo muestran que el efecto protector de Dex se pierde al inhibir eNOS y NO, lo cual fue confirmado mediante la determinación de tamaño de infarto (Fig. 3) y recuperación de los parámetros funcionales del ventrículo izquierdo posterior a IR (Fig. 4A-D).

La descripción detallada del mecanismo de acción de Dex puede ser fundamental para asegurar su uso seguro. En dicho sentido, Dex es un agonista del receptor α_2 -adrenérgico y como tal, se usa como sedante en anestesia [88]. En cuanto a su efecto pre-condicionante cardíaco, su mecanismo aún no se encuentra completamente descrito. En dicho sentido, cabe indicar que existe un estudio que muestra que Dex aumenta el daño por reperfusión cuando es administrado posterior y no previo a la isquemia [89]. A raíz de este estudio, existe la hipótesis de que el efecto cardioprotector de Dex puede depender del momento en el que se administre [90]. La presente investigación sustenta

esta idea, ya que se ha descrito que el NO es protector frente a IR [91, 92]. Sin embargo, cuando se incrementa la biodisponibilidad del NO durante condiciones pro-oxidantes, tales como la reperfusión, éste puede reaccionar con anión superóxido y generar peroxinitrito, que puede tener efectos tóxicos en el tejido cardíaco [93-95]. Esto puede sugerir que Dex debería ser administrada antes de la isquemia como un agente pre-condicionante, en lugar de utilizarse cuando el daño por reperfusión ya se ha desencadenado.

Además, este estudio profundizó el mecanismo río abajo de la vía eNOS/NO, evaluando la implicancia de PKG. Al respecto, cabe señalar que el NO puede proteger el miocardio de manera dependiente [96] o independiente de PKG [97]. Los resultados de este trabajo muestran que Dex requiere PKG para ejercer su efecto protector. En la vía dependiente de PKG, el NO activa a sGC, promoviendo la síntesis de cGMP para activar PKG. Al respecto, se ha observado que la cardioprotección mediada por la activación de sGC requiere la expresión de PKG en el cardiomiocito. [98]. Esto apoya la hipótesis de la presente investigación por cuanto Dex aumenta la producción de NO en el endotelio y este podría difundir hacia el cardiomiocito, activando PKG.

La vía NO/PKG genera vasodilatación [99], lo cual puede mejorar la perfusión del tejido isquémico. En el contexto de lo indicado, el trabajo de Okada *et al* mostró que el flujo coronario disminuyó durante la administración de Dex, a pesar de que dichos valores regresaron a ser similares al control poco después y se mantuvieron así durante la reperfusión [60]. Alternativamente, PKG puede proteger a través de mecanismos independientes de la vasodilatación. Por ejemplo, PKG puede reducir la muerte celular en IR activando cascadas de señalización celular que pueden retrasar la apertura del PTPM [49, 51, 100].

7.3 Dexmedetomidina protege al cardiomiocito de IR de forma indirecta a través del endotelio

El estudio con Dex de Ibacache *et al* mostró que los receptores α 2-adrenérgicos se expresan en el endotelio y los subtipos α 2A y α 2C, se expresan en el cardiomiocito [61]. Este hallazgo hizo que la hipótesis inicial del presente estudio sostuviera que Dex ejercía un efecto protector directo en el cardiomiocito. Al respecto, los resultados indican que Dex no retrasó la apertura del PTPM ni redujo la muerte celular (Fig. 5A y B). Sin embargo, la presencia de células endoteliales sí permitió que Dex pre-condicionara los cardiomiocitos frente a IR, sugiriendo un efecto indirecto sobre éstos (Fig. 6). Este resultado fue complementado con el hallazgo que muestra que Dex activa a NOS en células endoteliales, mas no en cardiomiocitos (Fig 7C,D). En dicho sentido, el mecanismo de acción asociado a los receptores α 2-adrenérgicos se relaciona a proteína Gi y disminución de los niveles de cAMP [101], sin embargo, también se ha descrito que estos receptores pueden promover la activación de proteínas como AKT o ERK a través de la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) [102-104]. Además, también se ha reportado que Dex puede generar relajación o contracción arterial a través de la activación de los subtipos de receptor α 2A o α 2B, respectivamente [63]. Por lo tanto, esta evidencia sugiere la posibilidad de que los efectos de Dex pueden depender del tipo celular o el subtipo de receptor α 2-adrenérgico.

En complemento a lo indicado, cabe destacar que a pesar de que los cardiomiocitos corresponden a la mayor parte del volumen del corazón, son superados numéricamente por células endoteliales [30], lo cual permite el contexto ideal para la interacción entre ambos tipos celulares. En ese sentido, se ha probado la importancia del endotelio en la protección de cardiomiocitos frente a IR [32]. Además, también se ha mostrado que la presencia de células endoteliales es importante para generar protección farmacológica, siendo un factor clave en la protección con isoflurano de cardiomiocitos sometidos a IR

[105]. En ese contexto, considerando la evidencia de que la interacción entre estas células cardíacas es importante para la protección en IR, los hallazgos concuerdan con la idea de que las estrategias de pre-condicionamiento deben considerar todo el corazón y no solo el cardiomiocito [31]. La Fig. 8 resume los principales hallazgos de este trabajo y el modelo propuesto.

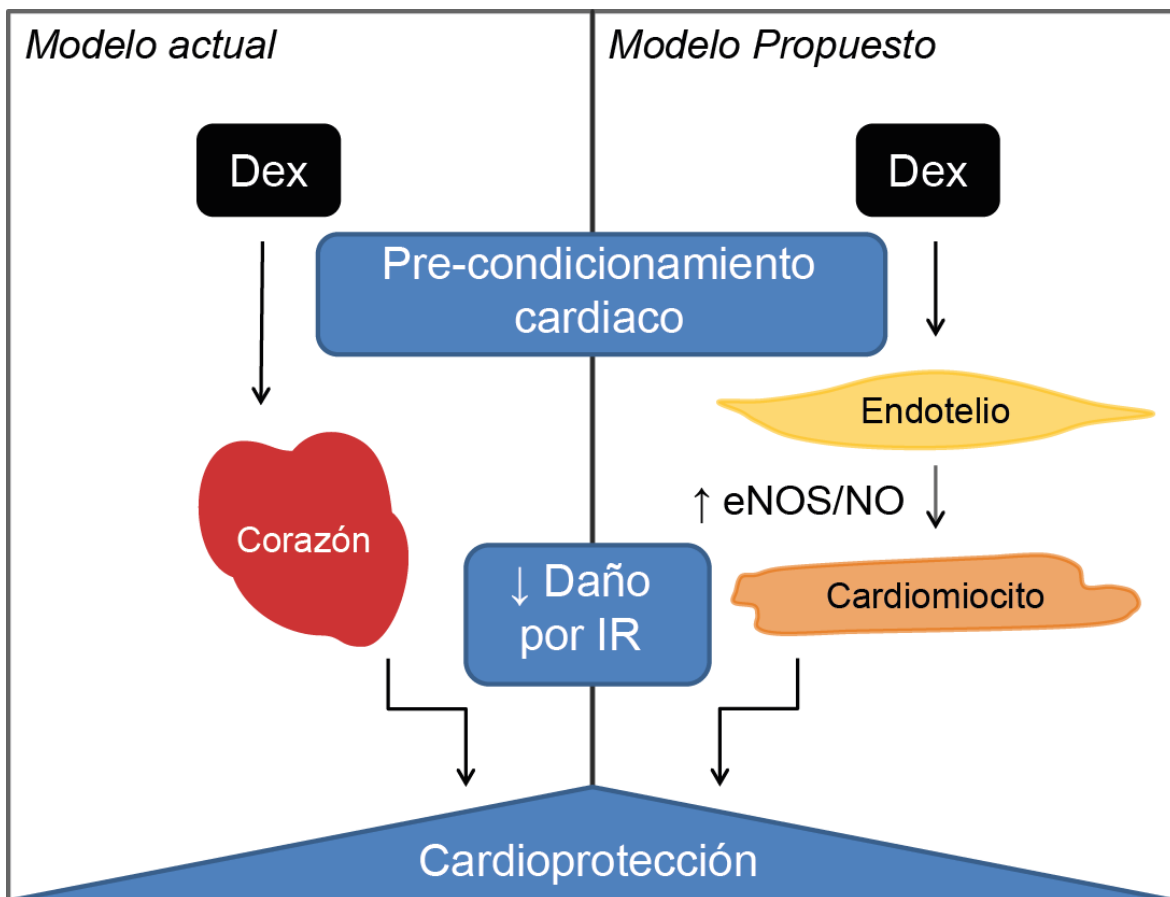


Fig. 8 Modelo Propuesto. El modelo que se propone a partir de los hallazgos de este trabajo, sugieren que Dex se une a su receptor en el endotelio, generando NO, el cual a su vez, difundiría hacia el cardiomiocito, para activar PKG y gatillar cardioprotección frente a IR cardíaca.

7.4. Limitaciones del estudio

Las limitaciones más importantes de este estudio fueron las siguientes: 1) Se mostró que Dex activa la vía eNOS/NO. Sin embargo, no se mostraron evidencias de la activación de

PKG. Al respecto, cabe señalar que se probó que al inhibir PKG, se pierde la cardioprotección con Dex, pero los resultados estarían reforzados si además se mostrara que el fármaco activó esta proteína y estudios futuros pueden clarificar este punto. 2) Los resultados de este estudio muestran que Dex pre-condiciona al miocardio por un mecanismo dependiente de eNOS/NO y se discute que considerando la naturaleza protectora del NO en condiciones basales, pero potencialmente perjudicial en condiciones de estrés oxidativo, Dex debería ser utilizada como una alternativa cardioprotectora sólo cuando es administrada previo y no posterior a IR. En dicho sentido, sería importante confirmar los hallazgos de Mimuro *et al* [89] y probar que Dex aumenta el tamaño de infarto cuando se administra al inicio de la reperfusión, complementando dichos experimentos con uno que muestre aumento de proteínas nitradas (marcador de peroxinitrito) en aquellos corazones estimulados con Dex o bloqueando la generación de anión superóxido y evaluando si esto inhibe el daño que pueda generar Dex en la reperfusión. Ciertamente que dichos experimentos apoyarían los resultados de la presente investigación y reforzarían la idea de cuando es seguro usar Dex y cuándo podría estar contraindicada. 3) Los resultados muestran que Dex reduce la muerte celular en cardiomiocitos de forma indirecta a través del endotelio, pero no explora la activación de PKG en el cardiomiocito posterior a su interacción con células endoteliales pre-tratadas con Dex. En el contexto de lo indicado, un experimento que muestre que al co-cultivar células endoteliales pre-tratadas con Dex, generan la activación de PKG en el cardiomiocito reforzaría sustancialmente la hipótesis de que Dex activa la vía eNOS/NO en el endotelio y el NO difundiría al cardiomiocito para activar sGC/PKG, generando cardioprotección. Además, también es importante continuar explorando el mecanismo que explique por qué Dex no activó a NOS en cardiomiocitos, pero sí en el endotelio. En dicho sentido, se requieren estudios detallados de inmunohistoquímica para establecer con

mayor precisión el patrón de distribución de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos en el endotelio.

Además, cabe señalar las limitaciones que puede presentar el modelo *ex vivo* de corazón aislado con sistema de Langendorff para establecer con claridad cuál es el endotelio involucrado en la cardioprotección con Dex, por cuanto éste protocolo involucra la inserción de un balón de látex en el ventrículo izquierdo, lo cual puede generar daño mecánico en el endotelio del endocardio. En ese sentido, considerando que a pesar de esta limitante, Dex ejerce su efecto pre-condicionante en este modelo, es posible que el endotelio coronario, que no se ve afectado por esta aproximación, sea el responsable de la protección generada por Dex, sin embargo, se requieren más estudios para establecer este punto con claridad.

8. Conclusiones

- Dex activa a eNOS, no iNOS y promueve la producción de NO en corazón aislado de rata adulta.
- El pre-condicionamiento farmacológico con Dex protege el corazón de IR global, reduciendo el tamaño de infarto y mejorando la recuperación del ventrículo izquierdo, a través de un mecanismo que depende de la vía eNOS/NO/PKG.
- Dex no reduce la muerte celular, ni retrasa la apertura del PTPM de forma directa en el cardiomiocito.
- La presencia del endotelio es fundamental para que Dex ejerza su efecto pre-condicionante en cardiomiocitos sometidos a IR.
- Dex activa a NOS a través de un mecanismo dependiente del receptor α_2 -adrenérgico en el endotelio, mas no en el cardiomiocito.

9. Referencias

- [1] Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFFtRoMI, Jaffe AS, Apple FS, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116:2634-53.
- [2] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36:959-69.
- [3] Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*. 1990;82:II2-12.
- [4] 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;56:786-94.
- [5] 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. *The American journal of pathology*. 1974;74:399-422.
- [6] Jennings RB, Steenbergen C, Jr. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annual review of physiology*. 1985;47:727-49.
- [7] Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovascular research*. 1994;28:581-97.
- [8] Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circulation research*. 1989;65:1045-56.
- [9] 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.
- [10] Levitsky S. Protecting the myocardial cell during coronary revascularization. The William W. L. Glenn Lecture. *Circulation*. 2006;114:I339-43.
- [11] Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *The American journal of physiology*. 1999;277:H2240-6.
- [12] Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *The Journal of clinical investigation*. 1985;76:1713-9.
- [13] Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 1998;38:291-300.
- [14] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical journal*. 1999;341 (Pt 2):233-49.
- [15] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovascular research*. 2004;61:372-85.
- [16] Depre C, Vatner SF. Cardioprotection in stunned and hibernating myocardium. *Heart failure reviews*. 2007;12:307-17.
- [17] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.
- [18] Baxter GF, Yellon DM. Ischaemic preconditioning of myocardium: a new paradigm for clinical cardioprotection? *British journal of clinical pharmacology*. 1994;38:381-7.
- [19] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285:H579-88.
- [20] Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart failure reviews*. 2007;12:217-34.
- [21] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research*. 2004;61:448-60.
- [22] Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart failure reviews*. 2007;12:181-8.
- [23] Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65:1454-71.
- [24] Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65:177-95.

- [25] Pickard JM, Botker HE, Crimi G, Davidson B, Davidson SM, Dutka D, et al. Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop. *Basic research in cardiology*. 2015;110:453.
- [26] Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, Vicencio JM, et al. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1alpha/CXCR4 signalling axis. *Basic research in cardiology*. 2013;108:377.
- [27] Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circulation research*. 2014;114:1601-10.
- [28] Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic research in cardiology*. 2014;109:423.
- [29] Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65:1525-36.
- [30] Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiological reviews*. 2003;83:59-115.
- [31] Bell RM, Yellon DM. Conditioning the whole heart--not just the cardiomyocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;53:24-32.
- [32] Leucker TM, Ge ZD, Procknow J, Liu Y, Shi Y, Bienengraeber M, et al. Impairment of endothelial-myocardial interaction increases the susceptibility of cardiomyocytes to ischemia/reperfusion injury. *PLoS one*. 2013;8:e70088.
- [33] Zhang M, Shah AM. ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells. *Cardiovascular research*. 2014;102:249-57.
- [34] Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *The Journal of endocrinology*. 2011;210:271-84.
- [35] Rubio AR, Morales-Segura MA. Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Archives of medical research*. 2004;35:1-11.
- [36] Strasen J, Ritter O. Role of nNOS in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Trends in cardiovascular medicine*. 2011;21:58-63.
- [37] Darra E, Rungtischer A, Carcereri de Prati A, Podesser BK, Faggian G, Scarabelli T, et al. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104:200-6.
- [38] 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. *Circulation research*. 1998;83:73-84.
- [39] Bryan NS, Calvert JW, Gundewar S, Lefer DJ. Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Free radical biology & medicine*. 2008;45:468-74.
- [40] Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, et al. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic research in cardiology*. 1998;93:325-38.
- [41] Chang WL, Chung CH, Wu YC, Su MJ. The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia-reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2004;11:307-15.
- [42] Yang C, Talukder MA, Varadharaj S, Velayutham M, Zweier JL. Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation. *Cardiovascular research*. 2013;97:33-43.
- [43] Bell RM, Yellon DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovascular research*. 2001;52:274-80.
- [44] Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:11507-12.
- [45] Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circulation research*. 2000;87:972-83.
- [46] Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;122:216-38.

- [47] Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *British journal of pharmacology*. 2007;152:855-69.
- [48] Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circulation research*. 2003;93:907-16.
- [49] Das A, Salloum FN, Xi L, Rao YJ, Kukreja RC. ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;296:H1236-43.
- [50] Das A, Smolenski A, Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:38644-52.
- [51] Das A, Xi L, Kukreja RC. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:29572-85.
- [52] Virtanen R, Savola JM, Saano V, Nyman L. Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2-adrenoceptor agonist. *European journal of pharmacology*. 1988;150:9-14.
- [53] Masuki S, Dinunno FA, Joyner MJ, Eisenach JH. Selective alpha2-adrenergic properties of dexmedetomidine over clonidine in the human forearm. *Journal of applied physiology*. 2005;99:587-92.
- [54] Bhana N, Goa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidine. *Drugs*. 2000;59:263-8; discussion 9-70.
- [55] Bylund DB. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1985;22:835-43.
- [56] Bylund DB, Regan JW, Faber JE, Hieble JP, Triggle CR, Ruffolo RR, Jr. Vascular alpha-adrenoceptors: from the gene to the human. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1995;73:533-43.
- [57] Belleville JP, Ward DS, Bloor BC, Maze M. Effects of intravenous dexmedetomidine in humans. I. Sedation, ventilation, and metabolic rate. *Anesthesiology*. 1992;77:1125-33.
- [58] Hamasaki J, Tsuneyoshi I, Katai R, Hidaka T, Boyle WA, Kanmura Y. Dual alpha(2)-adrenergic agonist and alpha(1)-adrenergic antagonist actions of dexmedetomidine on human isolated endothelium-denuded gastroepiploic arteries. *Anesthesia and analgesia*. 2002;94:1434-40, table of contents.
- [59] Snapir A, Posti J, Kentala E, Koskenvuo J, Sundell J, Tuunanen H, et al. Effects of low and high plasma concentrations of dexmedetomidine on myocardial perfusion and cardiac function in healthy male subjects. *Anesthesiology*. 2006;105:902-10; quiz 1069-70.
- [60] 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.
- [61] Ibacache M, Sanchez G, Pedrozo Z, Galvez F, Humeres C, Echevarria G, et al. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822:537-45.
- [62] Kim HJ, Sohn JT, Jeong YS, Cho MS, Kim HJ, Chang KC, et al. Direct effect of dexmedetomidine on rat isolated aorta involves endothelial nitric oxide synthesis and activation of the lipoxygenase pathway. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2009;36:406-12.
- [63] Wong ES, Man RY, Vanhoutte PM, Ng KF. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different {alpha}2-adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;335:659-64.
- [64] Joshi MS, Ferguson TB, Jr., Johnson FK, Johnson RA, Parthasarathy S, Lancaster JR, Jr. Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:9982-7.
- [65] Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50:940-50.
- [66] Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, et al. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2007;73:689-98.
- [67] Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry*. 1972;48:422-7.
- [68] Chung BH, Kim S, Kim JD, Lee JJ, Baek YY, Jeoung D, et al. Syringaresinol causes vasorelaxation by elevating nitric oxide production through the phosphorylation and dimerization of endothelial nitric oxide synthase. *Experimental & molecular medicine*. 2012;44:191-201.
- [69] Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1411:273-89.

- [70] Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;287:H841-9.
- [71] Pardo F, Silva L, Saez T, Salsoso R, Gutierrez J, Sanhueza C, et al. Human supraphysiological gestational weight gain and fetoplacental vascular dysfunction. *International journal of obesity*. 2015;39:1264-73.
- [72] Wu G, Meininger CJ. Analysis of citrulline, arginine, and methylarginines using high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology*. 2008;440:177-89.
- [73] Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38:414-9.
- [74] Gutierrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, et al. Alteration in mitochondrial Ca(2+) uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell communication and signaling : CCS*. 2014;12:68.
- [75] Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clinical science*. 2007;113:47-63.
- [76] Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;78:23-34.
- [77] Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998;30:1181-9.
- [78] Zhu YM, Wang CC, Chen L, Qian LB, Ma LL, Yu J, et al. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain research*. 2013;1494:1-8.
- [79] Lempiainen J, Finckenberg P, Mervaala EE, Storvik M, Kaivola J, Lindstedt K, et al. Dexmedetomidine preconditioning ameliorates kidney ischemia-reperfusion injury. *Pharmacology research & perspectives*. 2014;2:e00045.
- [80] Jiang L, Li L, Shen J, Qi Z, Guo L. Effect of dexmedetomidine on lung ischemiareperfusion injury. *Molecular medicine reports*. 2014;9:419-26.
- [81] Kucuk A, Yaylak F, Cavunt-Bayraktar A, Tosun M, Arslan M, Comu FM, et al. The protective effects of dexmedetomidine on hepatic ischemia reperfusion injury. *Bratislavske lekarske listy*. 2014;115:680-4.
- [82] Yoshitomi O, Cho S, Hara T, Shibata I, Maekawa T, Ureshino H, et al. Direct protective effects of dexmedetomidine against myocardial ischemia-reperfusion injury in anesthetized pigs. *Shock*. 2012;38:92-7.
- [83] Kocoglu H, Karaaslan K, Gonca E, Bozdogan O, Gulcu N. Preconditionin effects of dexmedetomidine on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Current therapeutic research, clinical and experimental*. 2008;69:150-8.
- [84] Dong X, Xing Q, Li Y, Han X, Sun L. Dexmedetomidine protects against ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *The Journal of surgical research*. 2014;186:240-5.
- [85] Zhang XK, Zhou XP, Zhang Q, Zhu F. The preventive effects of dexmedetomidine against intestinal ischemia-reperfusion injury in Wistar rats. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015;18:604-9.
- [86] Si Y, Bao H, Han L, Shi H, Zhang Y, Xu L, et al. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation. *Journal of translational medicine*. 2013;11:141.
- [87] Jiang C, Xia M, Wang M, Chen S. [Dexmedetomidine preconditioning protects isolated rat hearts against ischemia/reperfusion injuries and its mechanism]. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences*. 2013;42:326-30.
- [88] Naaz S, Ozair E. Dexmedetomidine in current anaesthesia practice- a review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8:GE01-4.
- [89] Mimuro S, Katoh T, Suzuki A, Yu S, Adachi YU, Uraoka M, et al. Deterioration of myocardial injury due to dexmedetomidine administration after myocardial ischaemia. *Resuscitation*. 2010;81:1714-7.
- [90] Cai Y, Xu H, Yan J, Zhang L, Lu Y. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury. *Molecular medicine reports*. 2014;9:1542-50.
- [91] Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004;61:402-13.

- [92] Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2009;22:46-55.
- [93] Zaman J, Jeddi S, Ghasemi A. The effects of ischemic postconditioning on myocardial function and nitric oxide metabolites following ischemia-reperfusion in hyperthyroid rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18:481-7.
- [94] Fan Q, Yang XC, Liu Y, Wang LF, Liu SH, Ge YG, et al. Postconditioning attenuates myocardial injury by reducing nitro-oxidative stress in vivo in rats and in humans. *Clinical science*. 2011;120:251-61.
- [95] Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *British journal of pharmacology*. 2003;138:532-43.
- [96] Farah C, Reboul C. NO Better Way to Protect the Heart during Ischemia-Reperfusion: To be in the Right Place at the Right Time. *Frontiers in pediatrics*. 2015;3:6.
- [97] Cohen MV, Yang XM, Liu Y, Solenkova NV, Downey JM. Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299:H2028-36.
- [98] Methner C, Lukowski R, Grube K, Loga F, Smith RA, Murphy MP, et al. Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic research in cardiology*. 2013;108:337.
- [99] Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular research*. 2002;55:250-60.
- [100] Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *British journal of pharmacology*. 2015;172:2074-84.
- [101] Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM. alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia*. 1999;54:146-65.
- [102] Buffin-Meyer B, Crassous PA, Delage C, Denis C, Schaak S, Paris H. EGF receptor transactivation and PI3-kinase mediate stimulation of ERK by alpha(2A)-adrenoreceptor in intestinal epithelial cells: a role in wound healing. *European journal of pharmacology*. 2007;574:85-93.
- [103] Roberts RE. Alpha 2 adrenoreceptor-mediated vasoconstriction in porcine palmar lateral vein: role of phosphatidylinositol 3-kinase and EGF receptor transactivation. *British journal of pharmacology*. 2003;138:107-16.
- [104] Karkoulis G, Mastrogianni O, Lymperopoulos A, Paris H, Flordellis C. alpha(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. *Cellular signalling*. 2006;18:729-39.
- [105] Leucker TM, Bienengraeber M, Muravyeva M, Baotic I, Weihrauch D, Brzezinska AK, et al. Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;51:803-11.