



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**Influencia de la señalización redox mediada por
H₂O₂ en la regulación de las cinasas Mek 1/2 y
Erk 1/2 y la activación río abajo del factor de
transcripción Nrf2 en corazones con post-
acondicionamiento.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA

DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :

ARTURO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR DE TESIS:

Dr. Mabel Buelna Chontal

COASESOR:

Dra. Patricia Ramírez Noguera

(Cuautilán Izcalli, Estado de México, 2020)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Influencia de la señalización redox mediada por H₂O₂ en la regulación de las cinasas Mek1/2 y Erk1/2 y la activación río abajo del factor de transcripción Nrf2 en corazones con post-acondicionamiento.

Que presenta el pasante: Arturo Macías López

Con número de cuenta: 104002803 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M. en D. Azucena Lee Mendoza	
2do. SUPLENTE	Dra. Jazmín Flores Monroy	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatoria...

A mis padres, que al darme la vida, su apoyo y paciencia incondicionales, su sabiduría y amor me han otorgado todas las oportunidades que ofrece el mundo, sus grandes goces y maravilloso aprendizaje. Porque han arrojado luz en los momentos más inciertos.

A mi hermanita que ha sido mi mejor amiga e incondicional cómplice, y cuya alegría ilumina la vida de todos desde que llegó al mundo.

Para mi musa, que llena de voluntad la inspiración y adorna con amor cada experiencia.

AGRADECIMIENTOS

Gracias, en gran medida a mi alma máter:

La **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**
y a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Agradezco al

**CONSEJO ANCIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACyT)**

por la beca otorgada. Número de Becario 15017.

Infinitas gracias al

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA CARDIOVASCULAR del
**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO
CHÁVEZ**

por brindarme la oportunidad de acercarme a la ciencia y la investigación
mediante la realización de este proyecto.

Agradecimientos:

No se podría llegar tan lejos y poco podría hacerse en esta vida sin la participación de todas aquellas personas y el momento histórico que compartimos, y que de una u otra manera nos forjan, inspiran, apoyan, alientan e incluso nos retan. Por ello resultan insuficientes las palabras y el espacio destinados a externar la gratitud y participación tan esencial que cada uno de mis acompañantes en este viaje ha tenido, no sólo para la realización de este proyecto, si no para el desarrollo académico y personal que un servidor ha procurado para beneficio del mundo y de los suyos.

El final de esta hermosa etapa y de este proyecto no habrían sido posibles sin el apoyo de la Dra. Mabel Buelna Chontal, una admirable científica y una gran mujer de quien aprendí todo lo que implica ser una persona de ciencia y de fe, desde la responsabilidad que representa para con uno mismo hasta aquella que tenemos para con el resto mundo. Por enseñarme que cualquier cosa es posible si pones todo el corazón y todo el cerebro en llevarla a cabo. Le agradezco infinitamente el tiempo y cariño que nos dedicó a los alumnos para ser una gran amiga, consejera,

maestra y colega, con todo y las responsabilidades que como madre e investigadora tenía que atender.

El remarcable apoyo brindado por la Dra. Cecilia Zazueta, quien a pesar de sus interminables deberes y responsabilidades siempre tenía la disponibilidad y el gran corazón para escuchar, cuestionar, disertar e intercambiar, desde ideas y risas, hasta técnicas de ensayos in vitro ó recetas de cocina con cualquier alumno, investigador o personal del laboratorio.

Mi mayor agradecimiento, respeto y admiración para el Dr. Edmundo Chávez Cossio, Q.E.P.D. por haberme brindado el honor de trabajar con él y formar parte de sus últimos proyectos. Por el apoyo y las lecciones tan valiosas que recibí durante el poco tiempo que pude conocerlo y convivir con él. por creer en la juventud y enseñarme que la ávida curiosidad no sólo sirve para no tener que trabajar nunca o para ser un buen científico, si no para no morir nunca. Por demostrar a todos, con su vida y su obra que, si se tiene amor y convicción a lo que se hace, siempre hay tiempo para todo.

A todos los investigadores y alumnos del departamento de Biomedicina Cardiovascular del Instituto, que durante nuestros fugaces encuentros siempre tenían algo interesante que aportar y puntos de vista que otorgaban perspectiva a cada hecho que se discutía y cada proyecto en el que se trabajaba. Me demostraron que, si bien el trabajo de investigación puede ser arduo, largo y demandante, al final siempre vale la pena el resultado.

Agradezco a todos y cada uno de mis profesores de la facultad, que a la manera de cada uno me hicieron amar todas las disciplinas que forman parte de la licenciatura en Bioquímica Diagnóstica, por su pasión y su vocación tanto como profesores como profesionistas que han logrado encausar a lo alto el nombre de la facultad y el prestigio de sus egresados.

Gracias a mis amigos de toda la vida, Lucero Gómez, Víctor Suárez y Amir Rosas por las aventuras que hemos sobrevivido y los problemas que hemos librado. Por su compañerismo y todas esas conversaciones que aún hacen eco en mi alma, y sobre todo por enseñarme primero y antes que nadie el valor de la verdadera amistad.

Y por último y no menos importantes, agradezco a mis compañeros de la facultad; a mi hermano y amigo Agonizantes de quien estimo su honestidad y complicidad, que me enseñaron que no hay que olvidar ver al mundo como es y no como se desea que fuere. Agradezco la transparencia y amistad de Don Daniel y su capacidad de encarar la verdad como pocos, que me demostró que siempre hay alguien dispuesto a decir y honrar la sinceridad. A Méndez Nava por su pureza de corazón y alegría imperturbable, que me enseñaron a sonreírle al mal tiempo y aprecio la compañía de Cardoso J. por enseñarme la diferencia entre la sinceridad y el cinismo. Todos y cada uno de ellos, así como las experiencias que compartimos me mostraron facetas del mundo y de la vida, incluso de mí mismo que antes no conocía.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido_Toc30601143

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
TABLA DE CONTENIDO	VII
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	X
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	6
<i>Capítulo 1. INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO</i>	<i>6</i>
1.1 PRIMERA CAUSA DE MUERTE	6
1.2 ISQUEMIA	9
1.3 REPERFUSIÓN	11
1.3.1 PERMEABILIDAD	12
1.3.2 SOBRECARGA DE CALCIO	13
1.3.3 OXIDACIÓN	15
<i>Capítulo 2. CARDIOPROTECCIÓN</i>	<i>29</i>
2.1 POST-ACONDICIONAMIENTO	32
2.2 Nrf2: EL MAESTRO ANTIOXIDANTE	35
2.3 PROTECCIÓN MEDIADA POR Erk1/2.....	42
<i>Capítulo 3. SEÑALIZACIÓN REDOX</i>	<i>47</i>
3.1 El Peróxido de Hidrógeno	48
3.2 Estrés Reductor	52
III. ANTECEDENTES	57
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	63
V. HIPÓTESIS	65
VI. OBJETIVO GENERAL	66

6.1	Objetivos particulares.....	66
VII.	METODOLOGÍA.....	67
7.1	Protocolo experimental en un modelo in vivo.....	67
7.2	Contenido de GSH.....	75
7.3	Determinación de malondialdehído (MDA).....	76
7.4	Cuantificación de H ₂ O ₂	77
7.5	Importancia de la señalización redox en la cardioprotección mediada por el iPostC.	78
7.6	Evaluación de Nrf2 como blanco de ERK1/2.....	78
7.7	Análisis de activación de las cinasas Mek1/2 y Erk1/2 y del factor de transcripción Nrf2 (Inmunodetección).....	79
7.8	Extracción de proteínas nucleares.....	80
7.9	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	82
7.10	Análisis estadístico.....	83
VIII.	RESULTADOS.....	84
8.1	Estudio del efecto de la inhibición de Erk1/2 y el ER por asc sobre los parámetros hemodinámicos de corazones con iPostC.....	84
8.2	iPostC mantiene los niveles de GSH y evita el daño por EO causados por la lesión por IR.	91
8.3	El ácido ascórbico disminuyó la concentración de H ₂ O ₂ en los corazones con iPostC.....	94
8.4	El ER afectó la activación de MEK1/2-Erk1/2 en los corazones con iPostC.....	95
8.5	La inhibición de la señalización redox evita la traslocación nuclear de Nrf2 y la respuesta antioxidante en los corazones de iPostC.....	97
8.6	Función de la señalización MEK 1/2 y Erk1/2 en la activación de Nrf2 de corazones post-acondicionados.	99
IX.	DISCUSIÓN.....	102
X.	CONCLUSIÓN.....	114
XI.	PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES ADICIONALES.....	116
XII.	REFERENCIAS.....	119
XIII.	PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTE TRABAJO.....	161
	ANEXO 1.....	162

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. EFECTO DEL IPOSTC Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN DISTINTOS ESQUEMAS DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN.	89
FIGURA 1. CAUSAS DE LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA	7
FIGURA 2. PRINCIPALES EVENTOS QUE OCURREN EN EL DAÑO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN LA CÉLULA CARDIACA	18
FIGURA 3. FORMACIÓN Y CONTROL DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO (ROS)	25
FIGURA 4. MECANISMO DE REGULACIÓN CONSTITUTIVO DE NRF2	41
FIGURA 5. RESUMEN DEL MECANISMO CARDIOPROTECTOR QUE DESENCADENA EL POST-ACONDICIONAMIENTO	46
FIGURA 6. MONTAJE DE INSTRUMENTAL Y MODELO ANIMAL PARA PROTOCOLO DE CIRUGÍA	68
FIGURA 7. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA OBTENCIÓN DE TEJIDO CARDIACO DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO PARA ENSAYOS IN VITRO	72
FIGURA 8. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	74
FIGURA 9. EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN CORAZONES POST-ACONDICIONADOS	90
FIGURA 10. LA APLICACIÓN IPOSTC CONSERVA LA HOMEOSTASIS REDOX	93
FIGURA 11. LA SEÑALIZACIÓN REDOX INTERRUMPIDA POR ASC EN LOS CORAZONES DE IPOSTC EVITA LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2	96
FIGURA 12. LA INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN REDOX BLOQUEÓ LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NRF2 EN LOS CORAZONES CON IPOSTC	98
FIGURA 13. LA INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE ERK1/2 EN LOS CORAZONES CON IPOSTC NO AFECTÓ LA ACTIVACIÓN DE NRF2	101
FIGURA 14. SECUENCIA PRIMARIA DE NRF2 (RATTUS NORVEGICUS)	106
FIGURA 15. MECANISMO DE PROTECCIÓN INDUCIDO POR LA SEÑALIZACIÓN REDOX EN EL IPOSTC QUE INTERRUMPE LA ADMINISTRACIÓN DE UN AOX (ASCORBATO)	113

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN PRINCIPAL
$\Delta\Psi$	Potencial Transmembrana	Gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna necesarios para la generación de ATP por la ATP sintasa
Amplex Red	N-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina	Fluoróforo usado para evaluar H_2O_2 cuando se acopla la reacción con la enzima HRP la cual cataliza su oxidación para producir resorufina que es altamente fluorescente
AOX	Antioxidante	Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas mediante reacciones de óxido-reducción.

ARE	Elementos de respuesta antioxidante	Secuencia de ADN que reconoce Nrf2 en el promotor de sus genes blanco
ARE-B	Secuencia ARE-Biotinilada	Usado en electroforesis para detectar ácidos nucleicos
ARE-U	Secuencia ARE-no marcada con biotina	Usado en electroforesis para detectar ácidos nucleicos
asc	Ácido ascórbico	Antioxidante con capacidad de atrapar H ₂ O ₂ .
ATPasa	Enzimas que catalizan hidrólisis del ATP.	Enzimas capaces de producir la hidrólisis del adenosina-trifosfato (ATP) en adenosina-difosfato (ADP) y en fosfato inorgánico.
BH ₄	Tetrahidrobiopterina	Cofactor esencial en múltiples reacciones biológicas, una de ellas es la producción de NO por medio de las enzimas óxido nítrico sintasas

Ca ²⁺	Calcio	Participa en la contracción muscular y como. Segundo mensajero en señalización celular.
CaR	Receptor sensible a calcio	Receptor acoplado a proteína G que detecta los niveles extracelulares de Ca ²⁺
CAT	Catalasa	Enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
CBP/p300	Co-activador proteína de unión a CREB/p300	Ambos interactúan con numerosos factores de transcripción y actúan para aumentar la expresión de sus genes objetivo
CEBPA	CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP) alfa	Co-activador transcripcional
CTE	Cadena de transporte de electrones	Maquinaria biológica que consiste en una serie de transportadores de

		electrones que se encuentran en la membrana interna mitocondrial, que mediante reacciones de óxido-reducción producen ATP
Cul3	Complejo de ubiquitinación Cullin-3	Complejo de ubiquitinación ligasa 3. Participa en la degradación proteosomal de proteínas blanco
dP/dt_{max}	Máximo valor de variación de presión por variación del tiempo, durante el ciclo cardiaco	Índice de contractilidad
dP/dt_{min}	Mínimo valor de variación de presión por variación del tiempo, durante el ciclo cardiaco	Índice de relajación
DUSP	Proteína fosfatasa dual específica	Fosfatasa que puede actuar sobre los residuos de

		tirosina o serina/treonina y regula varias isoformas de las MAPK
ECG	Electrocardiograma	Gráfico en el que se registran los movimientos del corazón y es obtenido por un electrocardiógrafo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.	Agente quelante de metales
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética	Ensayo para evidenciar la interacción de un determinado factor de transcripción con su secuencia de ADN blanco.
EO	Estrés Oxidante	Tipo de estrés celular causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de un sistema biológico para reducir las
ER	Estrés Reductor	Tipo de estrés celular causado por un desequilibrio entre los

niveles de moléculas antioxidantes y la capacidad de un sistema biológico para oxidarlas

Erk 1/2	Cinasas activadas por señales extracelulares	Tiene función importante en el crecimiento y diferenciación celular. Implicada en la supervivencia de la célula en iPostC
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Enzima que cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato
GCLC	Subunidad catalítica glutamato-cisteína ligasa	Enzima antioxidante que cataliza el paso limitante de la síntesis del GSH
GGT1	Glutación gama-glutamil transferasa 1	Cataliza la transferencia del motivo glutamil del glutación a una variedad de aminoácidos y aceptores de dipéptidos
GIK	Glucos-Insulina-Potasio	Solución empleada como tratamiento contra el daño por IR, protege entre otras

		cosas, la integridad de la membrana celular, bombas y canales iónicos, es antiinflamatorio y previene apoptosis.
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G	Receptores transmembranales de 7 dominios que participan en la transducción de señales
Gpx2	Peroxidasa 2 de glutatión	Cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en agua y de otros hidroperóxidos orgánicos a sus alcoholes correspondientes. Utiliza GSH como agente reductor.
GSH	Glutatión reducido	Principal antioxidante de bajo peso molecular en la célula
GSR	Reductasa de glutatión	Cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) para formar glutatión reducido (GSH)

GSSG	Glutación oxidado	Es reducido por el glutatión reductasa
GST	Glutación S-transferasa	Enzima antioxidante que conjuga al GSH con electrófilos
H ⁺	Protones	Establecen un potencial electroquímico.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	Es una ROS. Involucrada en la señalización redox en la célula.
HO-1	Hemoxigenasa-1	Enzima antioxidante regulada por Nrf2 cuya función es detoxificar los grupos hem, produciendo biliverdina y monóxido de carbono.
HR	Frecuencia cardiaca	Medida que se expresa en latidos/minuto para evaluar el desempeño del corazón
HRP	Peroxidasa de rábano	Enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos,

		utilizando el poder oxidante del H ₂ O ₂
IAM	Infarto agudo al miocardio	Principal causa de muerte nivel mundial
iPostC	Post-acondicionamiento isquémico	Maniobra mecánica que consiste en aplicar ciclos cortos de isquemia reperusión en la arteria coronaria del corazón, justo después del evento isquémico.
IR	Isquemia-Reperusión	Tratamiento empleado que consiste en la revascularización de un tejido isquémico. Suele generar daño en el tejido ocasionado por múltiples eventos fisiopatológicos.
Keap1	Proteína asociada al dominio SH parecida a Kelch	Represor citosólico de Nrf2
LVDP	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo	La presión dentro del ventrículo izquierdo después de completar el

		llenado diastólico, justo antes de la sístole. Sirve para evaluar la función sistólica del corazón.
LVP	Presión del ventrículo izquierdo	Presión sistólica del ventrículo izquierdo en mm Hg
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos	Ruta de transducción de señales que se sitúa corriente abajo de receptores tirosina-cinasas así y receptores para citocina. Implicada en un sinnúmero de eventos celulares relacionados con el crecimiento, proliferación, adaptación, actividad mitocondrial, etc.
mCB	Monochlorobimano	Reacciona con los tioles, es utilizado para la medición del GSH.
MDA	Malondialdehído	Subproducto que resulta de la peroxidación lipídica de ácidos grasos

		poliinsaturados. Empleado como marcador de estrés oxidante.
MEK	Proteína cinasa de cinasa activada por mitógenos	Tiene función importante en el crecimiento y diferenciación celular. Implicada en la supervivencia de la célula en iPostC
MGST1	Subunidad microsomal de la glutatión S-transferasa	Cataliza la conjugación de glutatión a electrófilos y la reducción de hidroperóxidos lipídicos.
mitoK _{ATP}	Canales potasio sensibles a ATP en la membrana externa mitocondrial	Su apertura se ha implicado en la protección de la mitocondria en corazones con iPostC
mPTP	Poros de la transición en la permeabilidad mitocondrial	Poros inespecíficos que se forman en la membrana interna mitocondrial que permiten el paso de moléculas no mayores a 1.5 kDa.

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	Coenzima reductora que interviene en numerosas vías anabólica
NF-κB (p65)	Factor nuclear kappa-B (p65).	Factor de transcripción formado por el dímero p65-p50, modula la expresión de moléculas pro-inflamatorias
NO	Óxido nítrico	Gas producido por las células endoteliales que participa en la relajación del tono vascular produciendo vaso/broncodilatación, controlando también la presión sanguínea. En condiciones patológicas puede reaccionar fácilmente con el superóxido, potenciando el daño por estrés oxidante.
NOS	Sintasa de óxido nítrico	Cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina produciendo NO a partir del átomo terminal de

		nitrógeno del grupo guanidino de la arginina, en presencia de FMN, FADH, NADPH y BH ₄
Nox	NAD(P)H oxidasa	Cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD ⁺ o NADP ⁺ utilizando para ello oxígeno molecular y produciendo radical superóxido. Como productoras de ROS, median la regulación redox en varios niveles y compartimentos celulares.
NQO1	NADPH-quinona óxidoreductasa-1	Enzima antioxidante regulada por Nrf2 cuya función es detoxificar quinonas.
Nrf2	Factor nuclear E2 relacionado al factor 2	Factor que regula la transcripción de genes que codifican para enzimas antioxidantes y detoxificantes

PI3K/Akt	Fosfoinositol-3 cinasa/Akt (proteína cinasa B)	Implicada en supervivencia celular al activar a la eNOS. Participa también en crecimiento, proliferación, movilidad y ratico.
PKC	Proteína cinasa C	Cinasa que participa en mecanismos de supervivencia de la célula.
preC	Pre- acondicionamiento	Maniobra mecánica que consiste en aplicar ciclos cortos de isquemia reperusión en la arteria coronaria del corazón, justo antes del evento isquémico.
Prx1	Peroxirredoxina	Catalizan la reducción de diversos peróxidos utilizando residuos de cisteína y residuos conservados de su sitio activo.
PTP	Fosfatasa de tirosina	Grupo de enzimas que defosforilan residuos de tirosina. Participan en la

		regulación a varios niveles de la vía de las MAPK fosforilados en las proteínas.
RISK	Cinasas de supervivencia al daño por reperfusión.	Grupo de cinasas cuya activación se ha visto implicada en la protección contra el daño producido en el corazón por la reperfusión.
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno	Moléculas parcialmente reducidas del oxígeno, altamente reactivas. Incluyen radicales y no radicales.
RPACI	Rama principal de la arteria coronaria izquierda	Nace en el origen de la aorta y encima de la valva semilunar izquierda de la válvula aórtica. Suministra sangre al lado izquierdo del corazón.
RTK	Receptor tirosina-cinasa	Receptor de membrana con actividad intrínseca de tirosina-cinasa asociado a

		proteína G monomérica y mediador extracelular de la vía de las MAPK
RyR	Receptor de rianodina	Canal de calcio intracelular en tejido animal excitable (músculos y neuronas). En el músculo cardíaco, su activación se produce mediante la liberación de calcio inducida por calcio, que causa salida de calcio desde el retículo sarcoplásmico, un paso esencial en la contracción muscular.
SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico.	Enzima dependiente de ATP que transporta Ca^{2+} activamente hacia el interior del RS.
sMaf	Proteínas de fibrosarcoma musculoaponeurótico o (Maf) pequeñas	Factores de transcripción básicos de tipo cremallera de leucina que pueden unirse al ADN y regular la transcripción génica.

SOD	Superóxido dismutasa	Enzima antioxidante que detoxifica al anión superóxido produciendo H_2O_2
TBE	Amortiguador Tris-borato EDTA	Usado en electroforesis para parar ácidos nucleicos
Txn	Tiorredoxina	Cataliza la reducción de residuos de cisteínas oxidadas y la escisión de enlaces disulfuro en proteínas oxidadas.
TxnR1	Tiorredoxina reductasa-1	Cataliza la reducción de tiorredoxina utilizando NADPH como agente reductor
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia	Para expresar cuantitativamente los resultados de los ensayos fluorométricos normalizados por mg de proteína en el ensayo.

I. RESUMEN

Influencia de la señalización redox en la regulación de las cinasas Mek1/2, Erk1/2 y la activación río abajo del factor de transcripción Nrf2 en corazones con post-acondicionamiento.

La cardiopatía isquémica es la principal causa de muerte en el mundo, por tal razón es necesario desarrollar estrategias para preservar la función cardíaca. Dado que la reperfusión es la estrategia ineludible aplicada para restaurar el flujo de sangre al tejido isquémico, a su vez, es el evento que más daña al corazón, en el fenómeno conocido como daño por isquemia-reperfusión (IR). Para evitar la lesión debida a la revascularización del miocardio, hay diferentes esquemas de tratamiento, desde el farmacológico,

hasta la administración de antioxidantes (AOX) y estrategias mecánicas como el acondicionamiento isquémico. El post-acondicionamiento isquémico (iPostC), desde su descubrimiento ha demostrado ser una de las estrategias de protección más eficaces para prevenir el daño por IR y mantener la viabilidad de la célula cardíaca. Se ha descrito que promueve la activación de señales endógenas de salvamento que involucran la vía de señalización de cinasas de sobrevivencia al daño por reperfusión (RISK), como Mek1/2 y Erk1/2, además del programa genético del factor de transcripción Nrf2, que a través de la inducción de la expresión de enzimas de fase 2 y antioxidantes mantiene la homeostasis redox y regula la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). En este trabajo planteamos que la regulación Mek1/2 y Erk1/2 está

coordinada por un equilibrio en los niveles de especies oxidantes del medio intracelular que promueven su activación. Ya que recientemente, se ha planteado un posible papel de las ROS como moléculas de señalización reconocidas que pueden participar en las respuestas de supervivencia (señalización redox) a través de mecanismos relacionados con escenarios oxido/reductores. Sin embargo, no se han estudiado del todo los blancos involucrados en estas señales durante eventos fisiológicos específicos como es el caso del iPostC. Debido a su naturaleza química, el H_2O_2 ha sido designado como una de las principales moléculas transmisoras de señales redox. Empleando un modelo animal sometido a estrés reductor (ER) en los primeros minutos de una reperfusión prolongada, estudiamos la importancia de la activación redox-

dependiente mediada por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las vías de señalización involucradas en el iPostC, mostrando una relación entre la activación de las cinasas Erk1/2 y la presencia de esta especie reactiva del oxígeno que. En este estudio se evaluó si la cardioprotección activada por el iPostC depende de una homeostasis redox durante la participación de cinasas de supervivencia como Erk1/2, así como la activación corriente abajo del factor de transcripción Nrf2 para contribuir al mantenimiento del balance redox en la reperfusión prolongada. Nuestros resultados muestran que la protección activada por el iPostC en el miocardio isquémico se ve afectada por el tratamiento con asc, lo cual sugiere que la protección está relacionada con señales redox dependientes que se ven interrumpidas en ambientes pro-reductores. Cuantificando el H_2O_2 encontramos

que la señal redox se encuentra disminuida por efecto de un estrés reductor inducido por asc. Lo anterior se vio reflejado en la disminución de Erk1/2 activa y una menor acumulación nuclear Nrf2 afectando significativamente la función cardíaca durante la reperfusión. Por otro lado, encontramos que, si bien la activación de Erk1/2 depende en parte de una señal redox, esta no se produce debido a una oxidación directa (redox-reversible) en la cinasa. De esta manera, los resultados sugieren que la protección activada por el iPostC involucra una respuesta que promueve señales dependientes del estado redox a diferentes niveles de señalización involucrados en la sobrevivencia del cardiomiocito, así como una regulación positiva del factor de transcripción Nrf2 para mantener el balance redox en la reperfusión a largo plazo.

II. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

1.1 PRIMERA CAUSA DE MUERTE

De acuerdo con reportes de la OMS hasta el año 2017, las enfermedades cardiovasculares (CVDs) toman la vida de 18 millones personas cada año, siendo las cardiopatías isquémicas la principal causa de muerte anualmente a nivel mundial (Johnson y Onuma, 2016; Huang *et al.*, 2018; Pandian *et al.*, 2018). Estas se presentan en mayor medida en países de ingresos bajos y medianos, en los cuales la incidencia se ha incrementado a más del doble en las últimas cuatro décadas, al grado que la enfermedad acomete como problema de salud 15 años antes en comparación con las edades a las que en promedio se presentan en países desarrollados. De estas muertes, sólo el 85% se deben al ataque cardíaco y al accidente cerebrovascular (INEGI, s. f.; Johnson y Onuma,

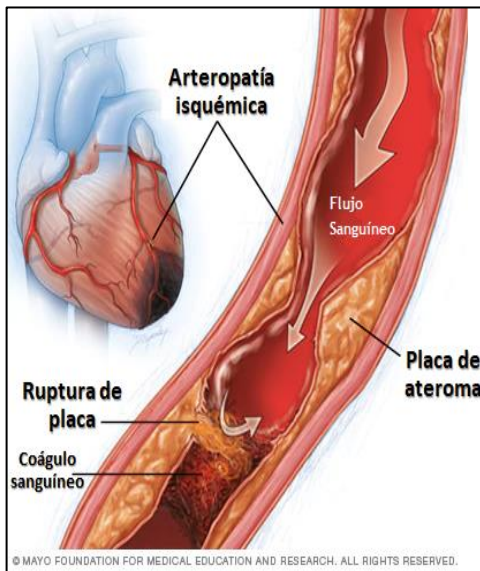


Figura 1. Causas de la isquemia miocárdica. La formación de una placa sebácea (placa de ateroma) o la ruptura de esta, así como la liberación de un coágulo puede provocar un evento isquémico que bloquea el suministro de sangre a un órgano o tejido. (Modificado de: <https://www.mayoclinic.org/es-es>)

2016). La mayoría de las enfermedades cardiovasculares pueden evitarse procurando tomar conciencia de la prevención sobre factores de riesgo conductuales, como el consumo de drogas legales, tabaquismo, dieta, la inactividad física, la hipertensión y la obesidad. Personas con enfermedad cardiovascular o que

tienen alto riesgo de padecerla (por la presencia de uno o más factores de riesgo como la hipertensión, la diabetes, la hiperlipidemia o trastornos cardiovasculares subyacentes) necesitan ser detectadas y puestas tempranamente a ser

asesoradas y medicadas, según sea concerniente (Feigin *et al.*, 2014; Owolabi *et al.*, 2015).

Como problema de salud mundial, las cardiopatías isquémicas mantienen a las investigaciones médicas ocupadas con el desarrollo e implementación de distintos protocolos para prevenir, evitar y tratar el daño causado por el infarto agudo al miocardio (IAM). El bloqueo es consecuente al desarrollo de la placa de ateroma en el endotelio vascular o a la embolización de coágulos en capilares y vasos menores que interrumpen el suministro sanguíneo a las células que alimentaban, induciendo la isquemia en el musculo cardiaco y provocando un grave declive en tareas metabólicas necesarias para el trabajo contráctil del cardiomiocito, su vida y función, en la respiración celular, la homeostasis del calcio y la producción de ATP (Ver Figura 1). (Braunwald, 1974; Bliksøen *et al.*, 2017; Maor y Prasad, 2018)

1.2 ISQUEMIA

La interrupción en la síntesis de ATP como consecuencia de la privación de oxígeno para la cadena de transporte de electrones (CTE) y la falta de sustrato para la glucólisis provoca un cambio metabólico severo, que el cardiomiocito se ve obligado compensar a favor de la oxidación anaerobia, cuya producción de lactato incrementa la concentración de protones (H^+) induciendo acidosis. El antiportador sodio-protones (Na^+/H^+) aumenta la concentración intracelular de Na^+ para remover el exceso de H^+ , sin embargo, bajo estas condiciones el Na^+ intracelular es excretado a cambio de calcio (Ca^{2+}) por un funcionamiento lento o retrógrado del intercambiador de Na^+/Ca^{2+} . Así que, más Ca^{2+} es ingresado a través del canal sarcolemal de Ca^{2+} tipo-L dependiente de voltaje, ya que el potencial de membrana en reposo es bajo ($\downarrow \Delta\Psi$). Este aumento de Ca^{2+} intracelular es absorbido en el retículo sarcoplásmico (SR) por la bomba de Ca^{2+} SERCA y se libera desde allí a través de RyR, lo que trae consigo alteraciones en la contracción y la contractura de las

miofibrillas (Kalogeris, 2012). La función mitocondrial es comprometida a causa de esta mala regulación del calcio intracelular que puede llevar, por todos estos eventos a la formación del poro de la transición en la permeabilidad mitocondrial (mPTP), un orificio no específico que en condiciones de isquemia se mantiene cerrado gracias al bajo pH (Sanada y Komuro, 2011). De esta manera una disminución en la captación del calcio por la mitocondria provocada por una rápida despolarización y una baja recuperación de su potencial de membrana son características de la pérdida de contracción del miocardio durante la isquemia. (Szydłowska y Tymianski, 2010).

Si bien la severidad de los eventos mencionados anteriormente es proporcional al tamaño del área infartada y la duración del evento isquémico, es, por mucho, el restablecimiento del flujo de sangre, lo que proporciona un daño adicional y significativo al área isquémico-reperfundida, exacerbado por una serie de eventos que comienzan desde la

reintroducción del oxígeno, y que paradójicamente terminará por promover la muerte celular (Ver Figura 2).

1.3 REPERFUSIÓN

Hace medio siglo, Jennings y colaboradores definieron el daño por reperfusión como aquel originado del restablecimiento de flujo sanguíneo al tejido infartado, que, si bien tiene como propósito devolver el oxígeno, glucosa y remover H^+ y metabolitos tóxicos derivados de la isquemia, a su vez produce un daño exacerbado cuya interdependencia con el daño producido por la isquemia aun es tema de debate (Jennings *et al.*, 1969; Buja y Vander Heide, 2016; Maor y Prasad, 2018) y que puede ser contrarrestado con éxito al someterse a alguna estrategia protectora al inicio o durante la reperfusión prolongada para evitar los daños causados por este fenómeno (Yellon y Hausenloy, 2007; Tullio, 2013).

Los mecanismos subyacentes al daño por reperfusión son complejos y multifactoriales que convergen en la apertura del mPTP (Correa y Zazueta, 2009), un evento clave que trae

consigo la disfunción y la muerte del cardiomiocito (Ver Figura 2)

1.3.1 PERMEABILIDAD

La formación de este poro entre la membrana interna y externa mitocondrial trae consigo el colapso del potencial de membrana y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa a expensas de la producción de ATP y favorece una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), este poro además provoca hinchamiento de la mitocondria, debido al tránsito de moléculas menores de 1.5 kDa, al interior o exterior del organelo, lo que puede causar estrés osmótico. Este hinchamiento puede llevar al rompimiento de la membrana externa mitocondrial y provocar la salida del citocromo C del espacio intermembranal. Otras proteínas pro-apoptóticas como Bax/Bak pueden formar poros en la membrana que contribuyen a la salida de citocromo C y eventos de muerte celular (Borutaite, 2001).

Entre los fenómenos que contribuyen de manera significativa a que ocurra lo anterior, figura el desbalance en la homeóstasis de iones y el estrés oxidante (EO) (Kalogeris, 2012; Raedschelders, 2012).

1.3.2 SOBRECARGA DE CALCIO

Con el incremento en Ca^{2+} intracelular que tiene lugar durante la isquemia, la súbita normalización del pH durante la reperfusión y la fuga de H^+ de la CTE hacia el espacio intermembranal, promueve nuevamente un gradiente de H^+ a través de la membrana que activa un entrada excesiva de Na^+ , así como la reactivación del transporte reverso de calcio por el transportador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que eventualmente falla por acción de las calpaínas y favorece el ingreso de calcio al cardiomiocito (Baines, 2009; Sanada y Komuro, 2011).

El retículo sarcoplásmico es incapaz de amortiguar la sobrecarga de este catión debido a que la ATPasa SERCA esta inhibida. Mientras que, por el contrario, el receptor de Rianodina estimula la liberación de calcio. A su vez, la

mitocondria, específicamente el uniportador de Ca^{2+} , aprovecha el potencial negativo del organelo para captar calcio, sin embargo las altas cantidades del catión inducen la respuesta de la transición en la permeabilidad (Hess y Manson, 1984; Acar *et al.*, 1990; Siegmund, 1992; Szydlowska y Tymianski, 2010; White *et al.*, 2017; Korosoglou *et al.*, 2018; Singh, Mishra, *et al.*, 2019). Otros eventos que se ven favorecidos por la abundancia en el calcio intracelular, son la inflamación provocada la agregación de pirofosfatos de calcio (Dai *et al.*, 2018), la actividad incrementada de las calpaínas y la activación de ATPasas sensibles a calcio (Wang *et al.*, 2018; Singh, Mishra, *et al.*, 2019) como aquella que cataliza la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa que promueve el EO (Granger, 1988; Blake, 1994; Kalogeris, 2012; Douzinas y Apeiranthitis, 2019). Este último suceso secundario a la formación del mPTP (García-Rivas *et al.*, 2006; Penna, 2012; Wu *et al.*, 2015; Gordan *et al.*, 2018) y responsable en gran medida de los eventos descritos en la sección siguiente.

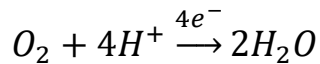
1.3.3 OXIDACIÓN

1.3.3.1 LA PARADOJA DEL OXÍGENO

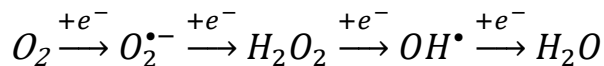
En condiciones fisiológicas la abundancia de reacciones de óxido-reducción suceden naturalmente como parte del metabolismo aerobio que incluye la generación del potencial de membrana para llevar a cabo la fosforilación oxidativa, donde el oxígeno es el átomo ideal para captar electrones y finalmente ser reducido a agua por el complejo IV, pero también para formar especies parcialmente reducidas del oxígeno, mejor conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) y que juegan un papel esencial en el funcionamiento de la célula (Baines, 1997; Baines *et al.*, 1997; Kalogeris, 2012; Hancock y Whiteman, 2018; Ighodaro y Akinloye, 2018).

Durante la respiración celular la enzima citocromo c oxidasa reduce el dióxígeno a agua por la adición de cuatro protones y cuatro electrones. Esta reducción tetravalente puede ser producida por la mitocondria sin generar ningún intermediario, lo que representa el 95% de consumo de

oxígeno de los tejidos vivos y se esboza a continuación en la siguiente ecuación:



El otro 5% de oxígeno sufre de reducción univalente por adición sucesiva de electrones al átomo de oxígeno que favorece que estos puedan fugarse de la CTE y se promueva la formación de varios intermediarios radicales parcialmente reducidos (Fridovich, 1978; Hess y Manson, 1984; Allen y Spitz, 2016; Turkan, 2017; Chaudhuri *et al.*, 2019), que representan y originan a la familia de ROS que incluyen tanto a los radicales libres, como a los no radicales que si bien estos últimos presentan cierta reactividad no ceden tan fácilmente su electrón libre como los radicales.



dioxígeno → *Anión Superóxido* → *Peróxido de Hidrógeno*
 → *Radical hidroxilo* → *agua*

Por otro lado, la producción de ROS a partir de oxígeno molecular forma parte de otros procesos celulares esenciales

como el estallido respiratorio en células fagocíticas mediado por el complejo NADPH oxidasa (Nox), enzima que de igual manera aporta el anión $O_2^{\bullet-}$ (superóxido) como sustrato para la producción de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa (NOS) que emplea el endotelio en la regulación del tono vascular y las células nerviosas como neurotransmisor (Inoguchi, 2003; Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006). Además, hasta hace algunos años, la generación controlada de ROS como el $O_2^{\bullet-}$ y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las cuales han sido reconocidas como moléculas señalizadoras en la activación de diferentes vías. Un fenómeno redundante que hace surgir el concepto de “paradoja del oxígeno” (Cadenas, 2004; Kalogeris, 2012). Tomando en cuenta que la producción de ROS ocurre de manera espontánea en los organismos aerobios, se vuelve obligada la existencia de un aparato que ayude a mantener un balance redox en la célula, regulando la producción de especies reactivas, limitando su difusión y amortiguando sus excedentes: este es el sistema antioxidante.

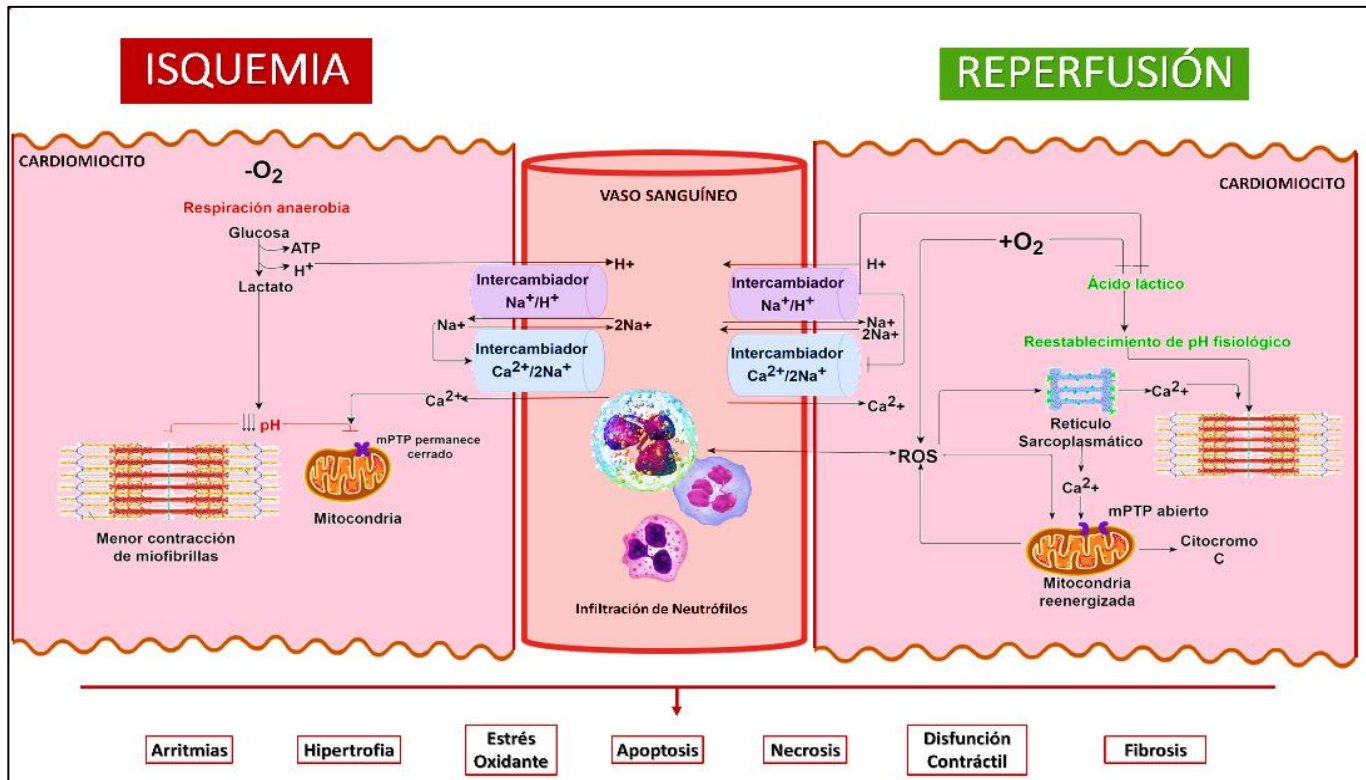


Figura 2. Principales eventos que ocurren en el daño por Isquemia/Reperfusion en la célula cardiaca. Durante la isquemia se favorece la respiración anaerobia, que produce un descenso en el pH, por la alta producción de H^+ y para compensar, la bomba de Na^+/H^+ elimina H^+ a cambio de sodio que expulsa de la célula introduciendo calcio, lo que produce una sobrecarga del catión que forma el mPTP pero que gracias al pH ácido se mantiene cerrado y evita la hipercontracción de las miofibrillas. Durante la reperfusion la CTE produce ROS de manera exacerbada que median la apertura del mPTP y la disfunción del retículo sarcoplasmático, así como la quimioatracción de neutrófilos proinflamatorios; las ROS también acentúan el mal manejo del calcio. (Modificado de Derek J. Hausenloy and Derek M. Yellon, 2013)

1.3.3.2 SISTEMA ANTIOXIDANTE

El sistema antioxidante está formado por componentes de diversa naturaleza química que actúan a diferentes niveles y que son capaces de inhibir la formación de ROS y contrarrestarlos para controlar su propagación y reacción hacia blancos inespecíficos. Se incluyen aquellas de origen enzimático como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), peroxidasas y tiorredoxinas; de naturaleza proteica que tienen por finalidad disminuir la disponibilidad de iones metálicos pro-oxidantes como ferritina, metalotioneínas, transferrina, entre otras. O bien proteínas de choque térmico que protegen por otros mecanismos; también son comunes, moléculas de bajo peso molecular *atrapadoras* de ROS como glutatión reducido (GSH), bilirrubina, ácido úrico, ácido ascórbico y α -tocoferol, estas dos última provenientes de la dieta (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006).

Sobre esta cuestión cabe destacar la existencia de una primera línea de defensa antioxidante que se encarga de abatir los radicales libres desde su incipiente formación, limitando así

su propagación, disminuyendo eventos de oxidación en sustratos inespecíficos y la formación de más ROS (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006; Gill y Tuteja, 2010; Ighodaro y Akinloye, 2018). Esta razón, explica la presencia de enzimas de una primera línea de defensa en aquellos compartimentos donde se encuentran las principales fuentes generadores de especies reactivas o radicales libres, pues al ser éstas últimas altamente reactivas requieren ser neutralizadas en el mismo sitio donde son producidas. Las enzimas a las que esta sección hace referencia incluyen a la metaloenzima SOD que se encarga de convertir $2O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y oxígeno molecular, es prácticamente ubicua, expresándose en todo el entorno celular, desde el núcleo, peroxisomas y citoplasma que incluyen a la isoforma SOD1 o Cu/Zn-SOD, la membrana interna mitocondrial que tiene SOD2 o MnSOD, hasta la matriz extracelular con SOD3 o EC-SOD (Ighodaro y Akinloye, 2018). Posteriormente a la formación de H_2O_2 , la CAT usa sus cofactores de hierro o manganeso para catalizar la reducción de este oxidante a agua y oxígeno molecular,

completando el proceso de detoxificación iniciado por la SOD. CAT es prevalente en casi todos los tejidos, concentrándose en los peroxisomas y a diferencia de las mitocondrias de cardiomiocitos, es prácticamente inexistente en las células de mamíferos, siendo la glutatión peroxidasa (GPx) la que prevalece en las mitocondrias del resto de los linajes celulares, cabe mencionar que esta enzima también está presente, aunque en menor medida en el citosol y membrana plasmática (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006; Navarro-Yepes *et al.*, 2014; Ighodaro y Akinloye, 2018). Usa selenio como cofactor y dos moléculas de GSH para catalizar la reducción de H_2O_2 a H_2O o lipoperóxidos a sus correspondientes alcoholes, por lo que es capaz de evitar la peroxidación de lípidos (Gill y Tuteja, 2010) y puede ser regenerada por la glutatión reductasa (GSR) (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006).

1.3.3.3 ESTRÉS OXIDANTE

A pesar de la robusta respuesta del sistema antioxidante endógeno, hay situaciones proclives a generar un desbalance entre la producción de ROS y la capacidad de los antioxidantes para controlarlas, debido a la excesiva producción de estas especies, o por la disminución de los componentes de la maquinaria antioxidante, la falta de reparación (reducción) de estos o bien una combinación de esos tres factores que originará una condición conocida como EO (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006).

Durante la reperfusión, la restitución del oxígeno tiene muchas de las consecuencias más graves en el daño por reperfusión. Luego de que el potencial de membrana de la mitocondria ha sido comprometido, la CTE se vuelve ineficiente/retrógrada dejando al oxígeno parcialmente reducido (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2006; Baines, 2010; Raedschelders, 2012) esta respuesta es exacerbada por la constante fuga de electrones del complejo I y III de la CTE (Lee, 2012; Raedschelders, 2012; Pell, 2016)

generando grandes cantidades de $O_2^{\bullet-}$, prooxidante y precursor de las principales especies reactivas. Otras maquinarias generadoras de $O_2^{\bullet-}$ y ROS son catalíticas e incluyen enzimas como la xantina deshidrogenasa convertida a xantina oxidasa, la NOS desacoplada por oxidación de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH4); el aumento en la actividad del citocromo p450 y las Nox son las fuentes que producen $O_2^{\bullet-}$ en mayor escala (Deng, 2010; Raedschelders, 2012).

En su conjunto, los anteriores eventos son capaces de superar la capacidad del sistema antioxidante para reducir sus moléculas reactivas, formadas de manera importante por $O_2^{\bullet-}$, radical que dismuta espontáneamente a radical hidroxilo ($HO\bullet$) en presencia de oxígeno molecular o bien genera H_2O_2 el cual, mediante la reacción de Fenton, puede reaccionar con sales de $Fe^{3+/2+}$ y producir más $HO\bullet$, una de las especies más reactivas y responsable, de manera importante de la toxicidad celular mediada por radicales libres (Lobo, 2010; Douzinas y

Apeiranthitis, 2019; Singh, Kukreti, *et al.*, 2019). El anión $O_2^{\bullet-}$ también puede *compartir* espontáneamente su electrón con NO, una reacción que produce otras especies oxidantes como el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Nauser y Koppenol, 2002; Raedschelders, 2012), que en las condiciones ácidas de la reperfusión puede prevalecer en su forma protonada ($NOOH$) y formar nuevamente NO y HO^\bullet (Hogg, 1992; Gill y Tuteja, 2010; Ighodaro y Akinloye, 2018). Todas estas provocan severos daños por EO en prácticamente cada biomolécula, eventos que tienen un gran impacto para la homeostasis celular que se ve dramáticamente devastada. La *Figura 3* esquematiza las principales fuentes de ROS fisiológicas que en la reperfusión llevan a una producción exacerbada de estas.

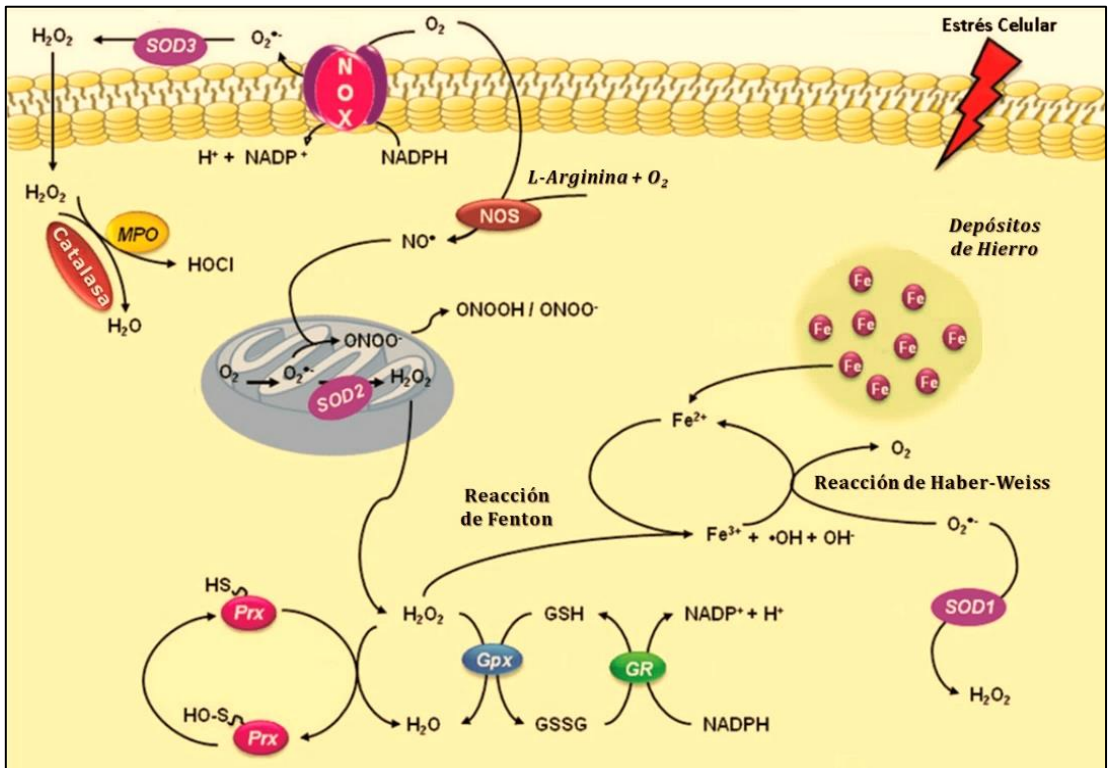


Figura 3. Formación y Control de Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno (ROS). La mayor fuente de producción de ROS es generada a partir de $O_2^{\bullet-}$ y su principal fuente proviene de la matriz mitocondrial, y en segundo término de las enzimas Nox. La defensa más importante contra el anión $O_2^{\bullet-}$ es la enzima SOD, que generan H_2O_2 , el cual difunde a través de membranas y reacciona con varias moléculas o metales de transición (Fe^{3+}/Fe^{2+}) para producir el radical hidroxilo ($\bullet OH$) por la reacción de Fenton. Las mieloperoxidasas producen ácido hipocloroso (HOCl) con H_2O_2 y Cl. El $NO\bullet$ generado por las sintasas de óxido nítrico (NOS) es capaz de difundir a través de los organelos y reaccionar con $O_2^{\bullet-}$, produciendo peroxinitrito (ONOO \bullet) y ácido peroxinitroso (ONOOH). Para estos eventos existen múltiples componentes para la defensa antioxidante como la CAT, las glutatión-peroxidasas (GPXs), glutatión-reductasas (GR) y peroxirredoxinas (Prxs) contribuyen al cuidadoso control de la homeostasis redox en la célula. (modificado de: Navarro-Yepes et. al, 2014)

Debido a lo fácil que las moléculas oxidantes no radicales difunden a través de membranas, el daño por peróxidos y radicales hidroxilos es masivo y llega a todos los compartimentos celulares, causando inestabilidad en las membranas por peroxidación de lípidos insaturados, donde la abstracción de hidrógenos del doble enlace de la cadena hidrocarbonada de fosfolípidos (como la esfingosina y fosfatidilcolina), promueve la formación de radicales lipídicos. Estos pueden reaccionar para propagar el electrón libre por la cadena hidrocarbonada, y formar peroxilos lipídicos que reaccionan con oxígeno para generar hidroperóxidos, otro lípido radical y un rastro de malondialdehído (MDA), hidroxinonenal e isoprostanos, productos citotóxicos que alteran la contractilidad y la tonicidad del endotelio, (Pryor, 1976; Kagan, 2018; Shahid *et al.*, 2018). Además, pueden formar aductos con productos de oxidación del DNA como desoxiguanosina o desoxiadenosina que pueden ser mutagénicas al promover mutaciones por sustituciones de pares de bases,

transversiones y cambios en el marco de lectura (Marnett, 1999). Al respecto de ácidos nucleicos, el EO puede llegar a las bases nitrogenadas y la desoxirribosa, generando mutaciones y fragmentación de nucleosomas que pueden generar cambios en las funciones de la cromatina. Esto lleva a la célula a un estado alterado de la regulación de la transcripción, el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos entra en juego para reponer las modificaciones hechas en grandes porciones de DNA, sin embargo, pueden fallar en condiciones de estrés y degenerar en carcinogénesis, apoptosis o necrosis. Las proteínas y péptidos poseen mecanismos de reparación limitados únicamente a residuos de metionina, así que la hidrólisis es el único destino para evitar que las proteínas oxidadas formen agregados con otras proteínas o irruman en la red metabólica. El carbono α de los aminoácidos y sus grupos funcionales son particularmente susceptibles a la abstracción de su hidrógeno, donde la naturaleza de estas modificaciones inespecíficas e irreversibles y sus productos dependen del grupo funcional y el tipo de

ROS con el cual reaccionan (van der Vliet, 1994; Stadtman y Levine, 2003; Winterbourn, 2015; Hancock y Whiteman, 2018; Akawi *et al.*, 2019). Así, la oxidación por radicales libres puede desnaturalizar proteínas rompiendo enlaces peptídicos, susceptibles de formar entrecruzamientos con residuos de lipoperóxidos y otras proteínas, alterando la hidrofobicidad de ciertos aminoácidos, usualmente residuos clave en la función y estructura de la proteína (Albuquerque, 2016; Meijles *et al.*, 2019).

CAPÍTULO 2. CARDIOPROTECCIÓN

Desde el reconocimiento de estos fenómenos, el daño por isquemia-reperfusión (IR), se ha convertido en el blanco de la mayoría de los estudios enfocados a contrarrestar los sucesos originados por la cardiopatía isquémica en el margen de su evento agudo. Ya que, si bien la resucitación cardiopulmonar, la terapia trombolítica, la reperfusión y desfibrilación tempranas son la primera línea de tratamiento ante el evento agudo para evitar la extensión del daño; la disfunción contráctil y bajo gasto cardiaco durante la recuperación del paciente significan un alto grado de riesgo post-operatorio que desemboca en la disfunción cardíaca. Para ello, las intervenciones que tienen por finalidad reducir el tamaño de infarto y la muerte celular se acuñaron como cardioprotectoras en los setentas por Braunwald *et al.*, luego de reconocer un cambio de paradigma que involucraba el

inicio de la reperfusión y la duración de la isquemia como los eventos cruciales donde deben efectuarse la mayoría de las intervenciones con vistas a la recuperación del músculo cardíaco (Maroko, 1971; Braunwald, 1974; Heusch, 2015, 2019). Entre las variables que determinan una u otra intervención al miocardio que curse por IR es de notar la importancia de la ventana de tiempo en que se interrumpe la isquemia y se inicia la reperfusión, sabiendo que para que cualquier estrategia aplicada sea exitosa, la revascularización debe ser aplicada de manera temprana (≤ 5 min) e intermitente (acondicionamiento isquémico) (Maroko, 1971, 1972; Mauser, 1985; Murry, 1986; Braunwald y Rutherford, 2016; Kapur *et al.*, 2018, 2019). Esto con la finalidad de que los mecanismos de protección endógenos sean activados pues, se cree que esta respuesta es bimodal y que la duración e itinerancia del binomio IR puede incluso generar una respuesta de protección que disminuya el tamaño del infarto. (Yellon y Hausenloy, 2007; Kalogeris, 2012). Un hecho que no solo marcaría las condiciones para intervenciones

oportunas que salvaran el miocardio, también establecería las bases teóricas para el estudio del pre-acondicionamiento (preC) y el post-acondicionamiento isquémicos (iPostC).

Antes de la aparición de esta estrategia y a lo largo de treinta años se han llevado a cabo más de 13 mil estudios con intervenciones de todo tipo, entre las farmacológicas y no farmacológicas se incluyen inhibidores de bombas y transportadores, quelantes de calcio, autacoides, infusiones de glucosa, insulina y potasio (GIK), antioxidantes hasta post-acondicionamiento con anestésicos volátiles y con hipotermia, intervenciones que a excepción del tratamiento con adenosina y las soluciones de GIK han presentado siempre un éxito tan multifactorial como elusivo cuando se ponen a prueba en pruebas clínicas (Dirksen, 2007). Es hasta los hallazgos de Murry y Zhao quienes experimentaron con la restitución gradual del flujo sanguíneo previo (preC) a periodos prolongados de isquemia o antes de la reperfusión (iPostC), respectivamente, observando una significativa

reducción en el daño por IR que eventualmente exhibiría buenos resultados en la clínica (Murry, 1990; Zhao *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Ramírez-Camacho *et al.*, 2018; Caricati-Neto *et al.*, 2019), sin embargo aún con ciertas reservas frente a diversos escenarios con comorbilidades o terapias conjuntas debido a los pocos resultados propios de su recientes hallazgo (Bolli *et al.*, 2004; Tsang, 2004; Bice y Baxter, 2015).

2.1 POST-ACONDICIONAMIENTO

El concepto de acondicionamiento isquémico surgió luego de que los cardiólogos observaran una disminución en los síntomas de pacientes con angina inestable o IAM que hubiesen cursado por un periodo de angina prodrómica. También se han observado menos dolores en el pecho y del segmento ST de ECGs, mejor función cardíaca y reducción del tamaño de infarto. Al paradójico beneficio que venía con la ocurrencia de estos largos periodos de isquemia le llamaron “Fenómeno de calentamiento cardíaco” (*Warming up*

phenomena) (Jaffe y Quinn, 1980; Sanada y Komuro, 2011; Bliksøen *et al.*, 2017; Quinn *et al.*, 2018; Takano *et al.*, 2019). De esta manera, posteriormente a un episodio de infarto, los ciclos intermitentes de isquemia y reperfusión en el sitio del infarto, limitaban la extensión del daño al mantener la viabilidad del cardiomiocito por medio de la inducción de múltiples mecanismos de acondicionamiento celular que se caracterizan por sostener el metabolismo aerobio y una rápida adaptación a este en favor de la recuperación del ATP (Murry, 1990; Alkhulaifi, 1997; Doul *et al.*, 2019; Yokoyama *et al.*, 2019), además del control de especies oxidantes y de la apertura del mPTP (Wescott *et al.*, 2019), que favorece la disminución de eventos de necrosis y apoptosis, así como el mantenimiento de la estructura celular (Penna, 2012; Wu *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2016; Pagliaro *et al.*, 2018). Entre las complejas tan desconocidas redes moleculares que regulan estos procesos figura la activación de cinasas de salvamento o RISK por sus siglas en inglés, entre las que destacan la cinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2 (Erk1/2) de las

cinastas activadas por mitógenos (MAPK) (Gonzalez *et al.*, 1991; Behrends *et al.*, 2000; Darling *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2017; Harhous *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2019), la vía de Akt dependiente de la cinasa de fosofinositol-3 (PI3K/Akt) (Schwartz y Lagranha, 2006; Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Zaugg *et al.*, 2017) y la proteína cinasa C (PKC) (Ping *et al.*, 1999; Hassouna *et al.*, 2006; D'Annunzio *et al.*, 2016; Polshekan *et al.*, 2016; Diez *et al.*, 2019; Díaz-Ruíz *et al.*, 2019) que coadyuvan en numerosos procesos de supervivencia y crecimiento según el tipo celular donde se encuentren (Hiles *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2003; Yellon y Hausenloy, 2007; Dong *et al.*, 2010; Sanada y Komuro, 2011). Además de la importante participación del maestro antioxidante, el factor de transcripción Nrf2 (Shen *et al.*, 2004; Correa y Zazueta, 2009; Buelna-Chontal y Zazueta, 2013a; Shen *et al.*, 2019; Silva-Palacios *et al.*, 2019).

2.2 Nrf2: EL MAESTRO ANTIOXIDANTE

El factor de transcripción Nrf2 ha sido ampliamente estudiado debido a la importancia de su función en los procesos de detoxificación y mecanismos antioxidantes, así como su papel en equilibrio redox y del metabolismo celular (Venugopal y Jaiswal, 1996; Loboda *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Conocido como el maestro antioxidante debido a la cantidad de componentes de la batería redox que regula su secuencia diana, una región *enhancer* tipo *cis* mejor conocida como Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE)¹. Ubicado generalmente en la región promotora de los genes controlados por Nrf2. Su secuencia consenso en el ser humano se describe generalmente como 5' – A/G TGA C/G NNNGC A/G – 3', donde “N” hace referencia aparentemente a residuos redundantes que, en algunos casos, acompañados de las secuencias que flanquean a este *enhancer*, influyen la activación del ARE, el cual

¹ 5'-TGGGGAACCTGTGCTGAGTCACTGGAG: Secuencia empleada para los ensayos experimentales (Díaz-Ruíz, 2017)

parece variar mucho en la naturaleza (Konigsberg, 2007; Ferro *et al.*, 2015; Lacher *et al.*, 2015; Tebay *et al.*, 2015; Raghunath *et al.*, 2018).

Los ARE están incrustados en varias regiones del genoma permiten la transcripción de genes involucrados en la regulación de la homeostasis redox, activadores citoprotectores durante el EO y detoxificación de xenobióticos mediante la expresión de múltiples enzimas, tanto constitutivas, que incluyen proteínas del metabolismo de los carbohidratos (G6PDH), aquellas involucradas en la cognición, inflamación, el metabolismo del hierro, la regeneración de NADPH, el metabolismo de lipídico, el ensamblaje del proteasoma y la remodelación de tisular, por mencionar algunas, además de y aquellas enzimas que son inducibles e intervienen en la fase II de biotransformación de xenobióticos (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014); la flavoproteína NADPH:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) (Venugopal y Jaiswal, 1996; Wardyn, 2015; Handy y Loscalzo,

2017; Li *et al.*, 2019), así como enzimas de conjugación que pertenecen a la fase II de detoxificación como la subunidad microsomal de la glutatión S-transferasa (MGST1) (Wasserman y Fahl, 1997; Poganik *et al.*, 2019); enzimas pertenecientes al sistema antioxidante basado en glutatión gama-glutamil transferasa 1 (GGT1) (Wang *et al.*, 2007; Abrahams *et al.*, 2019), la subunidad catalítica de la ligasa de glutamato-cisteína (GCLC) (Buelna-Chontal y Zazueta, 2013a; Guo, 2015; Huang, 2015; Shanmugam, 2017), las reductasas (GSR) (Paulsen y Carroll, 2010; Qin y Hou, 2016; Zhang, Yang, *et al.*, 2019) y peroxidasa 2 de glutatión (Gpx2) (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014; Tebay *et al.*, 2015; Ighodaro y Akinloye, 2018); el sistema antioxidante basado en tiorredoxinas (Txn) dentro del cual destacan las peroxirredoxinas 1 y 6 (Prx1/6), la tiorredoxina reductasa 1 (TxnR1) (Hanschmann, 2013; Navarro-Yepes *et al.*, 2014; Zhang, Yang, *et al.*, 2019); componentes del metabolismo del grupo hemo y del hierro entre los que se encuentran reductasas de biliverdina A y B (BLVR) y la hemoxigenasa 1

(HO1) (Chen-Roetling y Regan, 2017; Shaw y Chattopadhyay, 2019).

Nrf2 además es capaz de regular su propia transcripción y la de su proteína reguladora/represora Keap1 (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014; Tebay *et al.*, 2015; Shaw y Chattopadhyay, 2019; Wu *et al.*, 2019). Esta última se encuentra constitutivamente como un homodímero unido a Nrf2 que evita su translocación al núcleo y por lo tanto limita su actividad transcripcional, a su vez tiene un dominio que funciona como adaptador para formar el complejo Cul3-Nrf2-Keap1 que marca para el reconocimiento por ubiquitina ligasa, que en condiciones basales es ubiquitinado para su degradación por el proteasoma 26S (Eggler, 2009; Takaya *et al.*, 2012; Tebay *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2019), sin embargo, en condiciones de EO o electrofílico, Keap1 actúa como sensor al oxidar cisteínas clave (Cys151, Cys273 y Cys288) que facilitan la liberación y fosforilación de Nrf2 (Ser40). (Zhu y Fahl, 2001; Huang, 2002; Sun, 2009a; Baird y Dinkova-

Kostova, 2011; Fão *et al.*, 2019; Zhang, Munoz, *et al.*, 2019). En el núcleo, Nrf2 se dimeriza con proteínas pequeñas Maf (sMaf) y otros reguladores transcripcionales como (CBP/p300) y coactivadores de la maquinaria de transcripción, tales como la helicasa con cromodominio de unión a ADN 1 (CHD6), el receptor asociado al co-activador 3 (RAC3), CBPA y la deacetilasa de histona dependiente de sirtuina 6 (SIRT6) (Tebay *et al.*, 2015; Nam y Keum, 2019; Shaw y Chattopadhyay, 2019) que comprenden complejos mecanismos epigenéticos que involucran la acetilación de residuos de lisina en dominios clave de Nrf2 que tienen por fin regular la actividad transcripcional aumentando, por ejemplo la afinidad de Nrf2 a la secuencia ARE o bien reteniéndolo en el núcleo, (Sun, 2009b; Kawai, 2011; Magesh, 2012; Chen, 2014), tal mecanismo en condiciones fisiológicas se esquematiza en la *Figura 4*.

La regulación de Nrf2 también es dependiente de la fosforilación en Ser40 que permite su liberación de Keap1,

favorece su estabilidad y acumulación nuclear. Estas modificaciones dependen de diferentes cinasas (Ping *et al.*, 1999; Zhang y Hannink, 2003; Jaiswal, 2004; Eggler, 2009 p. 2; Sun, 2009a p. 2; Magesh, 2012; Fão *et al.*, 2019). Ha llamado la atención como potenciales activadores de Nrf2 la familia de las MAPK como Erk1/2 p38 y JNK, PKC y la vía de PI3k/Akt (Huang, 2002; Shen *et al.*, 2004; Li y Kong, 2009; Jin, 2012; Bucolo *et al.*, 2019; Subedi *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2019). Por esto Nrf2 es un buen blanco para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, y requiere de más estudios en relación con su regulación por inductores, directos e indirectos.

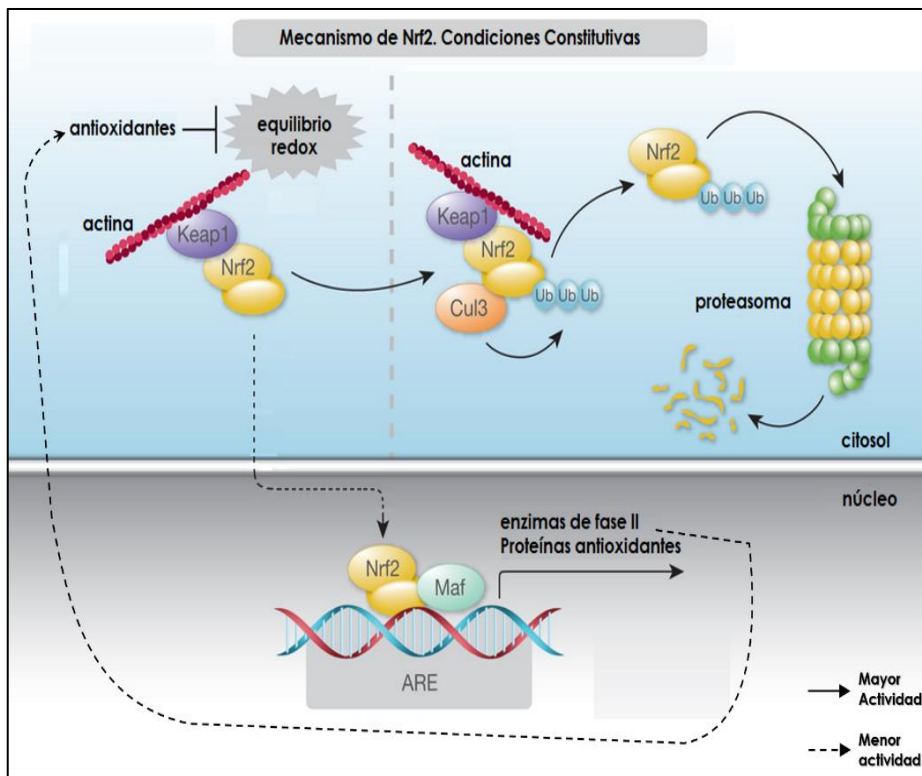


Figura 4. Mecanismo de regulación constitutivo de Nrf2. Bajo condiciones fisiológicas, el dímero Keap1 asociado a actina mantiene anclado al factor de transcripción Nrf2, cuya estabilidad está determinada por ubiquitinación, proceso coordinado por la interacción con Keap que sirve como adaptador del complejo E3-Cul3-ubiquitina ligasa, que marca a Nrf2 para ser degradado por el proteosoma 26S (flecha continua), mientras que, en menor medida, el factor de transcripción es translocado al núcleo donde interactúa con proteínas Maf pequeñas y otros coactivadores para promover la transcripción de genes de los ARE cuyos productos proteicos mantendrán el equilibrio redox en la célula y regularán algunos procesos del metabolismo (flecha punteada) (Modificado de : Chen-Roetling y Regan, 2017).

2.3 PROTECCIÓN MEDIADA POR Erk1/2

Perteneciente a la super familia de las MAPKs y siendo parte de las 400 cinasas más activas en las actividades biológicas, Erk1/2 también conocida como p42/p44 han sido estudiadas por largos años en el contexto de la cascada de señalización integrada por Ras–Raf–MEK–ERK (Gonzalez *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2019). Una vía involucrada en varios procesos de supervivencia y proliferación celular, crecimiento y envejecimiento, inclusive apoptosis y mecanismos anti proliferativos. ERK ejerce su función biológica fosforilando residuos serina/treonina en un entramado complejo de mecanismos de regulación. Bajo el efecto múltiples estímulos que incluye especies reactivas de oxígeno, factores de crecimiento, controlados por compartimentos citosólicos y nucleares (Ikeda *et al.*, 2006; Mebratu y Tesfaigzi, 2009; Buscà, 2016). En relación a la célula cardíaca y el daño por IR se han hallado resultados discordantes, demostrando que su activación sostenida es característica de la fisiopatología del daño por IR y una fosforilación persistente está relacionada

con la abundante producción de ROS (Ping *et al.*, 1999; Behrends *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2019). Por otro lado se ha *visto* que la falta de la cinasa o su baja actividad es coherente con la descompensación y falla cardíacas, además de la activación de procesos apoptóticos ligados al estrés (Purcell *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2016; Missinato *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019) y que la activación de mecanismos que involucran a Erk relacionados con cardioprotección pueden ser estimulados por múltiples señales como opioides endógenos, como ocurre en el pre-acondicionamiento, en cuya etapa inicial los receptores de opioides, bradiquinina y adenosina se activan para desencadenar PKC y sensibilizar el receptor de adenosina A2b (A2bAR) que promueve la activación de la vía de supervivencia que involucra la PI3K, Akt y ERK, responsables de la inhibición de mPTP (Cohen *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010). Otros activadores de la señal de Erk son el estrés celular e inductores de la vía Ras como factores de crecimiento que están asociados a estrategias

cardioprotectoras que requieren necesariamente de una señal transitoria de cinasas de salvamento (PI3K, Akt y ERK) para ejercer su protección a corto plazo (Gupta, 2007; Tanaka, 2014; Gartz *et al.*, 2018). Estrategias como el iPostC activan a Erk1/2 durante episodios cortos de isquemia/reperfusión y en la reperfusión temprana. Dirigiendo su actividad hacia blancos involucrados en la preservación de la función mitocondrial y la prevención de procesos apoptóticos mediante la inactivación de factores pro-apoptóticos, la inhibición de la apertura del mPTP y la apertura de los canales mitoK_{ATP} que traen efectos benéficos al mejorar la síntesis de ATP previniendo la contracción de la matriz mitocondrial (Cohen *et al.*, 2001; Hausenloy, 2004; Fang, 2008; Yao y Li, 2009, 2010; Yang *et al.*, 2010; Zhao, 2010; Sun *et al.*, 2019). Por lo anterior, estos ínfimos eventos controlados espacio-temporalmente requieren minuciosos estudios para poder comprender cómo regula la célula, por medio de qué moléculas y de qué señales dependen estrategias como el iPostC (Weinbrenner, 1997; Strohm, 2000; Darling *et al.*,

2005; Kitakaze, 2010; Sanada y Komuro, 2011) Ya que hasta el momento se desconoce si estas señales de sobrevivencia/muerte ocurren simultáneamente en iPostC o cómo forman parte de la delicada coordinación de eventos que promueve el iPostC y limita el tamaño de infarto. Algunos de los mecanismos ya caracterizados que se observan en esta estrategia cardioprotectora son esquematizados en la *Figura 5*.

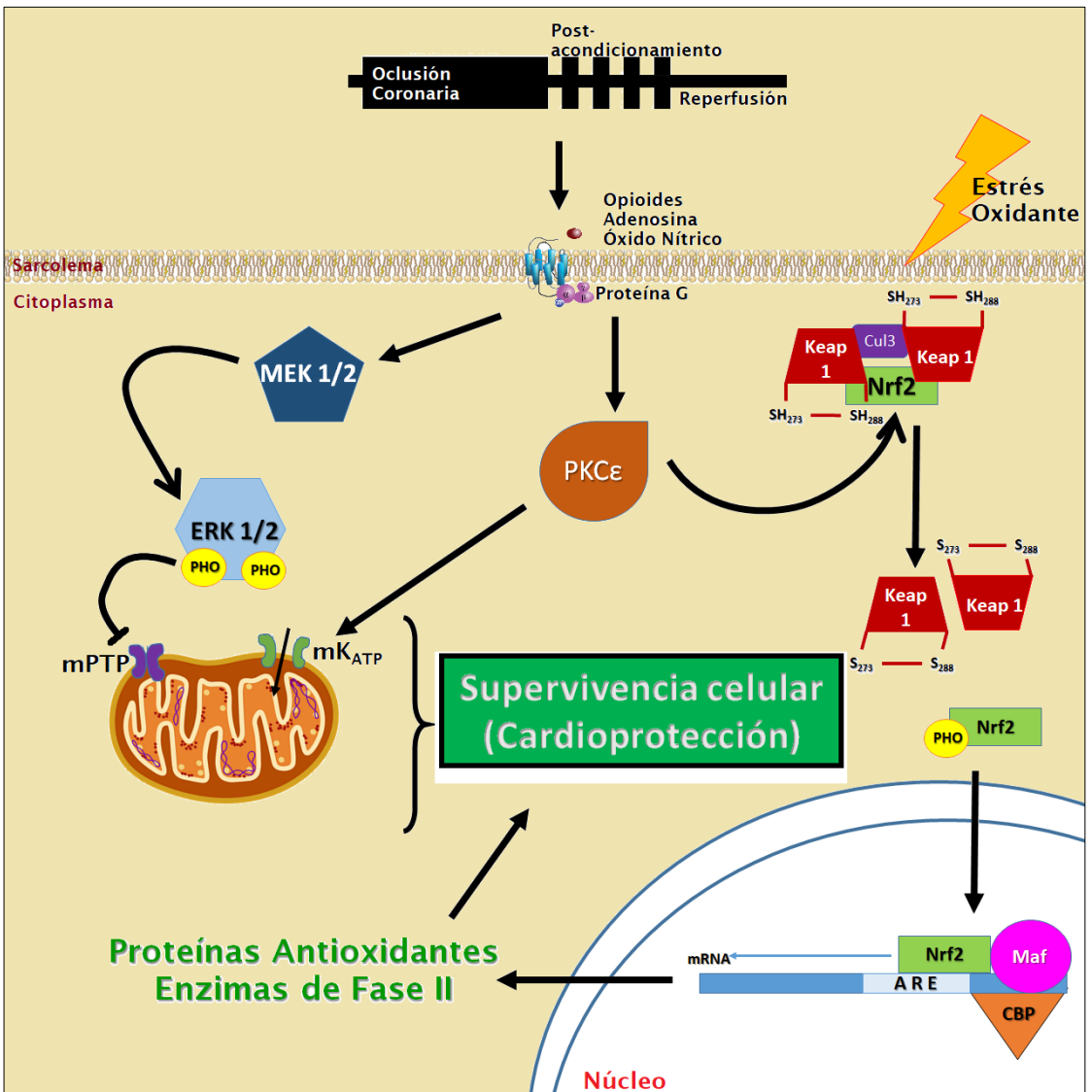


Figura 5. Resumen del mecanismo cardioprotector que desencadena el post-acondicionamiento. Se esquematizan los inductores que hasta ahora se conocen, desencadenan el efecto cardioprotector que imita la activación del GPCR y la activación río debajo de la vía RISK cuyos efectores (Erk1/2) evitan la apertura del mPTP y promueven la reactivación de los canales mK_{ATP} (PKC), a su vez se activa el mecanismo de Nrf2 por las especies reactivas de oxígeno y la fosforilación mediada por PKCε, eventos que en conjunto restauran el pH, la homeostasis del Ca²⁺ y evitan el daño por EO, ayudando a proteger el miocardio isquémico.

CAPÍTULO 3. SEÑALIZACIÓN REDOX

Como se ha mencionado, existe un coordinado balance en condiciones fisiológicas dado por el uso del oxígeno y los sistemas antioxidantes que procuran mantener, activar y regular. De esta manera, el descontrol en el aporte y la supresión de ROS durante la reperfusión genera el EO y el daño característico de las heridas post-infarto. Este equilibrio redox es dinámico y oscila entre la presencia de especies oxidantes producidas de forma natural en el metabolismo aerobio de la célula y las enzimas o moléculas antioxidantes que las regulan (Bajic *et al.*, 2019; Díaz-Ruíz *et al.*, 2019; Meijles *et al.*, 2019). Estudios que datan de no más de dos décadas establecen que dicho equilibrio redox es fundamental para la coordinación de muchos procesos celulares como la regulación de la expresión génica y señalización celular que también incluyen de manera importante las funciones cardiovasculares (Boengler *et al.*, 2017; Santillo y Pagliaro, 2018).

La señal redox se transmite a través de reacciones de oxidoreducción que ocurren post-transcripcionalmente sobre residuos de cisteínas reactivas (pKa 4-5). Estas modificaciones pueden promover cambios en la actividad de la proteína, en su estabilidad, conformación y/o capacidad de interactuar con otras moléculas, (Knock y Ward, 2011; Burgoyne, 2012; Corcoran y Cotter, 2013; Umbreen *et al.*, 2019). Debido a la fácil difusión y la modulación que estas ejercen, la señalización ocurre de manera controlada al estar estrechamente relacionada con la localización de la maquinaria enzimática que produce/regula las ROS con la proximidad sus blancos proteicos sobre los que ejercen su función.

3.1 El Peróxido de Hidrógeno

Las especies capaces de ejercer señalización redox incluyen al GSH, en un proceso conocido como glutationilación que se lleva a cabo enzimáticamente. También se incluyen especies derivadas del NO que pueden reaccionar con cisteínas y

además tirosinas. Y aquellas que son productos del uso metabólico del oxígeno y reducción del agua, entre las que destaca el H_2O_2 , la ROS más abundante en sistemas vivos (10^{-7} M) (Paulsen y Carroll, 2010; Halliwell y Gutteridge, 2015; Santillo y Pagliaro, 2018; Singh, Kukreti, *et al.*, 2019).

El H_2O_2 se forma como un subproducto de la dismutación espontánea de $\text{O}_2^{\bullet-}$, mismo proceso que cataliza enzimáticamente la SOD, también producido a partir de la actividad de oxidasas o del radical $\text{HO}\bullet$ (Deutsch, 1998; Rhee *et al.*, 2005; Ighodaro y Akinloye, 2018). Hasta hace poco se creía que, al igual que otras ROS más reactivas, el H_2O_2 era perjudicial para la mayoría de los componentes y estructuras celulares. Sin embargo, se ha estudiado mucho en el contexto de la señalización redox, ya que bajo ciertas condiciones sus propiedades químicas se ajustan perfectamente a algunos criterios que hacen de esta molécula un buen segundo mensajero (Burgoyne, 2012; Corcoran y Cotter, 2013; Sies, 2017; Umbreen *et al.*, 2019):

1. *Estabilidad:* En los sistemas biológicos el H_2O_2 es un oxidante estable y reacciona suavemente con los centro de hierro-azufre de las proteínas, (Hancock y Whiteman, 2018; Kagan, 2018) se une a moderadamente a los metales, muy débilmente al GSH, a residuos de cisteína y metionina libres (Winterbourn, 2015; Ighodaro y Akinloye, 2018).
2. *Reactividad/Selectividad:* La reactividad del H_2O_2 hacia los residuos de Cys puede verse significativamente incrementada dependiendo del ambiente donde se encuentra la proteína, (Chao *et al.*, 1997; Stadtman y Levine, 2003; Sies, 2017). Para que las proteínas puedan interactuar de manera controlada con mensajeros reactivos, es necesario que estos últimos no se produzcan en cantidades elevadas (EO) y que la topología de la proteína permita que sus cisteínas redox sensibles mantengan sus tioles desprotonados (anión tiolato) a pH fisiológico, haciendo a estos

residuos más electrofílicos. Otra forma de selectividad está relacionada con la co-localización de la proteína redox-sensible y la fuente de ROS.(Collins *et al.*, 2012; Corcoran y Cotter, 2013; Sies, 2019)

3. *Difusibilidad*: la difusión de H₂O₂ puede ser modulada por los cambios en la permeabilidad de la membrana o por el transporte mediado por acuaporinas (Burgoyne, 2012; Sies, 2017, 2019)
4. *Reversibilidad*: las modificaciones redox controlan la actividad de una proteína sin interferir en su estructura terciaria o cuaternaria debido al carácter reversible de las oxidaciones que ocurren en los tiolatos, llamada sulfenilación. La oxidación de estos produce ácido sulfénico que eventualmente puede reaccionar con equivalentes reductores de tioles vecinos como GSH y cisteínas para producir puentes disulfuro antes de ser reciclado a su estado previo por enzimas como las tiorredoxinas. Cabe mencionar que los sulfenatos

formados pueden seguir oxidándose a ácido sulfinico y posteriormente ácido sulfónico, eventos considerados dañinos para la proteína.(Sivaramakrishnan, 2010; Burgoyne, 2012; Abo y Weerapana, 2019; Imber *et al.*, 2019).

3.2 Estrés Reductor

Partiendo del hecho que diversos procesos celulares dependen de un balance entre las especies oxidantes y la actividad coordinada de moléculas antioxidantes, es de esperar que la disrupción de este equilibrio redox hacia un predominio de ROS provoque un efecto dañino sobre cada biomolécula cuyos efectos son característicos de sinnúmero de patologías (EO); de la misma forma un excedente antioxidante lleva a la célula a un estado pro-reductor que altera negativamente aquellos procesos que dependen de la presencia de oxidantes *específicos* para ejercer su efecto biológico (ER) (Rajasekaran *et al.*, 2007; Handy y Loscalzo, 2017; Xiao y Loscalzo, 2019).

Si bien pruebas en investigación básica y medicina traslacional con antioxidantes como vitamina D, cianidina, camazuleno y melatonina han demostrado ser útiles para tratar alteraciones relacionadas con desbalances en la homeostasis redox, como la hipertensión arterial, la hiperglicemia y el daño por I/R (Jiki, 2018; Mastantuono *et al.*, 2018; Querio *et al.*, 2018; Sorriento, 2018; Xiao y Loscalzo, 2019), presentan resultados variables que dependen estrechamente de comorbilidades y diversos escenarios, que incluso en condiciones fisiológicas normales o en individuos saludables han tenido efectos desalentadores, hecho del cual parten numerosos estudios sobre el papel del ER en la enfermedad cardiaca y su relación con el equilibrio redox (Gao *et al.*, 2019; Peris *et al.*, 2019; Soorappan *et al.*, 2019).

Así, un estado redox descompensado por el aumento de antioxidantes pueden anular el efecto protector de maniobras como el iPostC que tienen por finalidad modular un estado de supervivencia celular a través del mantenimiento de este

tono redox y además pueden agravar el daño por reperfusión. (Danielisová, 2006, 2008; Penna, 2009, 2011; Narasimhan y Rajasekaran, 2015; Soorappan *et al.*, 2019). Un desequilibrio en el estado redox puede verse inducido por componentes de la dieta, causado por patologías secundarias o terapias que funcionan exacerbando el sistema antioxidante endógeno (Pérez-Torres *et al.*, 2017; Cheng, 2019; Henkel *et al.*, 2019; Peris *et al.*, 2019). Otros eventos que están relacionados con la alteración del equilibrio redox hacia un ER incluyen daño a lípidos, citotoxicidad, agregación de proteínas y lesión isquémica cardiaca (Narasimhan y Rajasekaran, 2015; Valls *et al.*, 2016; Bajic *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2019; Soorappan *et al.*, 2019). En relación con la célula cardiaca se ha visto que un desbalance del ratio GSH/GSSG, relacionado con la sobreexpresión de proteínas de choque térmico (Hsp), produce cardiomiopatía (Zhang *et al.*, 2010; Handy y Loscalzo, 2017; Sairam *et al.*, 2017) o promueve el desarrollo aterosclerótico en pacientes con diabetes tipo II (Gumieniczek, 2005; Callegari *et al.*, 2011; Xiao y Loscalzo,

2019); el desbalance redox también puede producirse por aumento de otros equivalentes reductores como NADPH o la activación sostenida del factor Nrf2 que son capaces de inducir hipertrofia cardíaca y distrofia muscular, posiblemente debido a la agregación de proteínas (Pimentel *et al.*, 2006; Rajasekaran *et al.*, 2007; Handy y Loscalzo, 2017; Shanmugam, 2017).

Poco se sabe acerca de cómo las especies óxido/reductoras coordinan diferentes eventos de señalización en condiciones normales y patológicas, además se ignoran muchos de los mecanismos que subyacen al efecto protector del iPostC que aún no han sido trazados en relación a la señalización mediada por estas especies, sin embargo se sabe que las ROS están relacionadas con el inicio y la modulación de esta respuesta cardioprotectora del iPostC y que pueden incidir sobre procesos que coordinan la biogénesis mitocondrial o la modulación del equilibrio redox a través de la activación de factores de transcripción como Nrf2 que regulan el balance

entre las especies oxidantes y reductoras. así como la disminución en la transcripción de proteínas proinflamatorias reguladas por NFkB (Penna, 2006; Cohen, 2008; Penna, 2012; Buelna-Chontal y Zazueta, 2013a) de igual manera, incide en la preservación de la función mitocondrial inducida por la acción de muchas cinasas relacionadas con la activación redox (Chen *et al.*, 2007; Burgoyne, 2012; Mishina *et al.*, 2013)

III. ANTECEDENTES

En el contexto de la señalización redox se han planteado numerosos estudios que establecen la participación de especies oxidantes como desencadenantes de respuestas fisiológicas, dichas especies existen en un coordinado sistema que depende de la cinética y termodinámica de la transferencia de electrones pertenecientes a diferentes electrófilos, de la misma forma esta señalización recae en las fuentes biológicas de ROS, la cantidad de su producción, la localización subcelular donde estas existan y las proteínas/enzimas con las que son capaces de interactuar teniendo en cuenta los atributos antes, así como el estado de las defensas antioxidantes en un momento dado (Laurindo, 2018).

Debido a la cantidad de procesos fisiológicos y patológicos en los que están implicadas, los hidroperóxidos, particularmente H₂O₂ y otros electrófilos, son las especies

características de este tipo de señalización (Sies, 2017; Hancock y Whiteman, 2018). Como se ha mencionado, los blancos de la señal desencadenada son cisteínas con protones como buenos grupos salientes, de manera similar a ciertos componentes del sistema antioxidante endógeno como las cisteínas o selenocisteínas de peroxidasas, el estudio de los mecanismos de señalización redox se vuelve esencial en patologías cuya etiología presenta un estrés oxidante característico y significativo como el IAM, donde la disfunción mitocondrial y endotelial promueve el desacoplamiento de sistemas redox-dependientes entre los que figuran la CTE y las sintasas de óxido nítrico (Lee y Griending, 2008; Forman *et al.*, 2014). Poco se sabe, sin embargo, de la implicación de la señalización redox en los escenarios clave donde mecanismos cardioprotectores tienen como blanco el mantenimiento del balance de ROS y la preservación de la función de los sistemas antioxidantes como ocurre con el iPostC. Entre estos mecanismos se han descrito componentes moleculares que se activan en

maniobras como el pre- y el post- acondicionamiento y que se sabe, versan sobre el mantenimiento del sistema antioxidante como en el caso de Nrf2 (Buelna-Chontal y Zazueta, 2013a; Shen *et al.*, 2019), así como vías de señalización como la del factor de transcripción HIF que en condiciones de hipoxia puede migrar al núcleo e iniciar la transcripción de genes para la angiogénesis, producción de células sanguíneas y para el metabolismo energético, y que si bien no depende necesariamente de ROS su activación involucra numerosas reacciones redox, así como enzimas generadores de ROS (Cadenas, 2018).

Hay enzimas que están involucradas en la cardioprotección y que canónicamente están involucradas en vías de señalización activadas por reacciones redox como los receptores de tirosina.-quinasas en la vía RAS-Raf-MAPK, y Erk, como otros miembros de la vía RISK son moléculas de señalización redox sensibles, importantes para procesos como la remodelación y mantenimiento del musculo liso vascular (Lee

y Griendling, 2008). En el contexto de la lesión por IR hay numerosos estudios que han relacionado la fosforilación de Erk y otras cinasas de la vía RISK con la cardioprotección (Schwartz y Lagranha, 2006; Braunersreuther *et al.*, 2013) incluso estudios donde se ha visto que H₂S, un inductor de Nrf2 ejerce cardioprotección en un escenario dependiente de Erk (Peake *et al.*, 2013), de igual forma se ha correlacionado la activación de MAPK y el aumento de Erk fosforilada con la acumulación nuclear de Nrf2 en células H9c2 (Chiu *et al.*, 2011). Otros mecanismos redox subyacentes se han estudiado en el preC e incluyen la apertura de los canales mitoK_{ATP} que inducen la generación controlada de ROS por la mitocondria e inhiben la apertura del mPTP a través de la activación de PKC y Erk (Cohen *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010). A propósito de estos mecanismos se ha visto que la inhibición, ya sea de ROS o de los mitoK_{ATP} inhibe la protección por preC por lo que una neutralización unilateral y no específica de ROS por antioxidantes podría ser ineficiente o poco adecuada para mejorar una señal redox alterada en condiciones de estrés

oxidante (Kalogeris *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2018), sin embargo, no se ha profundizado en cómo y a que niveles las ROS influyen en estos u otros mecanismos, pero dejando evidencia suficiente para especular sobre la existencia de un equilibrio u homeostasis redox que deba conservarse al ejercer ciertas terapias, modificar o dirigir algún blanco terapéutico.

Gracias a estos estudios se puede aludir cierta ubicuidad en lo referente a los sitios y vías de señalización donde las ROS ejercen una señalización de tipo redox. Sin embargo aún se desconocen muchos aspectos de esa señalización en situaciones patológicas y al emplear terapias como el iPostC, existiendo pocos estudios que expliquen a qué niveles actúan las ROS en la activación de cascadas de señalización particulares, también se desconoce si estas realizan más bien funciones reguladoras o activadoras, o si están implicadas ya sea en una maquinaria redox-sensible que tenga por fin actuar frente al estrés oxidante coordinando acciones con el sistema

antioxidante, o bien pertenecen a otra jerarquía de funciones relacionadas con mantenimiento del metabolismo, supresión de mecanismos de muerte celular, mantenimiento del tono vascular, manejo de oxígeno, etc,

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien el iPostC es hasta el momento una de las técnicas que mejor resultados presenta para tratar la lesión por IR. No obstante, su efectividad presenta resultados ambiguos cuando se práctica en presencia de comorbilidades metabólicas, reincidencias o terapias que toman en cuenta las condiciones antes descritas o efectos adversos cuyos mecanismos aún no han sido completamente descritos. Debido a lo anterior, resulta necesario estudiar la activación de aquellas vías de señalización que desencadena el iPostC, así como aquellos eventos fisiológicos de los que depende su activación, con la finalidad de localizar adecuados blancos terapéuticos que puedan emplearse para el desarrollo y perfeccionamiento de estrategias que logren salvaguardar la viabilidad del cardiomiocito ante el daño por IR. El mecanismo en que se fundamenta el siguiente estudio es la señalización redox, crucial para la regulación/activación de múltiples sustratos proteicos necesarios para establecer protección por iPostC y

que no se han estudiado a profundidad. Interrumpiendo la señal redox con ácido ascórbico, nos planteamos generar un ambiente celular pro-reductor que nos permitirá estudiar si la activación de la cinasa Erk1/2 depende de la señalización mediada por el H_2O_2 presente durante la reperfusión del miocardio, para ejercer protección celular. Así mismo determinar si la cinasa es capaz de ejercer su función sobre la activación del factor de transcripción Nrf2, a fin de establecer si la homeostasis redox –que requiere el iPostC para llevar a cabo su protección– coordina los eventos de cardioprotección a través de la activación de esta cinasa.

V. HIPÓTESIS

Si el H_2O_2 promueve señalización redox, podría mediar la respuesta citoprotectora asociada al iPostC, a través de la activación redox-dependiente de cinasas como Erk1/2. De esta manera, en condiciones de estrés reductor se suprimirá el efecto del iPostC bloqueando la protección del miocardio y la activación de Erk1/2. De igual manera, al inhibir farmacológicamente a la cinasa Erk1/2 determinaremos su papel en la activación río abajo de Nrf2. Lo anterior pondría de manifiesto la importancia de mantener un equilibrio redox en la protección a través del iPostC

VI. OBJETIVO GENERAL

Investigar la importancia del equilibrio redox y la señal mediada por ROS en la cardioprotección brindada por el iPostC en corazones reperfundidos de ratas Wistar sanas, evaluando si la cinasa Erk1/2 es dependiente de la señal redox. Determinar si esta cinasa puede influir en la actividad del factor de transcripción Nrf2.

6.1 Objetivos particulares.

- ✓ Determinar la importancia del H₂O₂ para la activación de la cardioprotección en corazones post-acondicionados.
- ✓ Estudiar la dependencia de la activación de la señalización de supervivencia por el estado redox, con enfoque en Erk1/2 en corazones.
- ✓ Evaluar si Erk1/2 puede mediar la activación río abajo de Nrf2.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Protocolo experimental en un modelo *in vivo*

Para el protocolo experimental se empleó un modelo *in vivo* sometido a isquemia y reperfusión. Las cirugías fueron practicadas en ratas Wistar macho de 300 g que se anestesiaron con pentobarbital de sodio (1U/100 g *i.p.*) y heparina (1.7 U/Kg *i.p.*). Se valoró la relajación muscular y pérdida de conciencia con la falta de respuesta al estímulo de presión/dolor según el reflejo de retracción de las extremidades. Las ratas fueron ventiladas de manera artificial con ayuda de una cánula endotraqueal adaptada a un ventilador para pequeñas especies (*Harvard Apparatus 683*). Posteriormente se llevó a cabo una toracotomía en la pared costal izquierda para exponer el corazón y las ramas del árbol coronario, específicamente rama principal de la arteria coronaria izquierda (RPACI) que fue ocluida (en IR y iPostC) desde su nacimiento en la rama posterior del ventrículo izquierdo con un nudo hecho de hilos de seda

para sutura 6-0. Al final de la isquemia el nudo fue liberado para reperfundir el tejido (Pavón *et al.*, 2012).

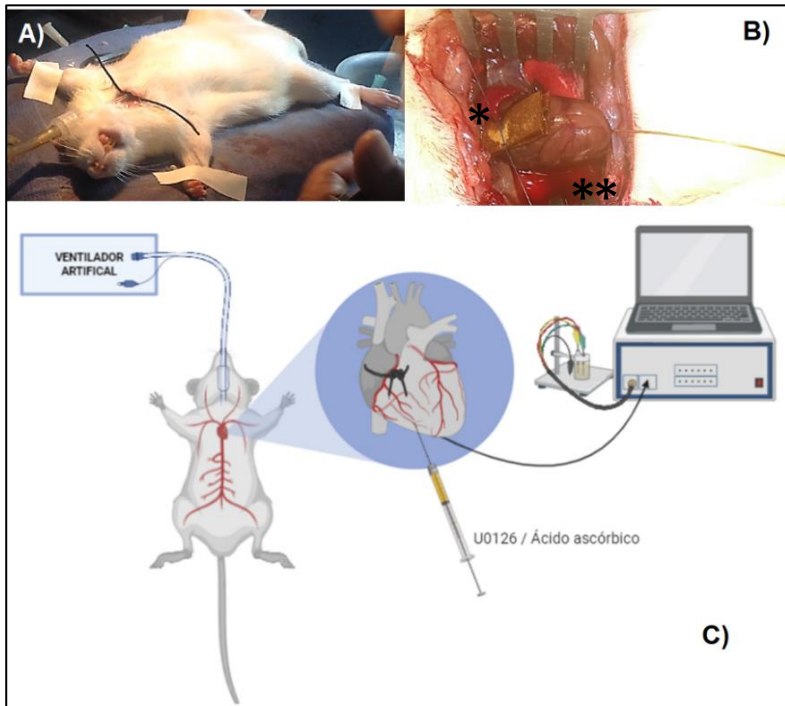
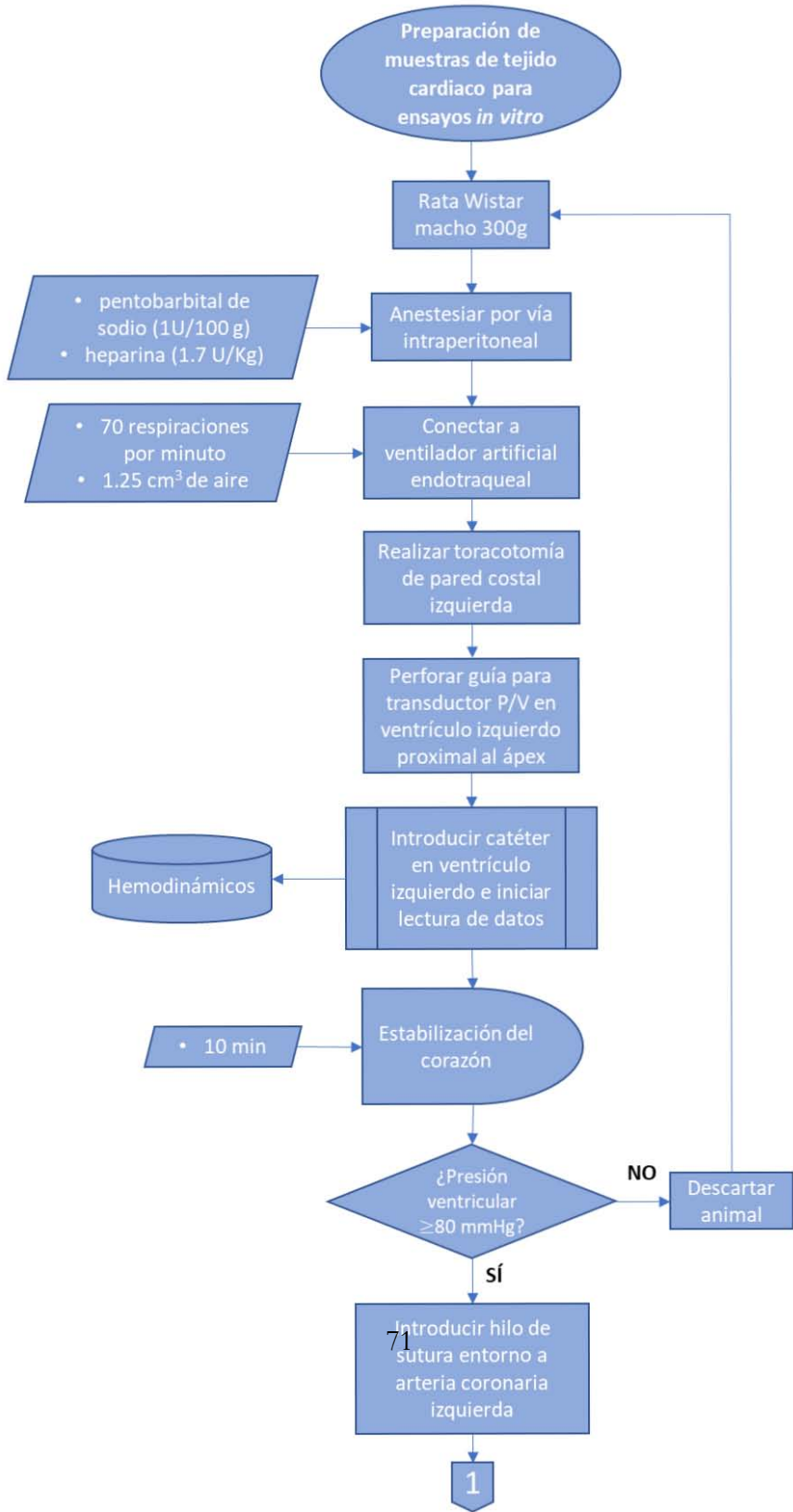


Figura 6. Montaje de instrumental y modelo animal para protocolo de cirugía. **A)** Tras ser anestesiada, la rata se coloca bocarriba sobre una mesa de cirugía, se fijan las extremidades y se realizan la toracotomía con la posterior canalización endotraqueal hacia un ventilador artificial. Posteriormente se practica la toracotomía lateral izquierda para exponer la pared del ventrículo izquierdo. **B)** Nótese la palidez característica de la pared del ventrículo izquierdo (*) y la cianosis en las aurículas durante la isquemia, tras la irrupción de riego sanguíneo provocada por el nudo sobre la rama principal de la arteria coronaria izquierda (**). **C)** Esquema general del montaje para el protocolo de cirugía, nudo en RPACI, administración de inhibidor/antioxidante a la izquierda el ventilador y a la derecha el catéter de presión-volumen conectado al software de registro hemodinámico.

Las mediciones de hemodinamia del órgano fueron monitoreadas a lo largo de la maniobra gracias a un catéter de presión-volumen (Mikro-Tip; Millar) colocado en la cavidad del ventrículo izquierdo. La función cardiaca se evaluó con el paquete PVAN Ultra software (Millar, Houston, Tx, USA) que generó una tabla hemodinámica. Todos los animales pasaron por una estabilización de 10 min. El montaje del modelo experimental el instrumental de cirugía, así como algunos atributos de utilidad técnica se esquematizan en la *Figura 6* y *Figura 7*, respectivamente.

En el primer grupo “*sham* (S)”, se llevó a cabo una oclusión simulada en la RPACI; atravesando el hilo de sutura bajo la arteria después de 10 min de estabilización sin realizar la oclusión. A continuación, se dejó de esa manera durante el resto del protocolo (S₁₀ o S₆₀ min) sin ninguna otra intervención. En el grupo sometido a IR se ocluyó la RPACI por 5 min según lo descrito por otros grupos (Manning *et al.*, 1984; García-Rivas *et al.*, 2006; Granfeldt *et al.*, 2009; Bøtker

et al., 2018; Díaz-Ruíz *et al.*, 2019). La isquemia pudo comprobarse visualmente por la rápida aparición de una zona pálida en la pared del ventrículo, luego de la cual, se liberó el nudo que provocó la interrupción del flujo arterial para reanudar la perfusión durante 10 y 60 min (IR₁₀; IR₆₀, respectivamente). El cambio de cianosis a hiperemia causa un oscurecimiento de la pared ventricular y la aurícula izquierda sufre una considerable dilatación debido a la restauración del flujo sanguíneo, además se registran arritmias ventriculares cuyos datos son registrados por el catéter en el ventrículo izquierdo. En el grupo con iPostC se practicó un restablecimiento intermitente del flujo coronario en 3 ciclos de reperfusión/re-oclusión de 10 segundos cada uno, que inician después de la isquemia y son anteriores a la reperfusión de 10 y 60 min (IR₁₀+PostC; IR₆₀+PostC). Para evaluar el efecto del H₂O₂ se indujo un modelo agudo de ER con ácido ascórbico (+asc) 100 mg/Kg de peso corporal que fue aplicado después de 3 min de la oclusión de la RPACI directamente en la pared del ventrículo izquierdo.



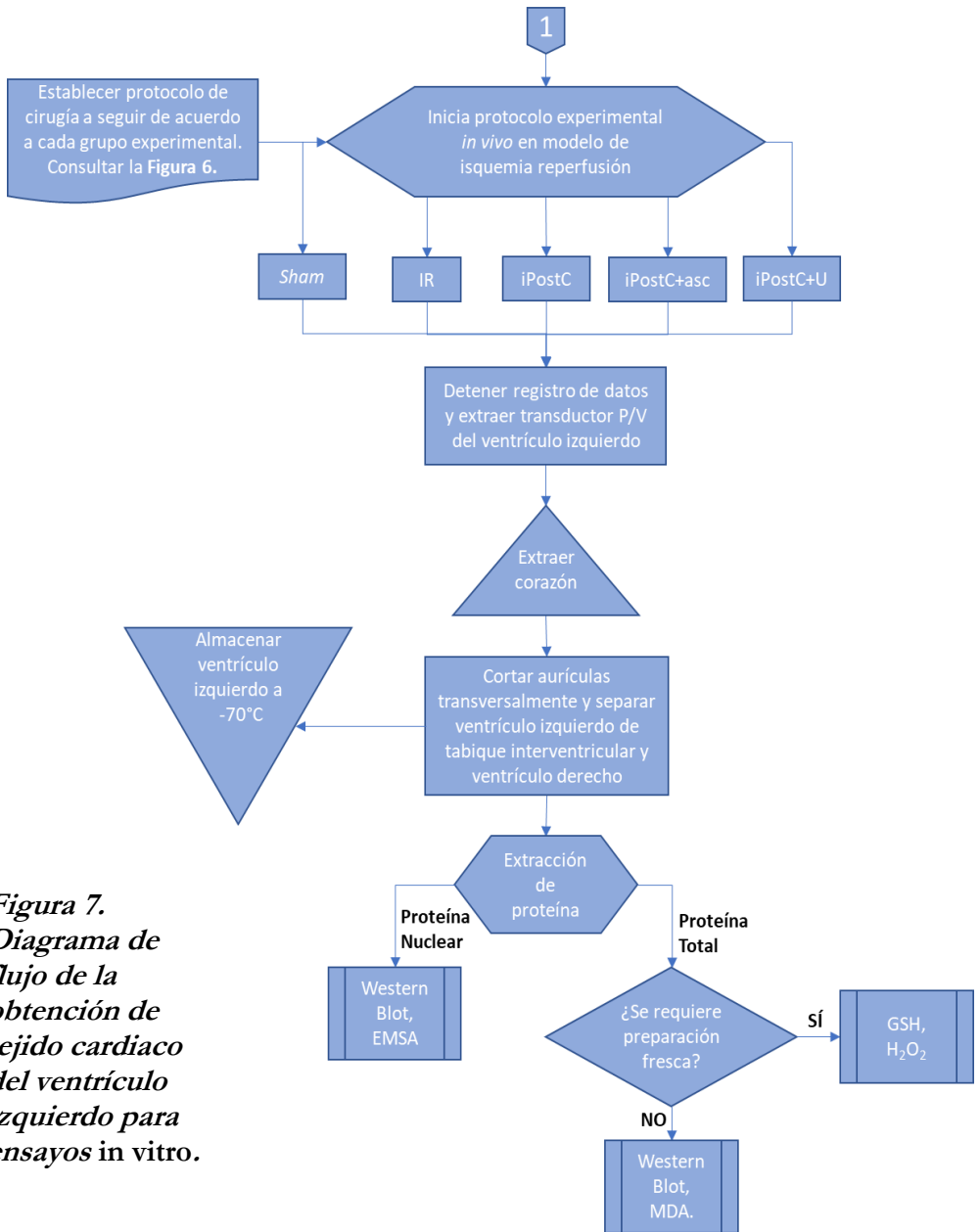
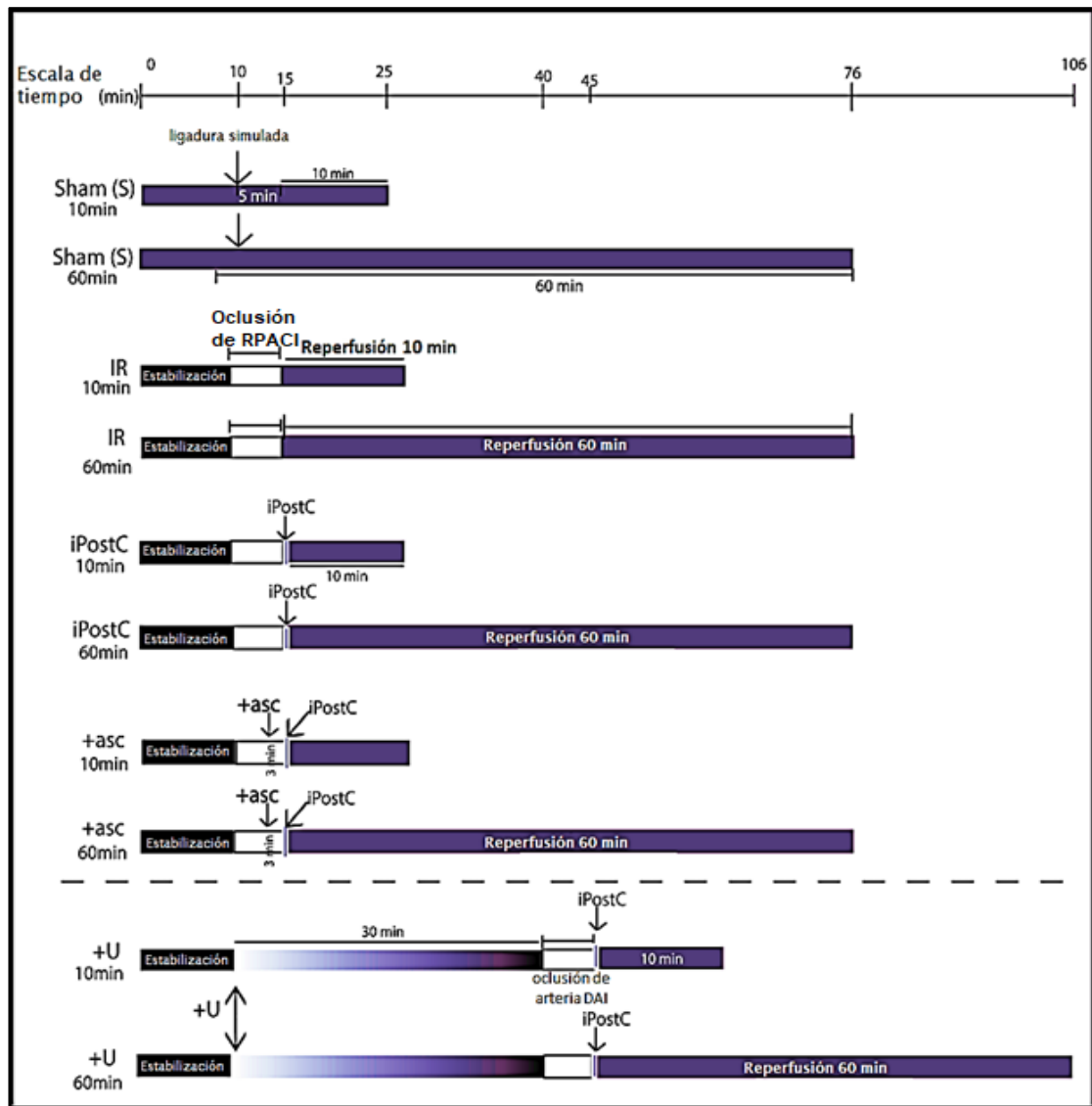


Figura 7.
Diagrama de
flujo de la
obtención de
tejido cardiaco
del ventrículo
izquierdo para
ensayos in vitro.

Para evaluar la actividad de las cinasas MEK1/2 y Erk1/2 se aplicó el inhibidor selectivo U0126 en una dosis de 1.27 mg/Kg de peso corporal, para este grupo (+U) el protocolo consistió en una estabilización por 10 min y posterior inyección del inhibidor directamente en la pared muscular del ventrículo, después de 30 min de su administración, los corazones se ocluyeron como se detalló antes. Ambos tratamientos se realizaron en la pared del ventrículo en una sola administración y fueron sometidos a iPostC con una reperusión final de 10 o 60 min (+asc₁₀, +asc₆₀; +U₁₀, +U₆₀). Los protocolos de IR, iPostC y la administración de asc (+asc) e inhibidor (+U) son señalados en la *Figura 8*.

Al finalizar cada protocolo se recolectaron rápidamente los corazones y se obtuvieron los ventrículos izquierdos que fueron congelados de inmediato en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C para los posteriores ensayos. Después de esto, los ventrículos izquierdos fueron pulverizados en mortero con pistilo, ambos pre enfriados durante toda la

Figura 8. Protocolo experimental. Se estabilizaron los grupos experimentales durante 10 min (barras negras). En el grupo sham, la flecha indica una oclusión simulada. La isquemia provocada por la oclusión de la rama principal de la arteria coronaria izquierda (RPACI) por 5 min está representada seguida por 10 o 60 min de reperusión está representada por una barra blanca. Los grupos IR₁₀ e IR₆₀ fueron sometidos solamente a la isquemia, mientras que los grupos iPostC₁₀ (IR₁₀+PostC) y iPostC₆₀ (IR₆₀+PostC) se les aplicó la maniobra del post-acondicionamiento (3 ciclos de reperusión/reclusión de 10 segundos cada uno, seguido de un periodo de isquemia de 5 min). Los siguientes grupos incluyen +asc (iPostC+asc) y +U (iPostC +U), todos ellos sometidos al protocolo de post-acondionamiento tras su administración. La flecha mostrada en los grupos tratados: +asc y +U representa el momento exacto en el que se administraron el AOX y el inhibidor, respectivamente. Terminado cada protocolo se recolectó el corazón y se seccionó el ventrículo izquierdo para ensayos subsecuentes.



maceración del tejido, según la técnica basada en un procedimiento de homogeneización optimizado por Kuster *et al.*, 2011. Una vez pulverizado se colocó en amortiguador salino de fosfatos de Dulbecco (DPBS) (2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, 136.9 mmol/L NaCl y 8.9 mmol/L Na₂HPO₄•7H₂O, 1% NP-40 y cóctel inhibidor de proteasas) la mezcla fue homogenizada y a partir de entonces se centrifugó a 4000 g/4°C durante 15 min para la recolección del sobrenadante (extracto de proteína total).

7.2 Contenido de GSH

Se utilizó 1 mM de monoclorobimano (mCB) para formar un aducto fluorescente estable con GSH en presencia de glutatión S-transferasa (1 U/mL), el ensayo se realizó como describe Fernández-Checa y Kaplowitz 1990, en una mezcla que contiene amortiguador *Krebs-Henseleit*, pH 7.4, mCB 1mM, GST 1U/mL y los homogenados del ventrículo izquierdo, incubados a 37 °C durante 30 min. Finalmente, los cambios en la fluorescencia fueron medidos a una longitud de

onda de excitación de 385 nm y una emisión de 478 nm con el lector de microplacas *Biotek Synergy HTX*. Los datos se calcularon según la curva estándar para GSH (nmol) y luego se normalizaron por mg de proteína.

7.3 Determinación de malondialdehído (MDA)

Se tomaron muestras de extracto de proteína previamente obtenidas de cada condición experimental para la evaluación de MDA según la técnica descrita por Gérard-Monnier *et al.* 1998 se preparó cada mezcla de reacción utilizando 15.4 mM de 1-metil-2-fenilindol en presencia de ácido clorhídrico, luego se incubó a 45 °C durante 40 min, se centrifugaron a 3000 g por 5 min. y finalmente se midió espectrofotométricamente (lector multimodo Biotek Synergy HTX) a 586 nm. Se realizó una curva estándar de tetrametoxipropano como fuente de MDA. Los datos se calcularon para nmol MDA y luego se normalizaron por mg de proteína total.

7.4 Cuantificación de H₂O₂.

Utilizando extracto fresco de proteína total recién preparado tras el protocolo de isquemia/reperfusión *in vivo*. El desarrollo del ensayo se basó en la descripción para *Amplex Red* de (Dikalov, 2007). Las reacciones se realizaron utilizando nuevos homogeneizados de cada grupo experimental (n = 5) más 10 µmol/L de 10-acetil-3,7-dihidrofenoaxazina, 0.2 U/ml de peroxidasa de rábano picante (HRP) en amortiguador de fosfatos de Krebs-Ringer (145 mmol/L de NaCl, 5.7 mmol/L de NaH₂PO₄, 4.86 mmol/L de KCl, 0.54 mmol/L de CaCl₂, 1.22 mmol/L de MgSO₄, 5.5 mM de glucosa) incubados en la oscuridad 60 min a 37 °C. Finalmente se detectó la fluorescencia a 590 nm utilizando una excitación de 530 nm en un espectrofluorofotómetro (*Shimadzu RF5000U*). Los datos se calcularon en función de la curva estándar de H₂O₂ realizada junto con las muestras, los resultados se expresaron como nmol de H₂O₂ por mg de proteína total.

7.5 Importancia de la señalización redox en la cardioprotección mediada por el iPostC.

Para evaluar si el efecto protector del iPostC está determinado por el estado redox, se incluyó un grupo tratado con el antioxidante ácido ascórbico (+asc) como neutralizador de las ROS en el iPostC (+asc₁₀; +asc₆₀). El antioxidante fue aplicado a una dosis de 100 mg/Kg, administrada directamente en la pared del ventrículo izquierdo al min 3 de la isquemia (antes del iPostC) y seguida de 10 y 60 min de reperfusión, según el caso.

7.6 Evaluación de Nrf2 como blanco de ERK1/2

Para definir la correlación entre la fosforilación de MEK1/2-Erk1/2 y la activación de Nrf2 utilizamos el inhibidor específico de MEK1/2, U0126 (+ U), administrado a las ratas durante el periodo de estabilización (al min 10), mediante una inyección directa al ventrículo izquierdo. A la dosis 1.27 mg/Kg las cinasas fueron significativamente inhibidas en el grupo con iPostC. Luego de los experimentos, los corazones

fueron extraídos, el ventrículo izquierdo seccionado y congelado al momento con nitrógeno líquido. Posteriormente el tejido fue pulverizado con un pistilo y mortero fríos, luego fueron mezclados en solución amortiguada.

7.7 Análisis de activación de las cinasas Mek1/2 y Erk1/2 y del factor de transcripción Nrf2 (Inmunodetección)

Se realizó inmunodetección por *Western-blot*, a partir de homogenados de los ventrículos izquierdos que fueron preparados para la corrida electroforética. Se añadió el reductor β -mercaptoetanol como agente desnaturalizante y el detergente aniónico SDS para cargar negativamente las proteínas. Las muestras de cada grupo fueron cargadas en un gel de acrilamida/bis-acrilamida que se corrió en una cámara vertical de electroforesis. Una vez separadas se realizó electro-transferencia del gel a una membrana de PVDF, donde se emplearon anticuerpos, Phospho-p44/42

MAPK (PHO-Erk1/2) (Thr202/Tyr204) *rabbit mAb* #4370, p44/42 MAPK (Erk1/2) *rabbit (Rb) policlonal* #9102, PHO-Mek1/2 /Ser217/221) *Rb mAb* #9154, total Mek1/2 *rabbit policlonal* #9122, PHO-Erk1 (pT202/pY204)/2 (pT185/pY187) ab4819, Nrf2 *mouse monoclonal* ab89443, Nrf2 (H-300) *rabbit policlonal* y PHO-Nrf2 *rabbit monoclonal* (phospho S40) ab76026, así como lamin-B1 *rabbit monoclonal* ab133741 y actin (I-19) *goat pliclonal* sc-1616 como controles de carga. La unión proteína-anticuerpo se detectó mediante la unión de un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), que luego de incubarse con su sustrato produjo una señal quimioluminiscente que pudo ser captada por una película fotográfica. Se analizó el contenido de Mek1/2, Erk1/2 y Nrf2 fosforiladas contra Mek1/2, Erk1/2 y Nrf2 totales, respectivamente.

7.8 Extracción de proteínas nucleares

Se extrajo proteína nuclear de muestras de ventrículos izquierdos según las especificaciones del fabricante del kit de

extracción *NE-PER*, (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EE. UU.) utilizando tejido congelado del ventrículo izquierdo. Inmediatamente después de la IR en el protocolo in vivo, se obtuvo el ventrículo izquierdo, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C hasta el inicio del ensayo. Primero, pulverizamos tejido cardíaco congelado seguido de un procedimiento de homogeneización en DPBS que contenía inhibidores de proteasas/fosfatasa utilizando un homogeneizador de microtubos mecánico. Todas las etapas se llevaron a cabo a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 1.850 g durante 15 min. El sobrenadante se recogió como una fracción citoplásmica y el sedimento se incubó según la descripción de las instrucciones del kit comercial para luego darle seguimiento a la obtención del extracto de proteína nuclear para cada grupo experimental.

7.9 Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Como DNA blanco se usó un oligonucleótido biotinilado que incluía la secuencia ARE (GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT) (ARE-B) fabricado por *Accesolab S.A. de C.V.* (CDMX, México). La reacción de unión de los oligos se realizó por 60 min a temperatura ambiente, en presencia de 50 ng/ μ L de poly(dI•dC), nonidet P-40 al 0.05%, glicerol al 2.5 %, EDTA 10 mM, MgCl₂ 5mM, KCl (ARE-B) y 10 μ g del extracto nuclear. El ensayo de competencia fue efectuado incubando un excedente de la secuencia ARE-no marcado (ARE-U) por 30 min, antes de la adición del ARE-B. Finalmente, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 5%, precorrido 60 min antes en amortiguador Tris-Borato-EDTA 0.5X (TBE) y los complejos separados a 100 V y transferidos a una membrana de nylon cargada positivamente, 30 min a 380 mA en amortiguador TBE 0.5X. El DNA transferido fue

entrecruzado a la membrana con luz U.V. y finalmente detectado por quimioluminiscencia usando el conjugado estreptavidina estabilizada-HRP.

7.10 Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm D.E. De lo contrario se esboza en la figura correspondiente \pm SEM. Las diferencias en todas las variables se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Una diferencia estadística de $p < 0.05$ o $p < 0.01$ fue considerada significativa. Utilizamos el software *GraphPad Prism* versión 7 para el análisis de datos.

VIII. RESULTADOS

8.1 Estudio del efecto de la inhibición de Erk1/2 y el ER por asc sobre los parámetros hemodinámicos de corazones con iPostC

Los datos hemodinámicos registran las alteraciones de la función contráctil del cardiomiocito debido a los efectos de la reperfusión (IR), el iPostC y del iPostC aplicado posterior a la administración del ácido ascórbico (+asc), así como el AOX aplicado para contrarrestar la reperfusión (IR+asc) a través de los índices de presión del ventrículo izquierdo (LVP), presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVDP), frecuencia cardíaca (HR), contractilidad (max dP/dt) y relajación (min dP/dt) que se midieron durante la cirugía a tórax abierto. Los valores de referencia y los registrados después de 60 min de reperfusión se muestran en la *Tabla 1*, así la gráfica de frecuencia cardíaca en la *Figura 9*. No se obtuvieron diferencias significativas en los registros de referencia de los diferentes grupos experimentales al inicio del

experimento (condiciones basales). Luego de la reperfusión, la LVP disminuyó en el grupo IR comparada con lo observado en el grupo *sham* (57 ± 22 mm Hg frente a 127 ± 20 mm Hg; $p < 0,01$). El iPostC logró mantener la LVP en valores similares a los registrados en el grupo *sham* (120 ± 14 mm Hg; 127 ± 20 mm Hg) y significativamente más altos que los del grupo IR (127 ± 14 mm Hg frente a 57 ± 22 mm Hg; $p < 0,01$) luego de la reperfusión, un comportamiento similar se observó en el grupo IR+asc, donde el uso exclusivo del AOX logró un efecto similar al iPostC (126 ± 9 mm Hg vs. 120 ± 14 mm Hg). Por otro lado, el tratamiento con asc a los corazones con iPostC dio como resultado un agotamiento significativo de la LVP (57 ± 21 mm Hg) similar al ejercido por la lesión IR (57 ± 22 mm Hg; $p < 0,01$) y análogo a la inhibición farmacológica de Erk1/2 (76 ± 15 mm Hg).

Por su parte, el parámetro LVDP siguió un patrón similar; en el grupo IR fue significativamente menor que en el grupo *sham* (59 ± 28 mm Hg vs. 117 ± 21 mm Hg; $p < 0,01$) y

aumentó en el grupo con iPostC (113 ± 11 mm Hg), lo mismo que en grupo IR con asc (109 ± 13 mm Hg). La LVDP fue suprimida significativamente tanto por el tratamiento conjunto de iPostC+asc (38 ± 17 mm Hg) como por el inhibidor de MEK1/2 (62 ± 16 mm Hg [+ U]).

Los datos correspondientes a HR fueron similares entre los grupos *sham*, IR e iPostC. A su vez, se observó una disminución del 36.2% en el grupo +asc en comparación con el grupo iPostC (210 ± 39 latidos/min frente a 329 ± 17 latidos/min; $p < 0,01$). Por otro lado, la función sistólica del ventrículo izquierdo o índice de contractilidad (max dP/dt) se recuperó de manera eficiente en corazones con iPostC e IR con asc solo en contraste con el grupo IR (6180 ± 1026 mm Hg/s y 6847 ± 950 mm Hg vs. 1158 ± 705 mm Hg/s; $p < 0,01$) mientras que fue afectado por el tratamiento de ER (+asc) (1319 ± 622 mm Hg/s vs. 6180 ± 1026 mm Hg/s; $p < 0,01$). Además, se redujo después de los tratamientos con +U (1638 ± 891 mm Hg/s). El índice de relajación (min dP/dt) mejoró

en los corazones con iPostC en comparación con los corazones IR (-4412 ± 1605 mm Hg/s vs. -404 ± 178 mm Hg/s; $p < 0.01$). El tratamiento con +asc en corazones con iPostC produjo valores de relajación más altos que iPostC (-925 ± 492 mm Hg/s vs. -4412 ± 1605 mm Hg/s; $p < 0.01$), así como +U (-1439 ± 902 mm Hg/s). Estos resultados indican que los primeros min de la reperfusión son críticos para la intervención del miocardio, ya que desde los primeros instantes se hacen presentes las arritmias que, tras la aplicación del iPostC (IR+iPostC) lograran ser efectivamente contrarrestadas cerca del min 7 o por la administración del ácido ascórbico (IR+asc) hacia el min 20, este último efecto como consecuencia de la recuperación del glutatión intracelular, el atrapamiento de especies oxidantes, inhibición de oxidasas entre otros eventos fisiológicos que promueve la vitamina C en escenarios de estrés oxidante, restaurando la microvasculatura a nivel de endotelio y contrarrestando las arritmias (Montecinos *et al.*, 2007; Kuck *et al.*, 2018; Spoelstra-de Man *et al.*, 2018; Bozkurt *et al.*, 2019). Ambas estrategias

logran reestablecer los parámetros hemodinámicos y la función cardíaca a valores similares a los observados en el grupo *sham* y en oposición al grupo dañado (IR) donde la función contráctil del miocardio se ve comprometida de manera importante a medida que se prolonga la reperfusión. Sin embargo, resulta interesante observar que al aplicarse el AOX junto al iPostC (+asc) se presenta un significativo declive en las funciones contráctiles del miocardio luego de los cuarenta min del protocolo, aún muy por debajo de las mediciones registradas en el daño por reperfusión solo (IR), y que fueron imposibles de recuperarse. Lo cual manifiesta que la señalización redox, así como dependiente de cinasas puede actuar en conjunto o regulando independientemente la protección cardíaca por el iPostC.

	Basal					Reperusión				
	LVP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)	HR (latidos/min)	+dP/dt (mm Hg/s)	-dP/dt (mm Hg/s)	LVP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)	HR (latidos/min)	+dP/dt (mm Hg/s)	-dP/dt (mm Hg/s)
S	106±19	95±14	328±70	6684±1968	-4253±1639	127±20	117±21	272±49	5271±1673	-3849±1354
IR	107±11	101±9	338±26	7598±674	-4787±746	57±22 ^{&}	59±28 ^{&}	272±43	1158±705 ^{&}	-404±178 ^{&}
IR+iPostC	102±16	98±11	326±32	7773±1247	-4687±1526	120±14 [#]	113±11 [#]	329±17	6180±1026 [#]	-4412±1605 [#]
iPostC+asc	111±12	106±14	355±25	7267±671	-4087±872	57±21 ^{@€}	38±17 ^{@€}	210±39 [@]	1319±622 [@]	-925±492 [@]
IR+asc	119±23	101±24	367±35	6837±1826	-4880±1212	126±9 [#]	109±13 [#]	306±22	6847±950 [#]	-6233±726 [#]
iPostC+U	113±12	104±11	342±34	7221±1310	-4606±1436	76±15 [@]	62±16 [@]	272±31	1638±891 [@]	-1439±902 [@]

Tabla 1. Efecto del iPostC y ácido ascórbico en distintos esquemas del daño por reperusión. Parámetros hemodinámicos de corazones post-acondicionados después de 60 min. Los datos hemodinámicos se muestran en el momento basal y al final de 60 min de reperusión. En la línea basal no hay diferencias significativas entre los grupos. La administración de asc fue al min 3 de la isquemia a partir de 100 mg/Kg de peso, administrado en el ventrículo izquierdo. El iPostC se realizó luego de 5 min de isquemia. Todos los parámetros evaluados después de la reperusión mostraron un efecto protector de **asc** en corazones isquémicos-reperfundidos (IR+asc), y del iPostC (IR+iPostC) por la preservación de la presión ventricular izquierda (LVP), presión desarrollada ventricular izquierda (LVDP), frecuencia cardíaca (HR), índice de contractilidad (+dP/dt) y el índice de relajación (-dP/dt). Los datos correspondientes al grupo IR y al grupo iPostC+asc de la tabla 1 se compararon ahora con IR+asc como referencia para establecer el efecto protector de **asc** cuando hay EO. Se muestran los valores de corazones con U0126 (U) después de 60 min de reperusión en comparación con IR+iPostC, donde se aprecia una pérdida de protección del iPostC que se refleja en los parámetros mencionados. Los valores son la media de 3 experimentos: D.E. [&]p<0.01 vs. S; [#]p<0,01 frente a IR; [@]p<0.01 vs. iPostC; [€]p<0.01 frente a IR+asc.

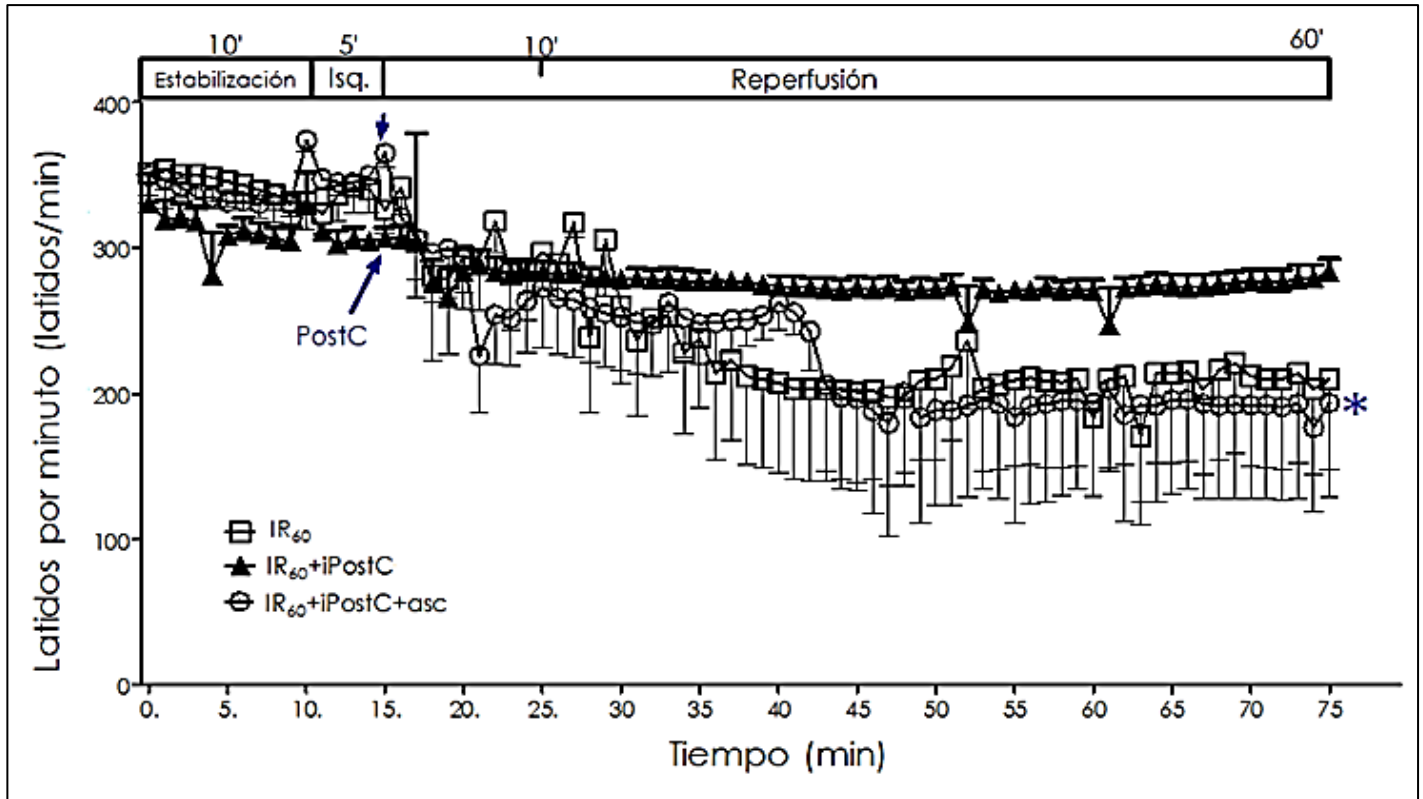


Figura 9. Efecto del ácido ascórbico en corazones post-acondicionados. Se representa el efecto protector conseguido con el iPostC (IR+iPostC) después de 60 min de reperusión (flecha azul). La maniobra restablece el ritmo cardiaco en comparación con la caída que provoca el daño por reperusión (IR) y la administración de asc conjunta con el iPostC (*). Los valores son la media de 5 experimentos. PostC=post-acondicionamiento isquémico.

8.2 iPostC mantiene los niveles de GSH y evita el daño por EO causados por la lesión por IR.

El tripéptido glutatión es el principal antioxidante de origen natural y un indicador que refleja el estado redox intracelular. El contenido de GSH disminuyó en los corazones con IR después de 10 min de reperfusión en comparación con el grupo *sham* (1.95 ± 0.72 frente a 4.40 ± 0.74 nmol/mg de proteína; $p < 0.01$), mientras que en los corazones sometidos a iPostC, el contenido de GSH aumentó a 5.72 ± 1.74 (*Figura 10A*). Concerniente al grupo iPostC+asc, se puede observar que el tratamiento con AOX presenta niveles de GSH similares a lo observado en iPostC (5.48 ± 1.04 frente a 4.40 ± 5.72 nmol/mg de proteína; $p < 0.01$, respectivamente) lo que en una primera instancia revela que ambas intervenciones mantienen el estado redox de la célula. El daño por EO también se evaluó mediante la determinación de MDA, un subproducto tóxico de la peroxidación lipídica provocada por el EO. La pérdida de equilibrio redox hacia un estado prooxidante se confirmó en los corazones con IR por los niveles

de MDA aumentados en comparación con los corazones del grupo *sham* (15.11 ± 4.34 frente a 2.73 ± 1.47 nmol/mg de proteína; $p < 0.01$; Figura 8B), mientras que el MDA en corazones con iPostC fue inferior a lo observado en el grupo de IR (3.78 ± 2.06 frente a 2.73 ± 1.47 nmol/mg de proteína; $p < 0.01$; Figura 10B). El MDA en el grupo tratado con el iPostC y antioxidante (+asc) muestra un comportamiento similar al grupo con post-acondicionado (3.07 ± 1.87 frente a 3.78 ± 2.06 nmol/mg de proteína; $p < 0.05$), indicando que, si bien el empleo del antioxidante es capaz de evitar la peroxidación de lípidos tan eficientemente como el iPostC, esto no asegura la existencia de un equilibrio redox por el lado de las especies reductoras. Es por ello por lo que se cuantificó el H_2O_2 como un indicador de la producción de ROS después de la reperfusión temprana (10 min). La concentración de H_2O_2 aumentó al doble en el grupo IR en comparación con el control *sham* representado en la Figura 10C (41.28 ± 9.61 vs. 18.26 ± 2.8 nmol/mg de proteína; $p < 0.01$); este aumento se evitó por el iPostC, donde fue 1.95 veces más bajo que en los

corazones con IR (22.45 ± 7.37 contra 41.28 ± 9.61 nmol/mg de proteína; $p < 0.01$). Estos datos indican que el iPostC puede activar mecanismos agudos que preservan el estado redox en la reperfusión temprana que evitan la alteración en el equilibrio redox inicial provocada por IR.

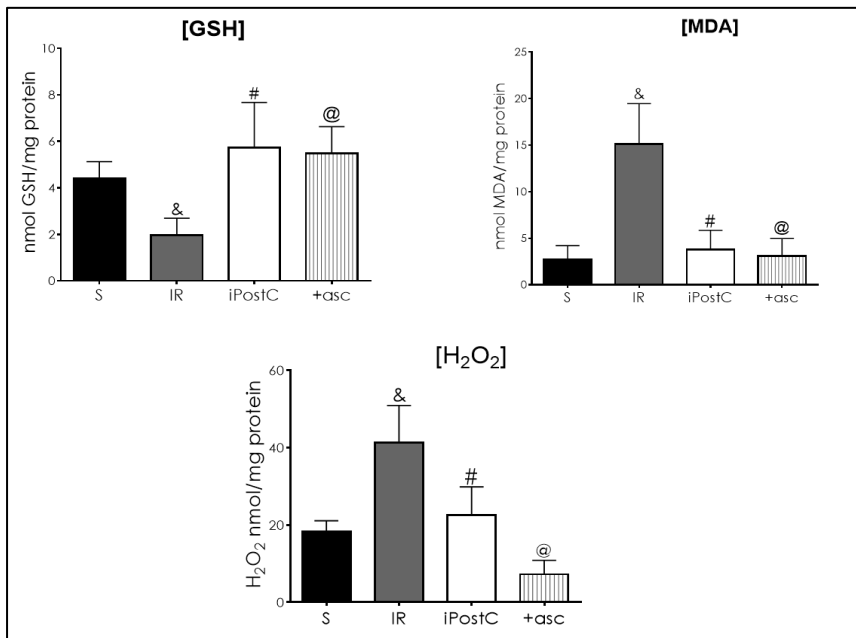


Figura 10. La aplicación iPostC conserva la homeostasis redox. (A) Se midieron los niveles de GSH y el gráfico muestra la media de 5 experimentos \pm S.D. Los datos se representan como nmol por mg de proteína. (B) El malondialdehído se expresa como nmol/mg de proteína. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos \pm S.D. (C) Los valores de la cuantificación de H₂O₂ se expresan como nmol por mg de proteína, los datos son la media de al menos 4 experimentos. [&] $p < 0.01$ contra Sham y [#] $p < 0.01$ contra IR; [@] $p < 0.05$ frente a iPostC.

8.3 El ácido ascórbico disminuyó la concentración de H₂O₂ en los corazones con iPostC.

La naturaleza química del H₂O₂ determina sus propiedades como molécula transmisora de la señalización redox. Observamos que la administración de asc a corazones de iPostC (+asc) redujo drásticamente la concentración de H₂O₂ en 2.5 veces en comparación con el grupo que obtuvo la maniobra mecánica (iPostC) (7.23 ± 3.61 vs. 22.45 ± 7.37 nmol/mg de proteína; $p < 0.05$) y esto coincidió con una deterioro de la función cardíaca (Tabla 1), lo que indica que el cambio del estado redox hacia un estado reductor altera el equilibrio redox inducido por iPostC después de la reperfusión, debido a una disminución en la señal mediada por H₂O₂ (ER) que evita el efecto cardioprotector del iPostC y que ocurre a la inversa que IR que provoca daño debido al incremento de las especies oxidantes (EO).

8.4 El ER afectó la activación de MEK1/2-Erk1/2 en los corazones con iPostC.

Para estudiar el papel de la señalización redox en la activación de las RISK, evaluamos la activación de MEK1/2-Erk1/2 después del tratamiento con asc en corazones con iPostC, detectando su fosforilación (PHO-MEK1/2 y PHO-Erk1/2) mediante *Western blot*. Como se muestra en la *Figura 11*, se observó una disminución de la señal de PHO-MEK1/2 ($p < 0.05$) y PHO-Erk1/2 ($p < 0.01$) en el grupo IR en comparación con el grupo *sham* y ambas aumentaron su fosforilación en el grupo iPostC ($p < 0.05$; $p < 0.01$, respectivamente). No se indujeron cambios en la activación de MEK en el grupo +asc de corazones post-acondicionados, sin embargo, el ER disminuyó la activación de Erk1/2 en comparación con lo observado en los corazones de iPostC ($p < 0.01$). Nuestros datos sugieren que, a diferencia de MEK1/2, la actividad observada de Erk1/2 es dependiente de la señalización redox, lo cual sugiere que su activación es independiente de MEK1/2 en este escenario. Todos estos

resultados implican que el ER inducido por asc en los corazones con iPostC, anula la activación de señales redox protectoras que involucran a Erk1/2, sugiriendo que el H₂O₂ es importante para desencadenar la activación de esta vía de supervivencia.

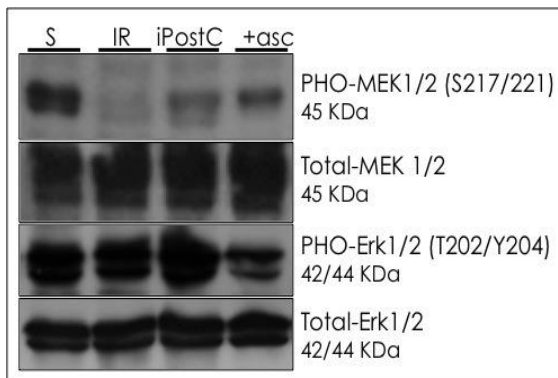
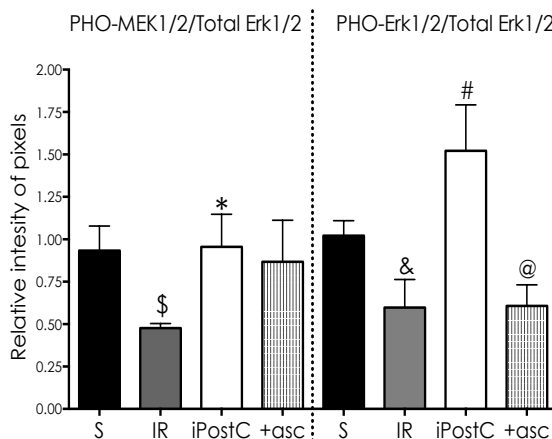


Figura 11. La señalización redox interrumpida por asc en los corazones de iPostC evita la activación de Erk1/2. Imagen representativa de la inmunodetección de PHO-Erk1/2 y PHO-MEK normalizada con su proteína total. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos \pm D.E. \$ $p < 0.05$ vs. Sham y * $p < 0.05$ vs. IR; & $p < 0.01$ vs. Sham; # $p < 0.01$ vs. IR; @ $p < 0.01$ vs. iPostC.



8.5 La inhibición de la señalización redox evita la traslocación nuclear de Nrf2 y la respuesta antioxidante en los corazones de iPostC.

La *Figura 12A* muestra la acumulación nuclear del factor de transcripción Nrf2 después de 60 min de reperfusión. El contenido de Nrf2 dentro del núcleo es mínimo en el grupo IR comparado con el grupo *sham* ($p < 0.05$), mientras que el iPostC aumenta la cantidad de Nrf2 nuclear en comparación con IR ($p < 0.01$), el resultado anterior disminuyó como consecuencia de la administración de asc en el grupo con iPostC ($p < 0.01$).

Utilizando extractos nucleares de corazones después de 60 min de reperfusión se efectuó un ensayo EMSA para evaluar la unión de Nrf2 a la secuencia B-ARE en los diferentes grupos experimentales. La *Figura 12B* demuestra que el iPostC promueve la formación del complejo Nrf2:ARE en comparación con IR, como se observa en la banda de desplazamiento superior (carriles 4 y 8 frente a 3 y 7),

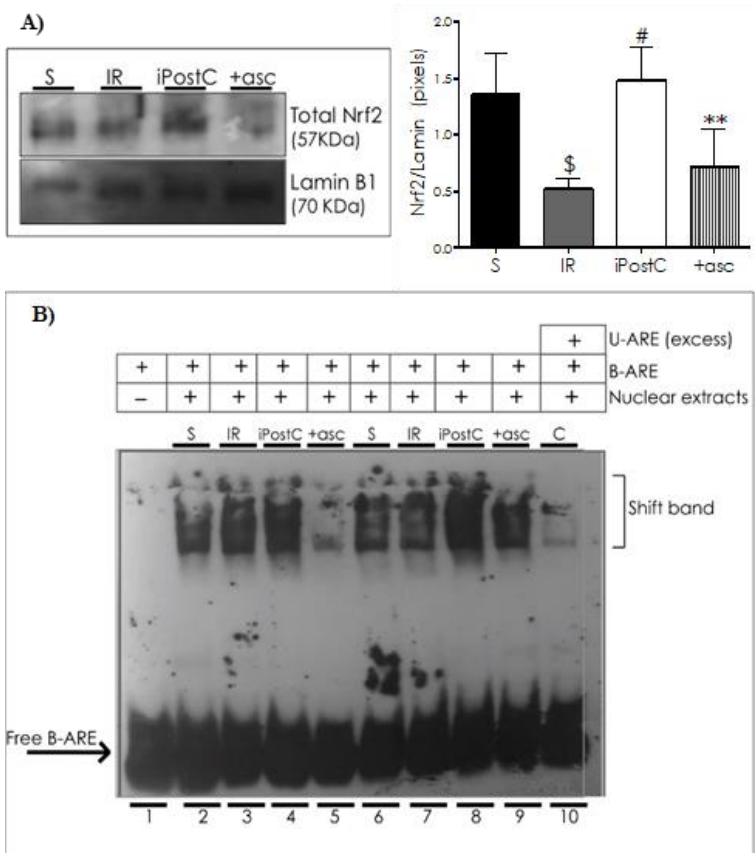


Figura 12. La inhibición de la señalización redox bloqueó la activación transcripcional de Nrf2 en los corazones con iPostC. (A) inmunotransferencias representativas correspondientes a la acumulación nuclear de Nrf2 normalizada con lamina B1; $N = 3 \pm S.D$; $*p < 0.05$ vs. Sham; $\#p < 0.01$ vs. IR; $**p < 0.05$ vs. iPostC. **(B)** La actividad transcripcional se evaluó mediante un ensayo de cambio en la movilidad electroforética en todos los grupos experimentales (después de 60 min de reperusión). El complejo formado debido a la unión de Nrf2 a B-ARE (ARE marcada con biotina) corresponde a la banda de retardo en la parte superior de la imagen resaltada como banda de desplazamiento. En el carril 1 se muestra la migración de B-ARE libre en el gel no desnaturizante de poliacrilamida. Los carriles 2-9 muestran la formación del complejo correspondiente al control sham (S), isquemia-reperusión (IR), post-acondicionamiento isquémico (iPostC) y corazones post-acondicionados en presencia de ácido ascórbico (+asc). El carril 10 muestra el ensayo de competencia por exceso de U-ARE (ARE sin marcar). La imagen es representativa de 3 EMSAs.

fenómeno que se evitó por el tratamiento con asc en

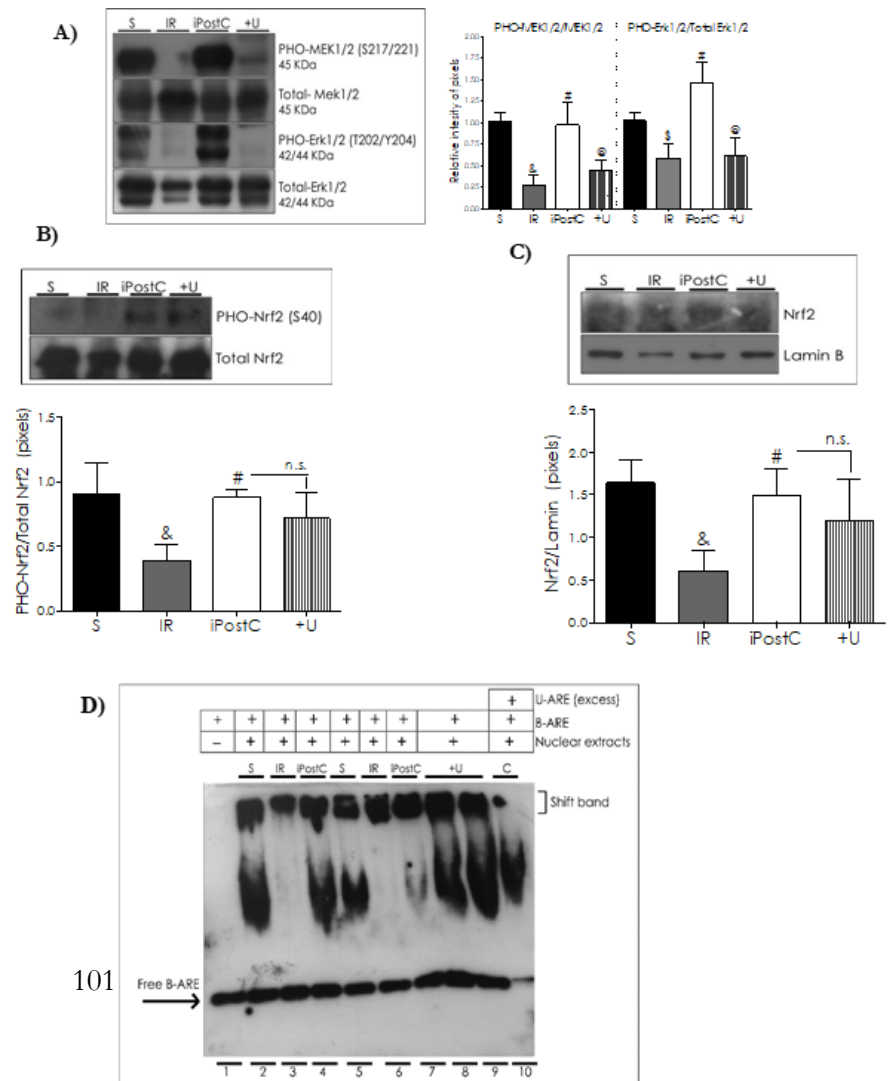
corazones iPostC (carriles 5 y 9 vs. 4 y 8). Indicando que la señalización redox favorece de alguna manera la acumulación nuclear de Nrf2 y una mayor unión con ARE.

8.6 Función de la señalización MEK 1/2 y Erk1/2 en la activación de Nrf2 de corazones post-acondicionados.

Utilizando el inhibidor selectivo de MEK1/2, U0126 (+U), determinamos la correlación entre la fosforilación de MEK1/2-Erk1/2 y la activación de Nrf2. Se muestran las imágenes representativas del contenido de PHO-MEK y PHO-Erk1/2 en corazones con iPostC tratados con U después de 10 min de reperfusión (*Figura 13A*). Se observó una disminución considerable en la fosforilación de ambas cinasas en el grupo IR en comparación con los corazones *sham* ($p < 0.01$), señal que el iPostC reestableció, incrementando los niveles de PHO-MEK1/2 y PHO-Erk1/2 en comparación con el grupo IR ($p < 0.01$), los cuales fueron inhibidos por la administración de U. De esta manera resulta

claro que cuando MEK/Erk1/2 son inhibidas en el iPostC no existe perturbación en la fosforilación de la Ser40 de Nrf2 en la reperfusión temprana comparado con el grupo con iPostC (*Figura 13B*). Para establecer si la inhibición de Erk1/2 ejerce un efecto tardío en la activación de Nrf2, también evaluamos la acumulación nuclear de Nrf2 y su unión a la secuencia B-ARE después de 60 min de reperfusión en corazones con iPostC, observando que la activación de Erk1/2 tampoco regula la acumulación nuclear de Nrf2 (*Figura 13C*). Lo anterior puede cerciorarse con la *Figura 13D* donde se muestra una imagen representativa del ensayo EMSA y se observa que la unión de Nrf2 a la secuencia ARE (carriles 2 y 5) se redujo en el grupo IR (carriles 3 y 6), incrementándose de manera inversa en el grupo con iPostC (carriles 4 y 7) y además, conservándose este efecto en presencia del inhibidor de Erk1/2 (carriles 8 y 9).

Figura 13. La inhibición de la señalización de Erk1/2 en los corazones con iPostC no afectó la activación de Nrf2. (A) Se muestran los Westernblots de PHO-Erk1/2 y PHO-MEK correspondientes a las inmunotransferencias representativas, cada una normalizada con su proteína total correspondiente. +U, representa los corazones con iPostC con inhibidor U0126, selectivo para MEK1/2. Los valores son la media de al menos 4 experimentos \pm D.E. &#p<0.01 vs. Sham; #p<0.01 vs. IR; @p<0.05 vs. iPostC. (B) Inmunotransferencias representativas de PHO-Nrf2 normalizadas con Nrf2 total en grupos experimentales reperfundidos 10 min. Los datos se expresan como media \pm D.E. de al menos 4 experimentos. &#p<0.01 vs. Sham; #p<0.01 vs. IR; no significativo: n.s. (C) Inmunotransferencias representativas de Nrf2 total normalizado a Lamin B en fracciones nucleares. Los valores son la media de al menos 4 experimentos \pm E.D. &#p<0.01 vs. Sham; #p<0.01 vs. IR. (D) El EMSA representativo muestra la formación del complejo Nrf2:B-ARE. El carril 1 corresponde a la migración de B-ARE libre. Los carriles 2-9 muestran la formación del complejo correspondiente a los grupos experimentales: sham (S), isquemia-reperfusión (IR), post-acondicionamiento isquémico (iPostC) y corazones post-condicionados tratados con inhibidor U0126 (+U). El carril 10 C muestra un ensayo de competencia (Formación del complejo con U-ARE: ARE sin marcaje). El EMSA es una imagen representativa de N=4.



IX. DISCUSIÓN

El desequilibrio redox que conduce al daño oxidante está relacionado con el deterioro de la función del miocardio durante la reperfusión, ya que la homeostasis redox que regula las vías de señalización fisiológicas se ve alterada por el incremento súbito y desmedido de especies oxidantes. En este sentido, se ha establecido que un delicado balance de ROS participa en la protección del corazón (Baines, 1997; Tsutsumi, 2007; Liu *et al.*, 2008; Akawi *et al.*, 2019; Meijles *et al.*, 2019) y que la administración de antioxidantes (AOX) elimina el efecto cardioprotector de estrategias protectoras como iPostC al perturbar este equilibrio desde múltiples blancos (Penna, 2006, 2007). Grupos como el de Claudia Penna han propuesto que las ROS son mediadoras en lugar de desencadenantes de la cardioprotección, ya que su participación es posterior a la apertura de los canales mitoK_{ATP} y a la activación mitocondrial de PKC (Penna, 2009). Nuestros resultados mostraron la influencia del iPostC

en el mantenimiento del equilibrio redox conservando niveles óptimos de GSH y evitando la lipoperoxidación evitando el incremento de MDA y H_2O_2 desde los primeros instantes de reperfusión.

En los corazones con iPostC y asc, ni los niveles de GSH ni de MDA cambiaron significativamente, lo que indica que los efectos que encontramos en la señalización se debieron únicamente a la presencia de asc en la célula en lugar de promover un estado reductor a través del aumento de GSH. Sin embargo, el tratamiento con asc propició de manera considerable la disminución de los niveles de H_2O_2 en los corazones iPostC y esto coincidió con el deterioro de la función cardíaca. A este efecto, es de destacar la aparición de un desequilibrio redox hacia el estado reductor por una disminución importante del H_2O_2 que afectó el rendimiento del corazón y dificultó la señalización cardioprotectora activada por iPostC.

Actualmente se reconoce que el H₂O₂ al igual que otras ROS, actúa como segundo mensajero y es de las principales moléculas moduladoras de la señal en la señalización redox, ya que es capaz de oxidar una amplia gama de sustratos al reaccionar con tioles específicos, que actúan como sensores que transmiten la señal redox (Yamamura *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Schieber y Chandel, 2014; Winterbourn, 2015; Sies, 2017) y la adición de antioxidantes exógenos ha anulado notablemente los efectos cardioprotectores de estrategias como iPostC, probablemente al promover un ambiente reductor transitorio (Penna, 2007; Finkel, 2011). En este contexto, la homeostasis redox puede ser alterada hacia un estado pro-reductor, al respecto del cual, recientemente se ha descrito una condición conocida como '*estrés reductor*' (Rajasekaran *et al.*, 2007; Narasimhan y Rajasekaran, 2015), que resulta directamente de un estado hiper-reductor caracterizado en parte por un aumento en los niveles de GSH, NADPH u otras moléculas reductoras que atenúan la señalización redox causando detrimento y efectos patológicos

en el corazón (Santos, 2011; Kannan *et al.*, 2013; Sairam *et al.*, 2017; Shanmugam, 2017; Soorappan *et al.*, 2019). En consecuencia, el desequilibrio prolongado y abrumador hacia los estados oxidantes o reductores es perjudicial para la célula. Por lo tanto, se puede especular que los resultados decepcionantes ejercidos por las terapias de antioxidantes (AOX), en el contexto del daño cardíaco por la reperfusión (Separham *et al.*, 2016; Valls *et al.*, 2016; Sinning y Clemmensen, 2017) podrían ser incluso perjudiciales (Andreadou, 2009; Schmidt *et al.*, 2015) y ser resultado no solo de la entrega inadecuada por los sitios de generación de ROS o de la insuficiente concentración requerida necesaria para reaccionar con tales moléculas, sino del establecimiento de una condición de estrés hiper-reductor en la célula cardíaca.

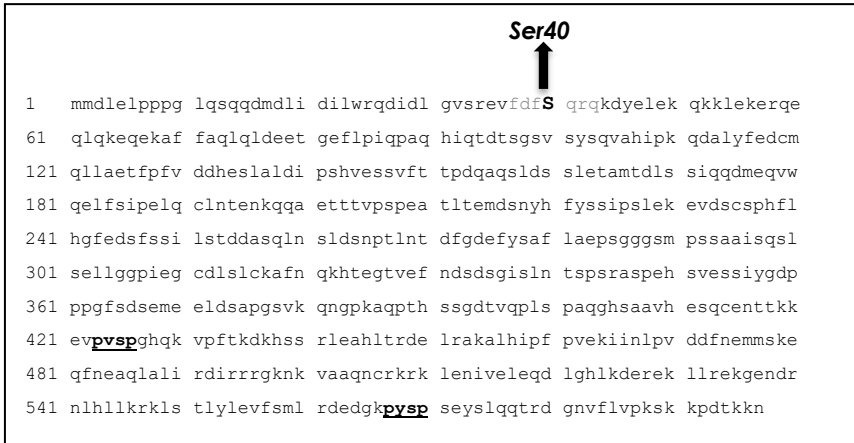


Figura 14. Secuencia primaria de Nrf2 (Rattus norvegicus). Análisis de la secuencia de Nrf2 donde aparece resaltado con una flecha Ser40. Los residuos potenciales para ser fosforilados por Erk1/2, Ser426 y Ser569 aparecen subrayados.

Nuestros resultados indican que la modulación redox desencadenada por el H₂O₂ es impulsada por mecanismos independientes y dependientes de cinasa, ya que, si bien asc inhibe la activación de Erk1/2 en correlación con el agotamiento del H₂O₂ en los corazones de iPostC, no inhibe la señalización de MEK1/2 en tales condiciones, lo que sugiere que la activación de Erk1/2 en este escenario está mediada por una vía no canónica a las MAPK. Como se ha

descrito anteriormente, muchos miembros de la vía RISK se activan en la reperfusión temprana para proteger el corazón, (Behrends *et al.*, 2000; Darling *et al.*, 2005; Schwartz y Lagranha, 2006), aunque las señales que desencadenan pueden diferir y en este sentido los blancos de esta activación no han sido totalmente descritos. Es preciso mencionar que un importante grupo de investigación ha planteado que las ROS actúan como mediadores en lugar de desencadenantes de la cardioprotección, ya que su concentración aumenta después de la apertura de mitoKATP y regula la activación mitocondrial de PKC (Penna, 2006, 2009, 2012; Pagliaro *et al.*, 2018). En este trabajo, Erk1/2 fue inhibida parcialmente después del tratamiento con asc, por lo que concluimos que el H₂O₂ enciende río arriba las señales protectoras en la activación de RISK y, por lo tanto, actúa como activador en lugar de un mediador en iPostC. De modo que, si bien el H₂O₂ participa en la señalización del iPostC a través de la modulación redox de Erk1/2, se deben realizar estudios adicionales para determinar si las modificaciones

postraduccionales redox que influyen en su actividad de cinasa son coordinadas por otra especie reactiva como el óxido nítrico a través de la S-nitrosilación de tioles (Numajiri *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018) o bien si las especies oxidantes pueden regular la actividad de la cinasa mediante un mecanismo indirecto, ya que al respecto se han descrito escenarios en los que ROS inactivan temporalmente aquellas fosfatasa que regulan la actividad de ERK1/2. Cabe destacar que en este sentido muchas fosfatasa son reguladas por señales redox, y prácticamente todas las fosfatasa de tirosina (PTPs) contienen residuos de cisteínas de bajo pKa, susceptibles de ser oxidadas por H₂O₂, (Corcoran y Cotter, 2013; Emanuele *et al.*, 2018; Dagnell *et al.*, 2019; Dustin *et al.*, 2019) algunas de estas fosfatasa redox sensibles están relacionadas con receptores tirosina-cinasa (RTK) involucrados en la señalización río-arriba de ERK1/2, un mecanismo canónico por el cual se desencadena la activación de la vía de las MAPK (Östman, 2011; Ray, 2012), tal como demuestran los estudios

de Levinthal *et al* sobre neuronas que muestran aumentada la actividad de ERK1/2 por inhibición de MAPK3, una fosfatasa específica de ERK1/2 capaz de interactuar con DUSP6 (Levinthal y DeFranco, 2005). La señalización redox que media la actividad de ERK1/2 en el escenario del iPostC también podría estar coordinada a nivel de las proteínas fosfatasas duales específicas (DUSP), un grupo de PTPs encargadas de mediar específicamente la actividad de distintos miembros de las MAPK incluyendo a Erk (Bermudez *et al.*, 2011; Chen, 2019) y sobre las cuales se ha estudiado que DUSP3/4/6 pueden ser desactivada por la oxidación de sus cisteínas catalíticas, lo que podría promover una activación sostenida de la cinasa en los primeros minutos de la reperfusión. (Traore *et al.*, 2008)

La ruta de Nrf2 contribuye a prolongar la protección en los corazones de iPostC, ya que implica la síntesis *de novo* de proteínas antioxidantes (Buelna-Chontal y Zazueta, 2013b; Buelna-Chontal *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2016; Silva-Palacios *et*

al., 2019). Para evaluar las implicaciones de la señalización redox en este factor transcripcional, evaluamos su activación a diferentes niveles de regulación en condiciones de ER y después de la inhibición farmacológica de ERK1/2 con la finalidad de saber si Nrf2 podría ser blanco de esta cinasa. Observamos que la activación de Nrf2 estaba influenciada por la señalización de H₂O₂ ya que tras la disminución de la señal con asc en los corazones con iPostC, la activación del factor de transcripción se vio mermada. Mientras que la inhibición farmacológica de Erk1/2 no repercutió en la actividad transcripcional de Nrf2, tampoco en la fosforilación de Ser40, ni en la acumulación nuclear del factor de transcripción, ni en su unión a ARE. Es de destacar que la fosforilación de Ser40 en Nrf2 es crucial para su activación, ya que promueve la interrupción con la unión a Keap1 (Huang, 2002; Jaiswal, 2004; Buelna-Chontal y Zazueta, 2013a). Analizamos la secuencia de Nrf2 e identificamos solo 2 sitios diana potenciales para ser fosforilados por Erk1/2 en Ser426 y Ser569 (Figura 12), ya que Erk1/2 es una Ser/Thr

cinasa, que fosforila preferentemente los aminoácidos Ser flanqueados por residuos Pro (Gonzalez *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 2004; Mebratu y Tesfaigzi, 2009; Buscà, 2016; Mao y Wang, 2016; Ng *et al.*, 2017). Ver Figura 14.

Así Nrf2 no posee residuos adecuados para ser fosforilados por Erk1/2 a pesar de que al respecto se ha informado que la estimulación con hidroxianisol butilado en células HepG2 causa la activación de Nrf2 a través de su fosforilación por Erk1/2 (Yuan *et al.*, 2006), sin embargo, como sugieren nuestros datos, Nrf2 no es un blanco directo de Erk1/2 en corazones post-acondicionados, aunque la señalización de Erk1/2 sí tiene otros blancos protectores. Al respecto, se ha informado previamente que PHO-Erk1/2 se transloca a las mitocondrias en la protección cardiaca conferida por iPostC, preservando su función y brindando protección a la célula (Hernández-Reséndiz y Zazueta, 2014). Así que los efectos cardioprotectores de Erk1/2 en los corazones con iPostC son independientes de los ejercidos por Nrf2.

En resumen, nuestros resultados muestran que la señalización protectora activada por el iPostC involucra mecanismos redox-dependientes y se vale de la presencia de ROS como el peróxido de hidrógeno, que regula a algunos de los miembros de la vía RISK (erk1/2) y participan activando de forma diferencial algunas vías y alcanzando objetivos alternativos. Entonces, la activación de Nrf2 en los corazones con iPostC si bien está relacionada con la señalización del peróxido de hidrógeno, esta ocurre de una manera independiente de la señalización de supervivencia de Erk1/2. Ver Figura 15

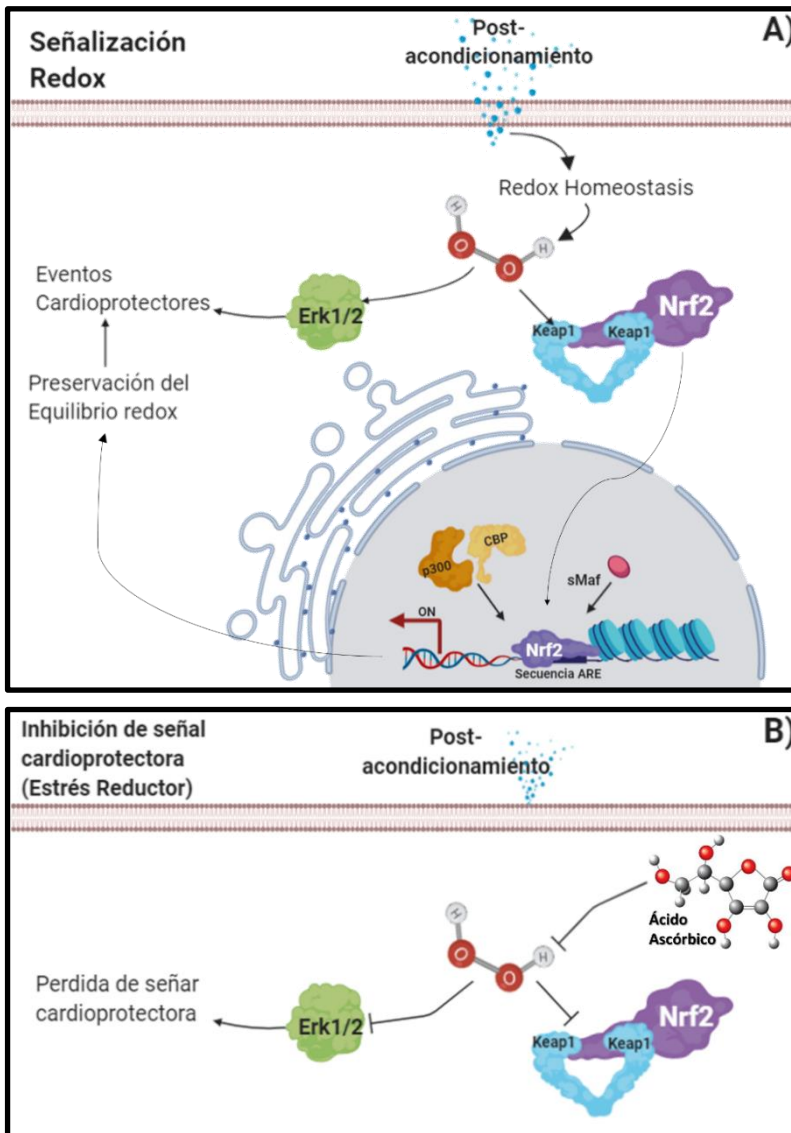


Figura 15. Mecanismo de protección inducido por la señalización redox en el iPostC que interrumpe la administración de un AOX (ascorbato). (A) El iPostC promueve el mantenimiento del sistema antioxidante endógeno regulado por Nrf2 y la protección mediada por la vía de las RISK (Erk1/2), la activación de estos mecanismos depende de señales redox coordinadas por H₂O₂. (B) En el iPostC la interrupción de esta señal se ve favorecida por el uso de asc que provoca un ER que disminuye de manera importante las ROS (H₂O₂) y el efecto de estas en la activación de la señalización cardioprotectora.

X. CONCLUSIÓN

Nuestros hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre el papel primordial de la preservación del equilibrio redox por parte del iPostC para la inducción y el mantenimiento de eventos de señalización cardioprotectores. Entre ellos, concluimos que la presencia de las ROS, con énfasis en el H_2O_2 es crucial como desencadenante de señales de supervivencia impulsadas por mecanismos dependientes de cinasa. De igual manera establecimos que la activación de Nrf2 en el iPostC, así como su traslocación nuclear y regulación transcripcional son regulados por mecanismos independientes de la cinasa de salvamento Erk1/2, por lo que la mayoría de los blancos específicos de la cinasa aún son desconocidos en la cardioprotección. De esta forma observamos que la señalización de protección cardíaca activada por iPostC incluye mecanismos redox dependientes e independientes, que actúan en concierto

activando diferentes vías para prevenir la lesión por reperfusión y coinciden con la activación de Nrf2. Estos resultados aportan información para construir un panorama más completo de las vías de protección endógena involucradas en la fisiología de la cardioprotección que nos permita localizar blancos clave para el desarrollo de terapias integrales que representen mejoría para el miocardio que curse por isquemia-reperfusión, así como identificar escenarios que se adecuen óptimamente a diferentes esquemas de tiramiento, establecidos bajo criterios a fines a las condiciones del paciente de IAM. Pues como se expone en el presente trabajo, la terapia antioxidante no siempre resulta ser la mejor opción en al intervenir el daño por reperfusión en escenarios donde el mantenimiento del delicado equilibrio redox sea crucial para desencadenar eventos de señalización importantes para preservar la viabilidad del miocardio.

XI. PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES ADICIONALES

La señalización redox es un mecanismo complejo que puede regularse a varios niveles, depende de una coordinación espaciotemporal muy precisa y participantes clave para poder mediar procesos celulares de adaptación/supervivencia endógenos como Nrf2, que controla al sistema antioxidante endógeno. Especies oxidantes que incluyen al mediador H_2O_2 en la regulación del mismo factor de transcripción y otros mecanismos de salvamento como los conformados por vías de señalización tan ubicuas como las MAPk-Erk1/2. Todos esto para tolerar condiciones agudas como la lesión por IR en el IAM, particularmente cuando esta se presenta acompañada de comorbilidades e hiperlipidemias. Incluso los antioxidantes, por sus propiedades reductoras, son capaces de neutralizar especies oxidantes importantes para el mantenimiento celular. De este modo resalta la

necesidad de identificar aquellos mecanismos alternativos que preservan la actividad de Nrf2 y de las RISK en el iPostC, aún en presencia de comorbilidades.

Queda por esclarecer entonces, cómo se altera la señal redox en escenarios de comorbilidades y co-medicaciones donde el EO o ER altera la homeostasis redox como el cáncer, diabetes, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Whaley-Connell *et al.*, 2011; Thanan *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Tönnies y Trushina, 2017; Morelli *et al.*, 2018). Cabe destacar que otra interrogante es el papel que juegan características del individuo en el establecimiento de estas terapias cardioprotectores, así que resulta crucial establecer si el iPostC también podría activar este mecanismo en corazones de ratas hembra, pues el tamaño de infarto ha demostrado ser dependiente del género. De hecho, se ha informado que la isquemia de corta duración aumenta el daño al miocardio preferentemente en corazones de ratas hembra que

macho (Penna, Tullio, *et al.*, 2009; Kim y Vemuganti, 2015; Gouweleeuw *et al.*, 2016; Selvamani y Sohrabji, 2017; Davis *et al.*, 2019), además parece que las diferencias de género influyen en la activación de las vías cardioprotectoras y éstas presentan componentes redox (Lagranha *et al.*, 2010; Casin *et al.*, 2018; Ciocci Pardo *et al.*, 2018) Además, es importante dilucidar cuáles son los eventos de oxidación que ocurren en las cisteínas reactivas relacionadas con Erk1/2 y otras proteínas que puedan participar en la señalización protectora, cuáles son las ROS implicadas en esta reacciones y cómo estas modificaciones alteran la actividad de la proteína, así como su participación en otros procesos de señalización como la fosforilación, nitrosilación, glutationilación, etc.

XII. REFERENCIAS

- Abo, M., Weerapana, E. 2019. Chemical Probes for Redox Signaling and Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 30: 1369-1386.
- Abrahams, S., Samodien, S., Lilly, M., Joubert, E., Gelderblom, W. 2019. Differential Modulation of Gene Expression Encoding Hepatic and Renal Xenobiotic Metabolizing Enzymes by an Aspalathin-Enriched Rooibos Extract and Aspalathin. *Planta Medica* 85: 6-13.
- Acar, C., Partington, M.T., Buckberg, G.D. 1990. Studies of controlled reperfusion after ischemia. XVII. Reperfusion conditions: controlled reperfusion through an internal mammary artery graft--a new technique emphasizing fixed pressure versus fixed flow. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 100: 724-736.
- Akawi, N., Checa, A., Kotanidis, C., Akoumianakis, I., Daskalakis, E., Herdamm, L., Wheelock, C., Antoniades, C. 2019. Adipose tissue secreted ceramides and related sphingolipids - potential modulators of vascular redox signalling in cardiovascular disease. *European Heart Journal* 40: ehz746.0085.
- Albuquerque, J.J. 2016. *Terapia combinada con condicionamiento isquémico remoto y tratamiento metabólico para la prevención del daño por reperfusión: Mecanismos implicados*. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

- Alkhulaifi, A.M. 1997. Preconditioning the human heart. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 79: 49-54.
- Allen, B.G., Spitz, D.R. 2016. Physiologic and Pathologic Functions of Mitochondrial ROS. En Hockenbery, D. M. (ed.), *Mitochondria and Cell Death*, pp. 111-130. Springer New York, New York, NY.
- Andreadou, I. 2009. To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 13: 945-956.
- Baines, C.P. 1997. Oxygen Radicals Released During Ischemic Preconditioning Contribute to Cardioprotection in the Rabbit Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29: 207-216.
- Baines, C.P. 2010. The Cardiac Mitochondrion: Nexus of Stress. *Annual Review of Physiology* 72: 61-80.
- Baines, C.P. 2009. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology* 104: 181-188.
- Baines, C.P., Goto, M., Downey, J.M. 1997. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29: 207-216.
- Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T. 2011. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology* 85: 241-272.
- Bajic, V.P., Van Neste, C., Obradovic, M., Zafirovic, S., Radak, D., Bajic, V.B., Essack, M., Isenovic, E.R. 2019. Glutathione

- “Redox Homeostasis” and Its Relation to Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019: 1-14.
- Behrends, M., Schulz, R., Post, H., Alexandrov, A., Belosjorow, S., Michel, M.C., Heusch, G. 2000. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 279: H1111-H1119.
- Bermudez, O., Jouandin, P., Rottier, J., Bourcier, C., Pagès, G., Gimond, C. 2011. Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. *Journal of Cellular Physiology* 226: 276-284.
- Bice, J.S., Baxter, G.F. 2015. Postconditioning signalling in the heart: mechanisms and translatability: Myocardial postconditioning. *British Journal of Pharmacology* 172: 1933-1946.
- Blake, D.R. ed. . 1994. Free radical pathways in the inflammatory response. En *New Comprehensive Biochemistry*, pp. 361-383. Elsevier.
- Bliksøen, M., Rutkovskiy, A., Vaage, J., Stensløyken, K.-O. 2017. Mode of perfusion influences infarct size, coronary flow and stress kinases in the isolated mouse heart. *Acta Physiologica* 220: 36-46.
- Boengler, K., Bencsik, P., Palóczy, J., Kiss, K., Pipicz, M., Pipis, J., Ferdinandy, P. *et al.* 2017. Lack of Contribution of p66shc and Its Mitochondrial Translocation to Ischemia-Reperfusion Injury and Cardioprotection by Ischemic Preconditioning. *Frontiers in Physiology* 8: 733.

- Bolli, R., Becker, L., Gross, G., Mentzer, R., Balshaw, D., Lathrop, D.A. 2004. Myocardial Protection at a Crossroads: The Need for Translation Into Clinical Therapy. *Circulation Research* 95: 125-134.
- Borutaite, V. 2001. Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1537: 101-109.
- Bøtker, H.E., Hausenloy, D., Andreadou, I., Antonucci, S., Boengler, K., Davidson, S.M., Deshwal, S. *et al.* 2018. Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Research in Cardiology* 113: 39.
- Bozkurt, M., Sezgic, M., Karakol, P., Uslu, C., Balikci, T. 2019. The Effect of Antioxidants on Ischemia-Reperfusion Injury in Flap Surgery. En Shalaby, E. (ed.), *Antioxidants*, IntechOpen.
- Braunersreuther, V., Montecucco, F., Ashri, M., Pelli, G., Galan, K., Frias, M., Burger, F. *et al.* 2013. Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 64: 99-107.
- Braunwald, E. 1974. The Reduction of Infarct Size — An Idea Whose Time (For Testing) Has Come. *Circulation* 50: 206-209.
- Braunwald, E., Rutherford, J.D. 2016. Limitation of Infarct Size and the Open Artery Hypothesis: A Conversation With Eugene Braunwald, MD. *Circulation* 134: 839-846.
- Bucolo, C., Drago, F., Maisto, R., Romano, G.L., D'Agata, V., Maugeri, G., Giunta, S. 2019. Curcumin prevents high glucose

damage in retinal pigment epithelial cells through ERK1/2-mediated activation of the Nrf2/HO-1 pathway: BUCOLO *ET AL.* *Journal of Cellular Physiology* 234: 17295-17304.

- Buelna-Chontal, M., Guevara-Chávez, J.-G., Silva-Palacios, A., Medina-Campos, O.-N., Pedraza-Chaverri, J., Zazueta, C. 2014. Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radical Biology and Medicine* 74: 145-156.
- Buelna-Chontal, M., Zazueta, C. 2013a. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: A double end sword? *Cellular Signalling* 25: 2548-2557.
- Buelna-Chontal, M., Zazueta, C. 2013b. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: A double end sword? *Cellular Signalling* 25: 2548-2557.
- Buja, L.M., Vander Heide, R.S. 2016. Pathobiology of Ischemic Heart Disease: Past, Present and Future. *Cardiovascular Pathology* 25: 214-220.
- Burgoyne, J.R. 2012. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circulation Research* 111: 1091-1106.
- Buscà, R. 2016. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4: .
- Cadenas, E. 2004. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular Aspects of Medicine* 25: 17-26.
- Cadenas, S. 2018. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 117: 76-89.

- Callegari, A., Liu, Y., White, C.C., Chait, A., Gough, P., Raines, E.W., Cox, D. *et al.* 2011. Gain and Loss of Function for Glutathione Synthesis: Impact on Advanced Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31: 2473-2482.
- Caricati-Neto, A., Errante, P.R., Menezes-Rodrigues, F.S. 2019. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 4002.
- Casin, K.M., Fallica, J., Mackowski, N., Veenema, R.J., Chan, A., St. Paul, A., Zhu, G. *et al.* 2018. S -Nitrosoglutathione Reductase Is Essential for Protecting the Female Heart From Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation Research* 123: 1232-1243.
- Chao, C.-C., Ma, Y.-S., Stadtman, E.R. 1997. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 2969-2974.
- Chaudhuri, R.D., Rana, S., Datta, K., Sarkar, S. 2019. Key Cellular Effectors in ROS-Mediated Cardiac Diseases. En Chakraborti, S., Dhalla, N. S., Dikshit, M., Ganguly, N. K. (eds.), *Modulation of Oxidative Stress in Heart Disease*, pp. 151-195. Springer Singapore, Singapore.
- Chen, H.-F. 2019. Regulation of Dual-Specificity Phosphatase (DUSP) Ubiquitination and Protein Stability. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 2668.
- Chen, Y., Ba, L., Huang, W., Liu, Y., Pan, H., Mingyao, E., Shi, P. *et al.* 2017. Role of carvedilol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of

MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. *European Journal of Pharmacology* 796: 90-100.

- Chen, Z. 2014. The histone acetyltransferase hMOF acetylates Nrf2 and regulates anti-drug responses in human non-small cell lung cancer: hMOF acetylates Nrf2 and regulates drug resistance. *British Journal of Pharmacology* 171: 3196-3211.
- Chen, Zeng, H., Tuo, Q.-H., Yu, H., Meyrick, B., Aschner, J.L. 2007. NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 292: H1664-H1674.
- Cheng, W.-H. 2019. Green Tea: An Ancient Antioxidant Drink for Optimal Health? *The Journal of Nutrition* 149: 1877-1879.
- Chen-Roetling, J., Regan, R.F. 2017. Targeting the Nrf2-Heme Oxygenase-1 Axis after Intracerebral Hemorrhage. *Current Pharmaceutical Design* 23: .
- Chiu, P.Y., Chen, N., Leong, P.K., Leung, H.Y., Ko, K.M. 2011. Schisandrin B elicits a glutathione antioxidant response and protects against apoptosis via the redox-sensitive ERK/Nrf2 pathway in H9c2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 350: 237-250.
- Ciacci Pardo, A., Scuri, S., González Arbeláez, L.F., Caldiz, C., Fantinelli, J., Mosca, S.M. 2018. Survival kinase-dependent pathways contribute to gender difference in the response to myocardial ischemia-reperfusion and ischemic post-conditioning. *Cardiovascular Pathology* 33: 19-26.

- Cohen, M.V. 2008. Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Research in Cardiology* 103: 464-471.
- Cohen, M.V., Yang, X.M., Liu, G.S., Heusch, G., Downey, J.M. 2001. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circulation Research* 89: 273-278.
- Collins, Y., Chouchani, E.T., James, A.M., Menger, K.E., Cocheme, H.M., Murphy, M.P. 2012. Mitochondrial redox signalling at a glance. *Journal of Cell Science* 125: 1837-1837.
- Corcoran, A., Cotter, T.G. 2013. Redox regulation of protein kinases. *FEBS Journal* 280: 1944-1965.
- Correa, F., Buelna-Chontal, M., Chagoya, V., García-Rivas, G., Viguera, R.M., Pedraza-Chaverri, J., García-Niño, W.R. *et al.* 2015. Inhibition of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway limited the cardioprotective effect of post-conditioning in hearts with apical myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology* 765: 472-481.
- Correa, F., Zazueta, C. 2009. Mecanismos moleculares involucrados en las estrategias mecánicas para evitar el daño por reperfusión en el miocardio isquémico. . *p.*14.
- Dagnell, M., Cheng, Q., Rizvi, S.H.M., Pace, P.E., Boivin, B., Winterbourn, C.C., Arnér, E.S.J. 2019. Bicarbonate is essential for protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) oxidation and cellular signaling through EGF-triggered phosphorylation cascades. *Journal of Biological Chemistry* 294: 12330-12338.

- Dai, D., Sun, X., Ding, J., Chen, Y., Hu, S. 2018. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Gene* 672: 72-78.
- Danielisová, V. 2008. Effects of Bradykinin Postconditioning on Endogenous Antioxidant Enzyme Activity After Transient Forebrain Ischemia in Rat. *Neurochemical Research* 33: 1057-1064.
- Danielisová, V. 2006. The Changes in Endogenous Antioxidant Enzyme Activity After Postconditioning. *Cellular and Molecular Neurobiology* 26: 1179-1189.
- D'Annunzio, V., Perez, V., Boveris, A., Gelpi, R.J., Poderoso, J.J. 2016. Role of thioredoxin-1 in ischemic preconditioning, postconditioning and aged ischemic hearts. *Pharmacological Research* 109: 24-31.
- Darling, C.E., Jiang, R., Maynard, M., Whittaker, P., Vinten-Johansen, J., Przyklenk, K. 2005. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289: H1618-H1626.
- Davis, S.M., Collier, L.A., Goodwin, S., Lukins, D.E., Powell, D.K., Pennypacker, K.R. 2019. Efficacy of leukemia inhibitory factor as a therapeutic for permanent large vessel stroke differs among aged male and female rats. *Brain Research* 1707: 62-73.
- Deng, Y. 2010. Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48: 331-341.

- Deutsch, J.C. 1998. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry* 255: 1-7.
- Díaz-Ruíz, J.-L., Macías-López, A., Alcalá-Vargas, F., Guevara-Chávez, J.-G., Mejía-Urbe, A., Silva-Palacios, A., Zúñiga-Muñoz, A. *et al.* 2019. Redox signaling in ischemic postconditioning protection involves PKC ϵ and Erk1/2 pathways and converges indirectly in Nrf2 activation. *Cellular Signalling* 109417.
- Diez, E., Sánchez, J., Prado, N., Ponce Zumino, A., García-Dorado, D., Miatello, R., Rodríguez-Sinovas, A. 2019. Ischemic Postconditioning Reduces Reperfusion Arrhythmias by Adenosine Receptors and Protein Kinase C Activation but Is Independent of KATP Channels or Connexin 43. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5927.
- Dikalov, S. 2007. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* 49: 717-727.
- Dirksen, M. 2007. Reperfusion injury in humans: A review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovascular Research* 74: 343-355.
- Dong, S., Teng, Z., Lu, F., Zhao, Y., Li, H., Ren, H., Chen, H. *et al.* 2010. Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC ϵ -interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk. *Molecular and Cellular Biochemistry* 341: 195-206.
- Doul, J., Miková, D., Rašková, M., Ošťádalová, I., Maxová, H., Ošťádal, B., Charvátová, Z. 2019. Possible role of mitochondrial K-ATP channel and nitric oxide in protection

of the neonatal rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 450: 35-42.

- Douzinis, E.E., Apeiranthitis, A. 2019. Basic Mechanisms of Ischemia/Reperfusion Injury Leading to Cellular and Tissue Damage: Therapeutic Implications. En Chakraborti, S., Dhalla, N. S., Dikshit, M., Ganguly, N. K. (eds.), *Modulation of Oxidative Stress in Heart Disease*, pp. 645-670. Springer Singapore, Singapore.
- Dustin, C.M., Hristova, M., Schiffers, C., van der Vliet, A. 2019. Proteomic Methods to Evaluate NOX-Mediated Redox Signaling. En Knaus, U. G., Leto, T. L. (eds.), *NADPH Oxidases*, pp. 497-515. Springer New York, New York, NY.
- Eggler, A.L. 2009. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochemical Journal* 422: 171-180.
- Emanuele, S., D'Anneo, A., Calvaruso, G., Cernigliaro, C., Giuliano, M., Lauricella, M. 2018. The Double-Edged Sword Profile of Redox Signaling: Oxidative Events As Molecular Switches in the Balance between Cell Physiology and Cancer. *Chemical Research in Toxicology* 31: 201-210.
- Fang, J. 2008. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiologica* 63: 377-387.
- Fão, L., Mota, S.I., Rego, A.C. 2019. c-Src regulates Nrf2 activity through PKC δ after oxidant stimulus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866: 686-698.

- Feigin, V.L., Forouzanfar, M.H., Krishnamurthi, R., Mensah, G.A., Connor, M., Bennett, D.A., Moran, A.E. *et al.* 2014. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 383: 245-255.
- Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N. 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Analytical Biochemistry* 190: 212-219.
- Ferro, D., Bakiu, R., De Pittà, C., Boldrin, F., Cattalini, F., Pucciarelli, S., Miceli, C., Santovito, G. 2015. Cu,Zn Superoxide Dismutases from *Tetrahymena thermophila*: Molecular Evolution and Gene Expression of the First Line of Antioxidant Defenses. *Protist* 166: 131-145.
- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 194: 7-15.
- Forman, H.J., Ursini, F., Maiorino, M. 2014. An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73: 2-9.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Gao, X., Wei, K., Hu, B., Xu, K., Tang, B. 2019. Ascorbic acid induced HepG2 cells' apoptosis via intracellular reductive stress. *Theranostics* 9: 4233-4240.
- García-Rivas, G. de J., Carvajal, K., Correa, F., Zazueta, C. 2006. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *British Journal of Pharmacology* 149: 829-837.

- Gartz, M., Darlington, A., Afzal, M.Z., Strande, J.L. 2018. Exosomes exert cardioprotection in dystrophin-deficient cardiomyocytes via ERK1/2-p38/MAPK signaling. *Scientific Reports* 8: 16519.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.-C., Chaudière, J. 1998. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* 11: 1176-1183.
- Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L., Davis, R.J. 1991. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 22159-22163.
- Gordan, R., Wongjaikam, S., Fefelova, N., Siri-Angkul, N., Gwathmey, J.K., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., Xie, L.-H. 2018. Abstract 254: Mitochondrial Permeability Transition Pore, Calcium Uniporter, and Iron Overload in the Heart. *Circulation Research* 123: .
- Gouweleeuw, L., Hovens, I.B., Liu, H., Naudé, P.J.W., Schoemaker, R.G. 2016. Differences in the association between behavior and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in male and female rats after coronary artery ligation. *Physiology & Behavior* 163: 7-16.
- Granfeldt, A., Lefer, D.J., Vinten-Johansen, J. 2009. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Research* 83: 234-246.

- Granger, D.N. 1988. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 255: H1269-H1275.
- Gumieniczek, A. 2005. Modification of oxidative stress by pioglitazone in the heart of alloxan-induced diabetic rabbits. *Journal of Biomedical Science* 12: 531-537.
- Guo, Y. 2015. Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 88: 337-349.
- Gupta, S. 2007. Cardiac Hypertrophy: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 9: 623-652.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hancock, J., Whiteman, M. 2018. Cellular Redox Environment and Its Influence on Redox Signaling Molecules. *Reactive Oxygen Species*.
- Handy, D.E., Loscalzo, J. 2017. Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free Radical Biology and Medicine* 109: 114-124.
- Hanschmann, E.-M. 2013. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 19: 1539-1605.
- Harhous, Z., Pillot, B., Augeul, L., Kurdi, M., Ovize, M., Bidaux, G. 2019. Deciphering the crosslink between STAT3 and MAPKs during Ischemia/reperfusion and postconditioning. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 11: 109.

- Hassouna, A., Loubani, M., Matata, B., Fowler, A., Standen, N., Galinanes, M. 2006. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovascular Research* 69: 450-458.
- Hausenloy, D. 2004. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular Research* 61: 448-460.
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T. 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 39: 199-218.
- Henkel, R., Sandhu, I.S., Agarwal, A. 2019. The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? *Andrologia* 51: e13162.
- Hernández-Reséndiz, S., Zazueta, C. 2014. PHO-ERK1/2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling. *Life Sciences* 108: 13-21.
- Hess, M., Manson, N. 1984. Molecular oxygen: Friend and foe*The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 16: 969-985.
- Heusch, G. 2015. Molecular Basis of Cardioprotection: Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circulation Research* 116: 674-699.
- Heusch, G. 2019. Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what?

American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 316: H1439-H1446.

- Hiles, I.D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M.J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G. *et al.* 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: Structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70: 419-429.
- Hogg, N. 1992. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochemical Journal* 281: 419-424.
- Huang. 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 42769-42774.
- Huang, S.-W., Chi, W.-C., Chang, K.-H., Yen, C.-F., Liao, H.-F., Escorpizo, R., Liou, T.-H. 2018. World health organization disability assessment schedule 2.0 as an objective assessment tool for predicting return to work after a stroke. *Disability and Rehabilitation* 40: 2592-2597.
- Huang, W.-J., Zhang, X., Chen, W.-W. 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports* 4: 519-522.
- Huang, Y. 2015. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26: 1401-1413.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54: 287-293.

- Ikeda, Y., Miura, T., Sakamoto, J., Miki, T., Tanno, M., Kobayashi, H., Ohori, K. *et al.* 2006. Activation of ERK and suppression of calcineurin are interacting mechanisms of cardioprotection afforded by delta-opioid receptor activation. *Basic Research in Cardiology* 101: 418-426.
- Imber, M., Pietrzyk-Brzezinska, A.J., Antelmann, H. 2019. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in Gram-positive bacteria. *Redox Biology* 20: 130-145.
- INEGI. Estadística de defunciones generales. Síntesis Metodológica.
- Inoguchi, T. 2003. Protein Kinase C-Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase. *Journal of the American Society of Nephrology* 14: 227S - 232.
- Jaffe, M.D., Quinn, N.K. 1980. Warm-up phenomenon in angina pectoris. *Lancet (London, England)* 2: 934-936.
- Jaiswal, A.K. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology & Medicine* 36: 1199-1207.
- Jennings, R.B., Sommers, H.M., Herdson, P.B., Kaltenbach, J.P. 1969. ISCHEMIC INJURY OF MYOCARDIUM. *Annals of the New York Academy of Sciences* 156: 61-78.
- Jiki, Z. 2018. Cardiovascular Benefits of Dietary Melatonin: A Myth or a Reality? *Frontiers in Physiology* 9: 528.
- Jin, L., Cao, Y., Zhang, T., Wang, P., Ji, D., Liu, X., Shi, H. *et al.* 2017. Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2

phosphorylation and cell survival in glioma cells. *International Journal of Molecular Medicine*.

Jin, M. 2012. Ethanol-Mediated Regulation of Cytochrome P450 2A6 Expression in Monocytes: Role of Oxidative Stress-Mediated PKC/MEK/Nrf2 Pathway. *PLoS ONE* 7: e35505.

Johnson, W., Onuma, O. 2016. Stroke: a global response is needed. *Bulletin of the World Health Organization* 94: 634-634A.

Kagan, V.E. 2018. *Lipid peroxidation in biomembranes*. 1.^a ed. CRC Press.

Kalogeris, T. 2012. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. En *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp. 229-317. Elsevier.

Kalogeris, T., Bao, Y., Korthuis, R.J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology* 2: 702-714.

Kannan, S., Muthusamy, V.R., Whitehead, K.J., Wang, L., Gomes, A.V., Litwin, S.E., Kensler, T.W. *et al.* 2013. Nrf2 deficiency prevents reductive stress-induced hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 100: 63-73.

Kapur, N.K., Annamalai, S., Reyelt, L., Karmiy, S.J., Razavi, A.A., Foroutanjazi, S., Chennojwala, A., Ishikawa, K. 2018. From bedside to bench and back again: translational studies of mechanical unloading of the left ventricle to promote recovery after acute myocardial infarction. *F1000Research* 7: 1852.

Kapur, N.K., Reyelt, L., Swain, L., Esposito, M., Qiao, X., Annamalai, S., Meyns, B., Smalling, R. 2019. Mechanical Left Ventricular

Unloading to Reduce Infarct Size During Acute Myocardial Infarction: Insight from Preclinical and Clinical Studies. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 12: 87-94.

Kawai, Y. 2011. Acetylation-Deacetylation of the Transcription Factor Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2) Regulates Its Transcriptional Activity and Nucleocytoplasmic Localization. *Journal of Biological Chemistry* 286: 7629-7640.

Kim, T.-H., Vemuganti, R. 2015. Effect of Sex and Age Interactions on Functional Outcome after Stroke. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 21: 327-336.

Kitakaze, M. 2010. How to Mediate Cardioprotection in Ischemic Hearts—Accumulated Evidence of Basic Research Should Translate to Clinical Medicine. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 24: 217-223.

Knock, G.A., Ward, J.P.T. 2011. Redox Regulation of Protein Kinases as a Modulator of Vascular Function. *Antioxidants & Redox Signaling* 15: 1531-1547.

Konigsberg, M. 2007. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* 26: .

Korosoglou, G., Giusca, S., Katus, H.A. 2018. The coronary calcium paradox: Yet another step towards the differentiation between stable and rupture-prone coronary plaques? *Atherosclerosis* 274: 232-234.

Kuck, J.L., Bastarache, J.A., Shaver, C.M., Fessel, J.P., Dikalov, S.I., May, J.M., Ware, L.B. 2018. Ascorbic acid attenuates

endothelial permeability triggered by cell-free hemoglobin.
Biochemical and Biophysical Research Communications 495: 433-437.

- Kumar, B., Roy, A., Asha, K., Sharma-Walia, N., Ansari, M.A., Chandran, B. 2019. HACE1, an E3 Ubiquitin Protein Ligase, Mitigates Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection-Induced Oxidative Stress by Promoting Nrf2 Activity Jung, J. U. (ed.), *Journal of Virology* 93: e01812-18, /jvi/93/9/JVI.01812-18.atom.
- Kuster, D.W.D., Merkus, D., Jorna, H.J.J., Dekkers, D.H.W., Duncker, D.J., Verhoeven, A.J.M. 2011. Nuclear protein extraction from frozen porcine myocardium. *Journal of Physiology and Biochemistry* 67: 165-173.
- Lacher, S.E., Lee, J.S., Wang, X., Campbell, M.R., Bell, D.A., Slattery, M. 2015. Beyond antioxidant genes in the ancient Nrf2 regulatory network. *Free Radical Biology and Medicine* 88: 452-465.
- Lagranha, C.J., Deschamps, A., Aponte, A., Steenbergen, C., Murphy, E. 2010. Sex Differences in the Phosphorylation of Mitochondrial Proteins Result in Reduced Production of Reactive Oxygen Species and Cardioprotection in Females. *Circulation Research* 106: 1681-1691.
- Lai, Z., Zhang, L., Su, J., Cai, D., Xu, Q. 2016. Sevoflurane postconditioning improves long-term learning and memory of neonatal hypoxia-ischemia brain damage rats via the PI3K/Akt-mPTP pathway. *Brain Research* 1630: 25-37.
- Laurindo, F.R.M. 2018. Redox Cellular Signaling Pathways in Endothelial Dysfunction and Vascular Disease. En *Endothelium and Cardiovascular Diseases*, pp. 127-145. Elsevier.

- Lee, H.-L. 2012. Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302: H1410-H1422.
- Lee, M.Y., Griendling, K.K. 2008. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling* 10: 1045-1059.
- Leung, G.P., Feng, T., Sigoillot, F.D., Geyer, F.C., Shirley, M.D., Ruddy, D.A., Rakiec, D.P. *et al.* 2019. Hyperactivation of MAPK Signaling Is Deleterious to RAS/RAF-mutant Melanoma. *Molecular Cancer Research* 17: 199-211.
- Levinthal, D.J., DeFranco, D.B. 2005. Reversible Oxidation of ERK-directed Protein Phosphatases Drives Oxidative Toxicity in Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 280: 5875-5883.
- Li, A.-L., Shen, T., Wang, T., Zhou, M.-X., Wang, B., Song, J.-T., Zhang, P.-L. *et al.* 2019. Novel diterpenoid-type activators of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway and their regulation of redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine* 141: 21-33.
- Li, H., Wang, Y., Wei, C., Bai, S., Zhao, Y., Li, H., Wu, B. *et al.* 2015. Mediation of exogenous hydrogen sulfide in recovery of ischemic post-conditioning-induced cardioprotection via down-regulating oxidative stress and up-regulating PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in isolated aging rat hearts. *Cell & Bioscience* 5: 11.
- Li, Kong, A.-N. 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular Carcinogenesis* 48: 91-104.

- Liu, L., Vollmer, M.K., Fernandez, V.M., Dweik, Y., Kim, H., Doré, S. 2018. Korean Red Ginseng Pretreatment Protects Against Long-Term Sensorimotor Deficits After Ischemic Stroke Likely Through Nrf2. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12: 74.
- Liu, Yang, X.-M., Iliodromitis, E.K., Kremastinos, D.T., Dost, T., Cohen, M.V., Downey, J.M. 2008. Redox signaling at reperfusion is required for protection from ischemic preconditioning but not from a direct PKC activator. *Basic Research in Cardiology* 103: 54-59.
- Lobo, V. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118.
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., Dulak, J. 2016. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 3221-3247.
- Magesh, S. 2012. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews* 32: 687-726.
- Manning, A.S., Coltart, D.J., Hearse, D.J. 1984. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circulation Research* 55: 545-548.
- Mao, L.-M., Wang, J.Q. 2016. Regulation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors by MAPK/ERK in Neurons. *Journal of Nature and Science* 2: .

- Maor, E., Prasad, A. 2018. Role of Ischemia–Reperfusion Injury in Coronary MVO. En *Coronary Microvascular Obstruction in Acute Myocardial Infarction*, pp. 97-107. Elsevier.
- Marnett, L.J. 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424: 83-95.
- Maroko, P.R. 1971. Factors Influencing Infarct Size Following Experimental Coronary Artery Occlusions. *Circulation* 43: 67-82.
- Maroko, P.R. 1972. Reduction by Hyaluronidase of Myocardial Necrosis following Coronary Artery Occlusion. *Circulation* 46: 430-437.
- Mastantuono, T., Di Maro, M., Chiurazzi, M., Battiloro, L., Muscariello, E., Nasti, G., Starita, N. *et al.* 2018. Rat Pial Microvascular Changes During Cerebral Blood Flow Decrease and Recovery: Effects of Cyanidin Administration. *Frontiers in Physiology* 9: 540.
- Mausser, M. 1985. Influence of ribose, adenosine, and «AICAR» on the rate of myocardial adenosine triphosphate synthesis during reperfusion after coronary artery occlusion in the dog. *Circulation Research* 56: 220-230.
- Mebratu, Y., Tesfaigzi, Y. 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8: 1168-1175.
- Meijles, D.N., Zoumpoulidou, G., Markou, T., Rostron, K.A., Patel, R., Lay, K., Handa, B.S. *et al.* 2019. The cardiomyocyte “redox rheostat”: Redox signalling via the AMPK-mTOR axis and

regulation of gene and protein expression balancing survival and death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 129: 118-129.

- Meng, Q.-T., Cao, C., Wu, Y., Liu, H.-M., Li, W., Sun, Q., Chen, R. *et al.* 2016. Ischemic post-conditioning attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia–reperfusion in mice: role of Nrf2. *Laboratory Investigation* 96: 1087-1104.
- Mishina, N.M., Markvicheva, K.N., Fradkov, A.F., Zagaynova, E.V., Schultz, C., Lukyanov, S., Belousov, V.V. 2013. Imaging H₂O₂ Microdomains in Receptor Tyrosine Kinases Signaling. En *Methods in Enzymology*, pp. 175-187. Elsevier.
- Missinato, M.A., Saydmohammed, M., Zuppo, D.A., Rao, K.S., Opie, G.W., Kühn, B., Tsang, M. 2018. Dusp6 attenuates Ras/MAPK signaling to limit zebrafish heart regeneration. *Development* 145: dev157206.
- Montecinos, V., Guzmán, P., Barra, V., Villagrán, M., Muñoz-Montesino, C., Sotomayor, K., Escobar, E. *et al.* 2007. Vitamin C Is an Essential Antioxidant That Enhances Survival of Oxidatively Stressed Human Vascular Endothelial Cells in the Presence of a Vast Molar Excess of Glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 282: 15506-15515.
- Monteiro, H.P., Albuquerque, M.T.O.M., Rocha Oliveira, C.J., Curcio, M.F. 2018. Signal Transduction Pathways in Endothelial Cells: Implications for Angiogenesis. En *Endothelium and Cardiovascular Diseases*, pp. 23-36. Elsevier.
- Morelli, N.R., Scavuzzi, B.M., Miglioranza, L.H. da S., Lozovoy, M.A.B., Simão, A.N.C., Dichi, I. 2018. Metabolic syndrome

- components are associated with oxidative stress in overweight and obese patients. *Archives of Endocrinology and Metabolism*.
- Murry, C.E. 1990. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode Jennings, R. B. (ed.), *Circulation Research* 66: 913-931.
- Murry, C.E. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136.
- Nam, L.B., Keum, Y.-S. 2019. Binding partners of NRF2: Functions and regulatory mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 678: 108184.
- Narasimhan, M., Rajasekaran, N.S. 2015. Reductive potential — A savior turns stressor in protein aggregation cardiomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852: 53-60.
- Nauser, T., Koppenol, W.H. 2002. The Rate Constant of the Reaction of Superoxide with Nitrogen Monoxide: Approaching the Diffusion Limit. *The Journal of Physical Chemistry A* 106: 4084-4086.
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A. *et al.* 2014. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 21: 66-85.
- Ng, M.Y., Wang, M., Casey, P.J., Gan, Y.-H., Hagen, T. 2017. Activation of MAPK/ERK signaling by Burkholderia pseudomallei cycle inhibiting factor (Cif) Park, J.-I. (ed.), *PLOS ONE* 12: e0171464.

- Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M. *et al.* 2011. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 10349-10354.
- Östman, A. 2011. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *The Journal of Biochemistry* 150: 345-356.
- Owolabi, M., Akarolo-Anthony, S., Akinyemi, R., Arnett, D., Gebregziabher, M., Jenkins, C., Tiwari, H. *et al.* 2015. The burden of stroke in Africa: a glance at the present and a glimpse into the future: review article. *Cardiovascular Journal Of Africa* 26: S27-S38.
- Pagliari, P., Femminò, S., Popara, J., Penna, C. 2018. Mitochondria in Cardiac Postconditioning. *Frontiers in Physiology* 9: 287.
- Pandian, J.D., Gall, S.L., Kate, M.P., Silva, G.S., Akinyemi, R.O., Ovbiagele, B.I., Lavados, P.M. *et al.* 2018. Prevention of stroke: a global perspective. *The Lancet* 392: 1269-1278.
- Paulsen, C.E., Carroll, K.S. 2010. Orchestrating Redox Signaling Networks through Regulatory Cysteine Switches. *ACS Chemical Biology* 5: 47-62.
- Pavón, N., Martínez-Abundis, E., Hernández, L., Gallardo-Pérez, J.C., Alvarez-Delgado, C., Cerbón, M., Pérez-Torres, I. *et al.* 2012. Sexual hormones: Effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia–reperfusion in adult rats. Gender difference. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 132: 135-146.

- Peake, B.F., Nicholson, C.K., Lambert, J.P., Hood, R.L., Amin, H., Amin, S., Calvert, J.W. 2013. Hydrogen sulfide preconditions the *db/db* diabetic mouse heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 signaling in an Erk-dependent manner. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 304: H1215-H1224.
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química* 17: 164.
- Pell, V.R. 2016. Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy. *Circulation Research* 118: 898-906.
- Penna. 2009. Cardioprotection: A radical view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 781-793.
- Penna. 2007. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovascular Research* 75: 168-177.
- Penna. 2012. Mitochondrial Pathways, Permeability Transition Pore, and Redox Signaling in Cardioprotection: Therapeutic Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 18: 556-599.
- Penna. 2006. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Research in Cardiology* 101: 180-189.
- Penna. 2011. Post-ischemic early acidosis in cardiac postconditioning modifies the activity of antioxidant enzymes, reduces nitration, and favors protein S-nitrosylation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 462: 219-233.

- Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., Pagliaro, P. 2009. Cardioprotection: A radical view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 781-793.
- Penna, C., Tullio, F., Merlino, A., Moro, F., Raimondo, S., Rastaldo, R., Perrelli, M.-G. *et al.* 2009. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Research in Cardiology* 104: 390-402.
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., Rubio-Ruiz, M.E. 2017. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 2098.
- Peris, E., Micallef, P., Paul, A., Palsdottir, V., Enejder, A., Bauzá-Thorbrügge, M., Olofsson, C.S., Wernstedt Asterholm, I. 2019. Antioxidant treatment induces reductive stress associated with mitochondrial dysfunction in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 294: 2340-2352.
- Pimentel, D.R., Adachi, T., Ido, Y., Heibeck, T., Jiang, B., Lee, Y., Melendez, J.A. *et al.* 2006. Strain-stimulated hypertrophy in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species-dependent Ras S-glutathiolation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41: 613-622.
- Ping, P., Zhang, J., Cao, X., Li, R.C.X., Kong, D., Tang, X.-L., Qiu, Y. *et al.* 1999. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276: H1468-H1481.

- Poganik, J.R., Long, M.J.C., Aye, Y. 2019. *Post-transcriptional regulation of Nrf2-mRNA by the mRNA-binding proteins HuR and AUF1*. *Biochemistry*.
- Polshekan, M., Jamialahmadi, K., Khori, V., Alizadeh, A.M., Saeidi, M., Ghayour-Mobarhan, M., Jand, Y. *et al.* 2016. RISK pathway is involved in oxytocin postconditioning in isolated rat heart. *Peptides* 86: 55-62.
- Pryor, W.A. 1976. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11: 370-379.
- Purcell, N.H., Wilkins, B.J., York, A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., Robbins, J., Molkenstin, J.D. 2007. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 14074-14079.
- Qin, S., Hou, D.-X. 2016. Multiple regulations of Keap1/Nrf2 system by dietary phytochemicals. *Molecular Nutrition & Food Research* 60: 1731-1755.
- Querio, G., Antoniotti, S., Foglietta, F., Berteza, C.M., Canaparo, R., Gallo, M.P., Levi, R. 2018. Chamazulene Attenuates ROS Levels in Bovine Aortic Endothelial Cells Exposed to High Glucose Concentrations and Hydrogen Peroxide. *Frontiers in Physiology* 9: 246.
- Quinn, G., Gary, P.J., Damiano, C., Teehan, G. 2018. Treatment of Resistant Hypertension: An Update in Device Therapy. En Artis, A. S. (ed.), *Blood Pressure - From Bench to Bed*, InTech.

- Raedschelders, K. 2012. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics* 133: 230-255.
- Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A.P., Sethi, G., Perumal, E. 2018. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biology* 17: 297-314.
- Rajasekaran, N.S., Connell, P., Christians, E.S., Yan, L.-J., Taylor, R.P., Orosz, A., Zhang, X.Q. *et al.* 2007. Human alpha B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Cell* 130: 427-439.
- Ramírez-Camacho, I., Correa, F., El Hafidi, M., Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Esparza-Perusquía, M., Olvera-Sánchez, S. *et al.* 2018. Cardioprotective strategies preserve the stability of respiratory chain supercomplexes and reduce oxidative stress in reperfused ischemic hearts. *Free Radical Biology and Medicine* 129: 407-417.
- Ray, P.D. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24: 981-990.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.-S., Yang, K.-S., Woo, H.A. 2005. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 183-189.
- Sairam, T., Shanmugam, G., Narasimhan, M., Subramanian, M., Patel, A.N., Gopalan, R., Sankaran, R., Soorappan, R.N. 2017. Evidence for Reductive Stress in the Heart Failure Patients. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 112: 149-150.

- Sanada, S., Komuro, I. 2011. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301: H1723-H1741.
- Santillo, M., Pagliaro, P. 2018. Editorial: Redox and Nitrosative Signaling in Cardiovascular System: From Physiological Response to Disease. *Frontiers in Physiology* 9: 1538.
- Santos, A.I., Carreira, B.P., Izquierdo-Álvarez, A., Ramos, E., Lourenço, A.S., Filipa Santos, D., Morte, M.I. *et al.* 2018. S-Nitrosylation of Ras Mediates Nitric Oxide-Dependent Post-Injury Neurogenesis in a Seizure Model. *Antioxidants & Redox Signaling* 28: 15-30.
- Santos, C.X.C. 2011. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 50: 777-793.
- Schieber, M., Chandel, N.S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 24: R453-R462.
- Schmidt, H.H.H.W., Stocker, R., Vollbracht, C., Paulsen, G., Riley, D., Daiber, A., Cuadrado, A. 2015. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* 23: 1130-1143.
- Schwartz, L.M., Lagranha, C.J. 2006. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290: H1011-H1018.
- Selvamani, A., Sohrabji, F. 2017. Mir363-3p improves ischemic stroke outcomes in female but not male rats. *Neurochemistry International* 107: 168-181.

- Separham, A., Ghaffari, S., Najafi, H., Ghaffari, R., Ziaee, M., Babaei, H. 2016. The Impact of Allopurinol on Patients With Acute ST Elevation Myocardial Infarction Undergoing Thrombolytic Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 68: 265-268.
- Shahid, S.U., Shabana, Humphries, S. 2018. The SNP rs10911021 is associated with oxidative stress in coronary heart disease patients from Pakistan. *Lipids in Health and Disease* 17: 6.
- Shanmugam, G. 2017. Constitutive activation of Nrf2 induces a stable reductive state in the mouse myocardium. *Redox Biology* 12: 937-945.
- Shaw, P., Chattopadhyay, A. 2019. Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *Journal of Cellular Physiology* jcp.29219.
- Shen, G., Hebbar, V., Nair, S., Xu, C., Li, W., Lin, W., Keum, Y.-S. *et al.* 2004. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 23052-23060.
- Shen, Y., Liu, X., Shi, J., Wu, X. 2019. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury. *International Journal of Biological Macromolecules* 125: 496-502.
- Shimizu, M., Tropak, M., Diaz, R.J., Suto, F., Surendra, H., Kuzmin, E., Li, J. *et al.* 2009. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clinical Science* 117: 191-200.

- Siegmund, B. 1992. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 263: H1262-H1269.
- Sies, H. 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 11: 613-619.
- Sies, H. 2019. Oxidative Stress. En *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*, pp. 153-163. Elsevier.
- Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Sánchez-Garibay, C., Rojas-Morales, P., Galván-Arzate, S., Buelna-Chontal, M., Pavón, N. *et al.* 2019. Sulforaphane protects from myocardial ischemia-reperfusion damage through the balanced activation of Nrf2/AhR. *Free Radical Biology and Medicine* 143: 331-340.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S. 2019. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24: 1583.
- Singh, V., Mishra, V.N., Chaurasia, R.N., Joshi, D., Pandey, V. 2019. Modes of Calcium Regulation in Ischemic Neuron. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 34: 246-253.
- Sinning, C., Clemmensen, P. 2017. Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives. *Biomarkers in Medicine* 11: 11031-1040.
- Sivaramakrishnan, S. 2010. Protection of a single-cysteine redox switch from oxidative destruction: On the functional role of sulfenyl amide formation in the redox-regulated enzyme PTP1B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20: 444-447.

- Soorappan, R.N., Shanmugam, G., Wang, D., Fernandez, J., Jones, D.P., Abel, D.E., Ping, P. 2019. Chronic Reductive Stress Impairs Endoplasmic Reticulum Function and Cause Proteotoxic Cardiac Disease. *The FASEB Journal* 33: 532.18-532.18.
- Sorriento, D. 2018. The Antioxidant Therapy: New Insights in the Treatment of Hypertension. *Frontiers in Physiology* 9: 258.
- Spoelstra-de Man, A.M.E., Elbers, P.W.G., Oudemans-van Straaten, H.M. 2018. Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury. *Critical Care* 22: 70.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218.
- Strohm, C. 2000. Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36: 218-229.
- Subedi, L., Lee, J.H., Yumnam, S., Ji, E., Kim, S.Y. 2019. Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- κ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells* 8: 194.
- Sun. 2009a. Phosphorylation of Nrf2 at Multiple Sites by MAP Kinases Has a Limited Contribution in Modulating the Nrf2-Dependent Antioxidant Response. *PLoS ONE* 4: e6588.
- Sun, M.-H., Chen, X.-C., Han, M., Yang, Y.-N., Gao, X.-M., Ma, X., Huang, Y. *et al.* 2019. Cardioprotective effects of constitutively active MEK1 against H₂O₂-induced apoptosis and autophagy

in cardiomyocytes via the ERK1/2 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 512: 125-130.

- Sun, Z. 2009b. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP Augments Promoter-Specific DNA Binding of Nrf2 during the Antioxidant Response. *Molecular and Cellular Biology* 29: 2658-2672.
- Szydlowska, K., Tymianski, M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47: 122-129.
- Takano, N., Amiya, E., Oguri, G., Nakayama, A., Taya, M., Nakajima, T., Morita, H., Komuro, I. 2019. Influence of atrial fibrillation on oxygen uptake and exercise tolerance in cardiovascular patients; close association with heart rate response. *IJC Heart & Vasculature* 22: 84-91.
- Takaya, K., Suzuki, T., Motohashi, H., Onodera, K., Satomi, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M. 2012. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine* 53: 817-827.
- Tanaka, K. 2014. Opioid-induced cardioprotection. *Current Pharmaceutical Design* 20: 5696-5705.
- Tebay, L.E., Robertson, H., Durant, S.T., Vitale, S.R., Penning, T.M., Dinkova-Kostova, A.T., Hayes, J.D. 2015. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine* 88: 108-146.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P. *et al.* 2014. Oxidative Stress and Its Significant

Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 193-217.

- Tönnies, E., Trushina, E. 2017. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 57: 1105-1121.
- Traore, K., Sharma, R., Thimmulappa, R.K., Watson, W.H., Biswal, S., Trush, M.A. 2008. Redox-regulation of Erk1/2-directed phosphatase by reactive oxygen species: role in signaling TPA-induced growth arrest in ML-1 cells. *Journal of Cellular Physiology* 216: 276-285.
- Tsang, A. 2004. Postconditioning: A Form of "Modified Reperfusion" Protects the Myocardium by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway. *Circulation Research* 95: 230-232.
- Tsutsumi, Y.M. 2007. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: In vivo and in vitro characterization. *Life Sciences* 81: 1223-1227.
- Tullio, F. 2013. Redox balance and cardioprotection. *Basic Research in Cardiology* 108: .
- Turkan, I. 2017. Emerging roles for ROS and RNS – versatile molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 68: 4413-4416.
- Umbreen, S., Lubega, J., Loake, G.J. 2019. Sulfur: the heart of nitric oxide-dependent redox signalling Kopriva, S. (ed.), *Journal of Experimental Botany* 70: 4279-4286.

- Valls, N., Gormaz, J.G., Aguayo, R., González, J., Brito, R., Hasson, D., Libuy, M. *et al.* 2016. Amelioration of persistent left ventricular function impairment through increased plasma ascorbate levels following myocardial infarction. *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 21: 75-83.
- Venugopal, R., Jaiswal, A.K. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 14960-14965.
- van der Vliet, A. 1994. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxyxynitrite: Evidence for hydroxyl radical production from peroxyxynitrite. *FEBS Letters* 339: 89-92.
- Wang, R., Yang, M., Wang, M., Liu, X., Xu, H., Xu, X., Sun, G., Sun, X. 2018. Total Saponins of *Aralia Elata* (Miq) Seem Alleviate Calcium Homeostasis Imbalance and Endoplasmic Reticulum Stress-Related Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry* 50: 28-40.
- Wang, X., Tomso, D.J., Chorley, B.N., Cho, H.-Y., Cheung, V.G., Kleeberger, S.R., Bell, D.A. 2007. Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Human Molecular Genetics* 16: 1188-1200.
- Wang, Z., Ye, Z., Huang, G., Wang, N., Wang, E., Guo, Q. 2016. Sevoflurane Post-conditioning Enhanced Hippocampal Neuron Resistance to Global Cerebral Ischemia Induced by Cardiac Arrest in Rats through PI3K/Akt Survival Pathway. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10: .

- Wardyn, J.D. 2015. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochemical Society Transactions* 43: 621-626.
- Wasserman, W.W., Fahl, W.E. 1997. Functional antioxidant responsive elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 5361-5366.
- Weinbrenner, C. 1997. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29: 2383-2391.
- Wescott, A.P., Kao, J.P., Lederer, W.J., Boyman, L. 2019. Mitochondrial Calcium Signaling in Heart. *Biophysical Journal* 116: 238a.
- Whaley-Connell, A., McCullough, P.A., Sowers, J.R. 2011. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 12: 21-29.
- White, C., Ambrose, E., Müller, A., Hatami, S., Li, Y., Le, H., Thliveris, J. et al. 2017. Impact of Reperfusion Calcium and pH on the Resuscitation of Hearts Donated After Circulatory Death. *The Annals of Thoracic Surgery* 103: 122-130.
- Winterbourn, C.C. 2015. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radical Biology and Medicine* 80: 164-170.
- Wu, N., Li, W.-N., Shu, W.-Q., Lv, Y., Jia, D.-L. 2015. Blocking the mitochondrial permeability transition pore with cyclosporine-A can restore cardioprotection of ischemic postconditioning in hypercholesterolemic rat heart. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19: 446-454.

- Wu, S., Lu, H., Bai, Y. 2019. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Medicine* 8: 2252-2267.
- Xiao, W., Loscalzo, J. 2019. Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 2019:7803.
- Xiao, X., Song, D., Cheng, Y., Hu, Y., Wang, F., Lu, Z., Wang, Y. 2019. Biogenic nanoselenium particles activate Nrf2-ARE pathway by phosphorylating p38, ERK1/2, and AKT on IPEC-J2 cells. *Journal of Cellular Physiology* 234: 11227-11234.
- Xu, D., Cao, F., Sun, S., Liu, T., Feng, S. 2016. Inhibition of the Ras/Raf/ERK1/2 Signaling Pathway Restores Cultured Spinal Cord-Injured Neuronal Migration, Adhesion, and Dendritic Spine Development. *Neurochemical Research* 41: 2086-2096.
- Xu, D., He, H., Jiang, X., Yang, L., Liu, D., Yang, L., Geng, G. *et al.* 2019. Raf-ERK1/2 signalling pathways mediate steroid hormone synthesis in bovine ovarian granulosa cells. *Reproduction in Domestic Animals* 54: 741-749.
- Yamamura, T., Otani, H., Nakao, Y., Hattori, R., Osako, M., Imamura, H., Das, D.K. 2001. Dual Involvement of Coenzyme Q₁₀ in Redox Signaling and Inhibition of Death Signaling in the Rat Heart Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling* 3: 103-112.
- Yang, X., Cohen, M.V., Downey, J.M. 2010. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 24: 225-234.
- Yao, J., Ke, J., Zhou, Z., Tan, G., Yin, Y., Liu, M., Chen, J., Wu, W. 2019. Combination of HGF and IGF-1 promotes connexin 43 expression and improves ventricular arrhythmia after myocardial infarction through activating the MAPK/ERK and

- MAPK/p38 signaling pathways in a rat model. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* 9: 346-354.
- Yao, Li, L. 2009. Sevoflurane postconditioning protects chronically-infarcted rat hearts against ischemia-reperfusion injury by activation of pro-survival kinases and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening upon reperfusion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32: 1854-1861.
- Yao, Li, L.-H. 2010. Sevoflurane postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of radical oxygen species, extracellular signal-related kinases 1/2 and mitochondrial permeability transition pore. *Molecular Biology Reports* 37: 2439-2446.
- Yellon, D.M., Hausenloy, D.J. 2007. Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine* 357: 1121-1135.
- Yin, D., Wan, Q., Ye, Q., Deng, Y., Lin, B., Wu, L. 2019. Cardiomyocyte Hypertrophy induced by Visfatin in H9c2 Embryonic Rat Cardiac Cells via ERK1/2 Signaling Pathway. *International Journal of Pharmacology* 15: 503-508.
- Yokoyama, S., Nakagawa, I., Ogawa, Y., Morisaki, Y., Motoyama, Y., Park, Y.S., Saito, Y., Nakase, H. 2019. Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus Mongin, A. A. (ed.), *PLOS ONE* 14: e0215104.
- Yuan, X., Xu, C., Pan, Z., Keum, Y.-S., Kim, J.-H., Shen, G., Yu, S. *et al.* 2006. Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK

- signaling pathway in HepG2 cells. *Molecular Carcinogenesis* 45: 841-850.
- Zaugg, M., Lou, P.-H., Lucchinetti, E., Gandhi, M., Clanachan, A.S. 2017. Postconditioning with Intralipid emulsion protects against reperfusion injury in post-infarct remodeled rat hearts by activation of ROS-Akt/Erk signaling. *Translational Research* 186: 36-51.e2.
- Zhang, C., Yang, Y., Liang, W., Wang, T., Wang, S., Wang, X., Wang, Y. *et al.* 2019. Neuroprotection by urate on the mutant hSOD1-related cellular and Drosophila models of amyotrophic lateral sclerosis: Implication for GSH synthesis via activating Akt/GSK3 β /Nrf2/GCLC pathways. *Brain Research Bulletin* 146: 287-301.
- Zhang, F., Munoz, F.M., Sun, L., Zhang, S., Lau, S.S., Monks, T.J. 2019. Cell-specific regulation of Nrf2 during ROS-Dependent cell death caused by 2,3,5-tris(glutathion-S-yl)hydroquinone (TGHQ). *Chemico-Biological Interactions* 302: 1-10.
- Zhang, Hannink, M. 2003. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biology* 23: 8137-8151.
- Zhang, X., Min, X., Li, C., Benjamin, I.J., Qian, B., Zhang, X., Ding, Z. *et al.* 2010. Involvement of reductive stress in the cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of heat shock protein 27. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 55: 1412-1417.
- Zhao, Z.-Q. 2010. Postconditioning in reperfusion injury: a status report. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 24: 265-279.

- Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., Vinten-Johansen, J. 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285: H579-H588.
- Zhou, T., Prather, E., Garrison, D., Zuo, L. 2018. Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 417.
- Zhu, J., Yao, K., Wang, Q., Guo, J., Shi, H., Ma, L., Liu, H. *et al.* 2016. Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4. *Cellular Physiology and Biochemistry* 39: 2364-2380.
- Zhu, M., Fahl, W.E. 2001. Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 212-219.

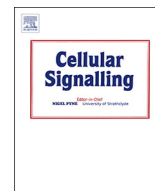
XIII.

PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTE TRABAJO

ANEXO 1: Díaz-Ruíz, Díaz-Ruíz J.L., Macías-López, A., Alcalá-Vargas, F., Guevara-Chávez, J.-G., Mejía-Uribe, A., Silva-Palacios, A., Zúñiga-Muñoz A., Zazueta, C., Buelna-Chontal, M. (2019). Redox signaling in ischemic postconditioning protection involves PKC ϵ and Erk1/2 pathways and converges indirectly in Nrf2 activation. *Cellular Signalling*, 109417.

ANEXO

1



Redox signaling in ischemic postconditioning protection involves PKC ϵ and Erk1/2 pathways and converges indirectly in Nrf2 activation

Jorge-Luis Díaz-Ruíz¹, Arturo Macías-López¹, Francisco Alcalá-Vargas, José-Guadalupe Guevara-Chávez, Aída Mejía-Urbe, Alejandro Silva-Palacios, Alejandra Zúñiga-Muñoz, Cecilia Zazueta, Mabel Buelna-Chontal*

Department of Cardiovascular Biomedicine, National Institute of Cardiology, Ignacio Chávez, 14080 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cardiac protection
Ischemic postconditioning
Redox signaling
RISK pathway
Transcription factor Nrf2

ABSTRACT

Ischemic-postconditioning (iPostC) exerts cardioprotection by preserving redox homeostasis in the reperfused heart. This protective effect has been associated with the activation of endogenous antioxidant response driven by transcription factor Nrf2 and with the activation of 'reperfusion injury salvage kinases' (RISK) as PI3K, PKC and Erk1/2. Redox homeostasis is essential for normal cell physiology since reactive oxygen species (ROS) are crucial for processes that involve protein signaling. Thus, it has become clear that not only the perturbation of redox balance to oxidative state is deleterious but also towards a reductive state contributing to pathogenesis of diseases. However, there is still a scarce knowledge about the role of ROS in the cardioprotective signals mediated by RISK in postconditioned hearts. Therefore, we studied the role of ROS as initiator of RISK signaling molecules in iPostC-conferred cardioprotection. With the aim to study the relationship between redox-dependent RISK activation and the downstream activation of the transcription factor Nrf2, we evaluated the effect of redox signaling disruption by the effect of ascorbic acid in iPostC hearts. Our results showed that PKC ϵ and Erk1/2 activation is redox-dependent and that concurs downstream with Nrf2 deficient activation. Besides, using inhibitors we found that neither PI3K nor Erk1/2 are directly related with Nrf2 activation, indicating that these kinases have other targets. We conclude that redox signaling participates in cardioprotection triggered by iPostC through the action of kinase-dependent and -independent mechanisms and concurred with the downstream regulation of Nrf2-mediated antioxidant response to prolonged redox balance during long reperfusion.

1. Introduction

Coronary atherosclerosis is the main cause of coronary artery disease and acute myocardial infarct that is the leading cause of mortality worldwide. Reperfusion of the ischemic tissue can lead to irreversible additional damage [1] mainly due to oxygen re-exposure that stimulates the massive production of reactive oxygen species (ROS) [2–4]. Experimental evidence has demonstrated that the first minutes of reperfusion represents an opportunity window to apply therapies aimed to prevent reperfusion injury [5]. Ischemic postconditioning (iPostC) is a cardioprotective maneuver in which short cycles of ischemia/

reperfusion (IR), are applied in the coronary artery before prolonged reperfusion and after a severe ischemic event [6]. This strategy activates an endogenous response in the myocardium that protects against reperfusion injury, which has been tested in several experimental models [7] and in clinical trials [8–11]. Protective mechanisms triggered by iPostC involve the activation of 'Reperfusion Injury Salvage Kinases' (RISK) [12,13], that includes the PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*), MEK1/2/Erk1/2 (*Mitogen Activated Kinases/ Extracellular signal Activated Kinases*) [13–15] and the epsilon isoform of protein kinase C (PKC ϵ) pathways [16,17]. Also, iPostC reduces ROS levels, preserves reduced glutathione (GSH) levels [18–20]

Abbreviations: iPostC, Ischemic Postconditioning; asc, Ascorbic Acid; ARE, Antioxidant Response Element; IR, Ischemia and Reperfusion; MEK1/2/Erk1/2, Mitogen activated kinases/ Extracellular signal activated kinases; Nrf2, Transcription nuclear factor E2 related factor 2; PI3K/AKT, Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B; PKC ϵ , Protein kinase C, isoform epsilon; RISK, Reperfusion injury salvage kinases; ROS, Reactive oxygen species; U, U0126 (MEK inhibitor); W, Wortmannin (PI3K inhibitor); γ -GCS, gamma-glutamylcysteine synthetase

* Corresponding author at: Department of Cardiovascular Biomedicine, National Institute of Cardiology I. Ch., Juan Badiano #1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14080, Mexico City, México.

E-mail address: mabel.buelna@comunidad.unam.mx (M. Buelna-Chontal).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109417>

Received 6 May 2019; Received in revised form 9 September 2019; Accepted 10 September 2019

Available online 13 September 2019

0898-6568/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

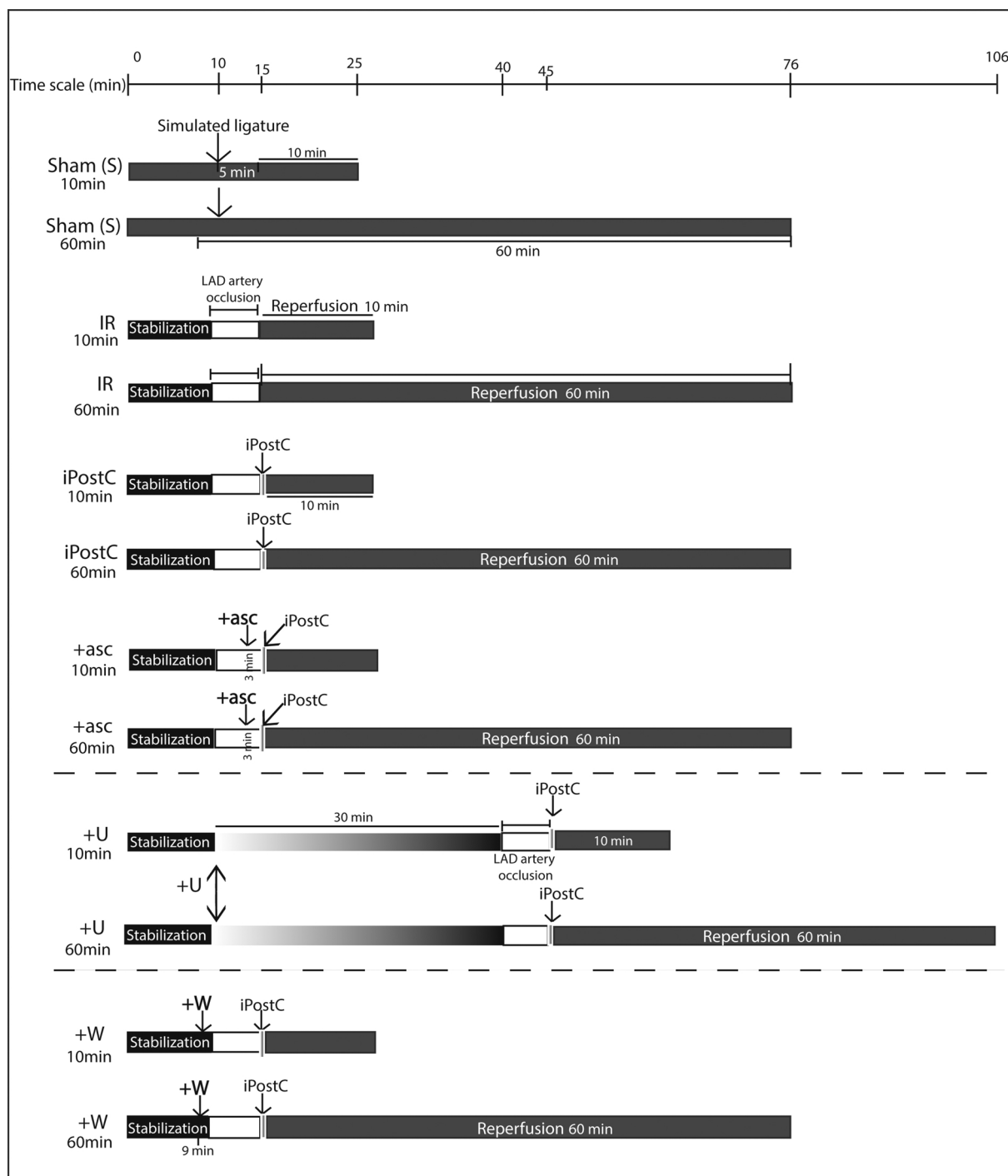


Fig. 1. Experimental protocols.

All experimental groups underwent stabilization for 10 min. The white bars represent coronary artery (CA) occlusion (5 min), followed by 10 min or 60 min of reperfusion (dark bars). iPostC groups received 3 reperfusion/re-occlusion cycles of 10 s each. Where indicated ascorbic acid (+ asc), U0126 (+ U) and wortmannin (+ W) were administered to ischemic postconditioned rats. (2-column fitting figure).

and increases the activity of antioxidant enzymes after activation of transcription nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) contributing to long-term cardiac protection [21].

Nrf2 contributes to maintain redox homeostasis through regulation of endogenous antioxidant system, which influences to a proper environment for ROS can act as signaling molecules [22,23]. The role of ROS in the protective mechanisms activated by iPostC was firstly reported by Penna et al., [24] who proposed that these molecules are produced by mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels (mitoKATP) in a

controlled manner and activate PKCε in iPostC hearts. To provide further insight on the role of redox signaling in cardioprotection exerted by iPostC, we applied ascorbic acid (asc) to iPostC hearts, in order to study the RISK activation by redox protective signaling and the downstream regulation of transcription factor Nrf2. Our results show that redox signaling exerts regulation on PKCε and Erk1/2 activation and that concurs with the activation of Nrf2, this mechanism appears to be hydrogen peroxide-dependent. We propose that redox signaling participates in cardiac protection by survival kinase-dependent

mechanism that regulates indirectly the downstream Nrf2-mediated antioxidant response which in turn preserves redox homeostasis during long-reperfusion.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Polyclonal Antibodies, γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) (ab41463), PHO-PKC ϵ (ab63387), PHO-PI3K (ab182651) and monoclonal antibodies against Nrf2 (ab89443), PI3K p85 (M253, ab86714), PHO-Nrf2 (phospho S40, ab76026) and Lamin-B1 (ab133741), as well as protease and phosphatase inhibitor cocktail (EDTA-free, ab201120), 10 \times blocking buffer (ab126587) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugates secondary antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). PHO-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, mAb #4370) Erk1/2 (#9102), PHO-MEK1/2 (Ser217/221, mAb #9154) total MEK1/2 (#9122), PKC ϵ (22B10, #2683), hemeoxygenase-1 (HO-1) (#5061) and Erk1/2 inhibitor 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophenylmercapto)butadiene monoethanolate also known as U0126 (U) (#9903) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Monoclonal antibodies raised against, PHO-AKT (C-11, sc-514,032), AKT (B-1, sc-5298) and polyclonal antibody against Nrf2 (H-300, sc-13,032) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Biotin 3'end DNA labeling kit (89818), chemiluminescent nucleic acid detection module (89880) and lightshift chemiluminescent electrophoretic mobility shift assay (EMSA) kit (20148) were from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). An enhanced chemiluminescence detection system was obtained from Merck Millipore Corp. (Bedford, MA, USA), and the PI3K inhibitor wortmannin (W) (681676) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

2.2. Methods

Animals experiments were performed in compliance with the ARRIVE guidelines and were carried out in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH-US Publications No.8023, revised 1978) and the management of biological residues in accordance to the Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999. Experimental protocol design was mostly according to the "Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection" [25]. Male Wistar rats (300 g) were used in this study. The animals were injected with 63 mg/Kg *i.p.* sodium pentobarbital and 1.7 U/Kg *i.p.* heparin and assessed for complete lack of pain response by determining pedal withdrawal reflex. Each animal was intubated through an inserted cannula into the trachea and connected to a respirator for small animals (Harvard Apparatus, Holliston, MASS, USA). Lateral thoracotomy was performed to expose the heart and to occlude 5 min the main branch of the left coronary artery, near its origin beneath the left atrial appendage with a 6-0 polypropylene suture slip knot, which was timely released to reperfusion of ischemic tissue [26,27]. The 5 min occlusion of the main coronary artery has been shown to produce severe cardiac injury [21,28] and we compared the infarct size obtained with this protocol against 30 min occlusion of left anterior descending artery (Suppl. Fig. 2A and B). Hemodynamic parameters were measured using a pressure-volume catheter (Mikro-Tip; Millar) inserted into the left ventricle cavity and subsequent analysis was performed with PVAN Ultra software (Millar, Houston, Tx, USA).

2.3. Surgical procedures

The experimental protocols are described in Fig. 1. All groups were stabilized during 10 min, a simulated coronary artery occlusion was

performed, by placing the polypropylene suture around the artery without occlusion in the sham groups during short term, 10 min after simulated occlusion ($n = 5$) or long term, 60 min after simulated occlusion ($n = 5$). The IR groups were subjected to 5 min occlusion of the main branch of the left coronary artery producing immediate pallor of the left ventricle wall. Blood reflow was restored during 10 ($n = 5$) or 60 min ($n = 10$) and hemodynamic data were recorded. In the iPostC groups blood flow was restored during 10 ($n = 5$) or 60 min ($n = 10$) after 3 cycles of 10 s of reperfusion/10 s of re-occlusion [29–31]. The antioxidant *asc* 100 mg/Kg ($n = 10$) [32] and the inhibitors U 1.27 mg/Kg ($n = 10$) [33] and W 50 nM (100 μ L; $n = 10$) [34], were injected directly into the muscle wall of the left ventricle of iPostC hearts. The antioxidant *asc* was administered at min 3 of coronary occlusion, whereas U group was stabilized and then was injected followed by 30 min before coronary occlusion and W hearts were applied at min 9 of stabilization.

2.4. Infarct size measurement

At the end of the protocol, the coronary artery was re-occluded for injection into left ventricle of 1 mL 5% Evan's blue to determine the extent of risk area [35]. Hearts from each experimental group were excised ($n = 25$) and frozen at -20°C for 20 min, then were cut into 2-mm transverse slices for incubation in 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride in sodium phosphate buffer (pH 7.4) during 20 min at 37°C in constant agitation. Finally, the slices were immersed in a preservative solution of phosphate buffer saline containing 0.01% sodium azide, to enhance the contrast between non-risk zone (blue), risk zone (pale and red stain) and infarcted area (white) [21]. All slices were photographed and using the software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) was calculated the percentage of the infarct size (IS) normalized per area at risk (AAR) of left ventricle.

2.5. Hydrogen peroxide quantification

Immediately, after in vivo protocol left ventricles were obtained from each experimental condition reperfused for 10 min ($n = 20$), followed by homogenization of fresh cardiac tissue using Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH_2PO_4 , 136.9 mmol/L NaCl, 8.9 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1% nonidet P-40 and protease inhibitor cocktail), then centrifuged at 4000g at 4°C during 15 min and the supernatant was collected. The assay was based on the amplex red reaction with hydrogen peroxide in the presence of HRP [36]. Cardiac homogenates were mixed with 10 μ mol/L of 10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine and 0.2 U/mL HRP in Krebs-Ringer's phosphate glucose buffer (145 mmol/L NaCl, 5.7 mmol/L NaH_2PO_4 , 4.86 mmol/L KCl, 0.54 mmol/L CaCl_2 , 1.22 mmol/L MgSO_4 , 5.5 mM glucose) and incubated in darkness at 37°C for 60 min. Fluorescence was detected at 590 nm (emission) using an excitation wavelength of 530 nm in an Spectro-fluorophotometer (Shimadzu RF5000U). Data were obtained from a hydrogen peroxide standard curve and results were expressed as nmol hydrogen peroxide per mg of total protein.

2.6. Malondialdehyde determination assay

Samples obtained previously from left ventricles homogenates reperfused 10 min ($n = 20$), were incubated in a reaction mixture containing 15.4 mM 1-methyl-2-phenylindole in the presence of chlorhydric acid, at 45°C during 40 min [37]. Then centrifuged at 3000g for 5 min and the optical density of the supernatant was finally measured spectrophotometrically (Biotek Synergy HTX multi-mode reader) at 586 nm. A standard curve of tetrametoxyp propane was used and data were expressed as nmol malondialdehyde (MDA) per mg of total protein.

Table 1
Hemodynamic data obtained at the beginning of the stabilization period (baseline) and after 60 min of reperfusion.

	Baseline					Reperfusion					
	LVP (mmHg)	LVDP (mmHg)	HR (beats/min)	EDP (mmHg)	max dP/dt (mmHg/s)	LVP (mmHg)	LVDP (mmHg)	HR (beats/min)	EDP (mmHg)	max dP/dt (mmHg/s)	min dP/dt (mmHg/s)
S	106 ± 19	95 ± 14	328 ± 70	4.2 ± 1.5	6684 ± 1968	127 ± 20	117 ± 21	272 ± 49	5.7 ± 2.2	5271 ± 1673	-3849 ± 1354
IR	107 ± 11	101 ± 9	338 ± 26	4.3 ± 1.2	7598 ± 674	57 ± 22 ^{&}	59 ± 28 ^{&}	272 ± 43	15.5 ± 4.6 ^{&}	1158 ± 705 ^{&}	-404 ± 178 ^{&}
iPostC	102 ± 16	98 ± 11	326 ± 32	4.6 ± 1.3	7773 ± 1247	120 ± 14 [#]	113 ± 11 [#]	329 ± 17	5.1 ± 1.8 [#]	6180 ± 1026 [#]	-4412 ± 1605 [#]
+asc	111 ± 12	106 ± 14	355 ± 25	4.8 ± 1.3	7267 ± 671	57 ± 21 [@]	38 ± 17 [@]	210 ± 39 [@]	12.3 ± 5.3 [@]	1319 ± 622 [@]	-925 ± 492 [@]

Left ventricular pressure (LVP), left ventricular developed pressure (LVDP), heart rate (HR), left ventricular end diastolic pressure (EDP), contractility index (max dP/dt) and relaxation index (min dP/dt). Values are the mean of at least 5 experiments ± S.D. Sham (S), ischemic reperfusion (IR), ischemic post-conditioned (iPostC), iPostC hearts plus ascorbic acid (+ asc).

[&]p < .01 vs. Sham.

[#]p < .01 vs. IR.

[@]p < .01 vs. iPostC.

2.7. Reduced glutathione content

Monochlorobimane (1 mM) was used to form a stable fluorescent adduct with glutathione (GSH) in the presence of glutathione S-transferase (1 U/mL). The assay was performed as described by Fernández-Checa & Kaplowitz [38]. Samples obtained previously from left ventricles homogenates reperused 10 min (n = 20), were incubated in the reaction mixture at 37 °C during 30 min and the fluorescence was assessed at an excitation wavelength of 385 nm and emission wavelength of 478 nm (Biotek Synergy HTX multi-mode reader). Results were calculated according to standard curve for GSH (nmol) and then normalized per mg of protein.

2.8. Measurement of PKC activity

A commercial kit was used to measure PKC activity in samples of left ventricles homogenates obtained previously (n = 20) (PepTag assay, Promega, Madison, WI, USA). Briefly, the change in net charge of a specific peptide substrate for PKC shifts its mobility in agarose gel, allowing to distinguish between the phosphorylated and the non-phosphorylated peptide. Each band was excised from the gel and melted to quantify the content of the peptide by spectrophotometry at 570 nm. One unit of PKC activity is defined as the number of nanomoles of phosphate transferred to substrate per minute per milliliter.

2.9. Nuclear protein extraction

Frozen samples from left ventricles reperused for 60 min (n = 30) were used for nuclear protein extraction as described by Kuster et al., [39]. Left ventricle tissues were pulverized, and nuclear protein extraction was obtained at 4 °C using the NE-PER kit instructions (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.10. Immunoprecipitation assay

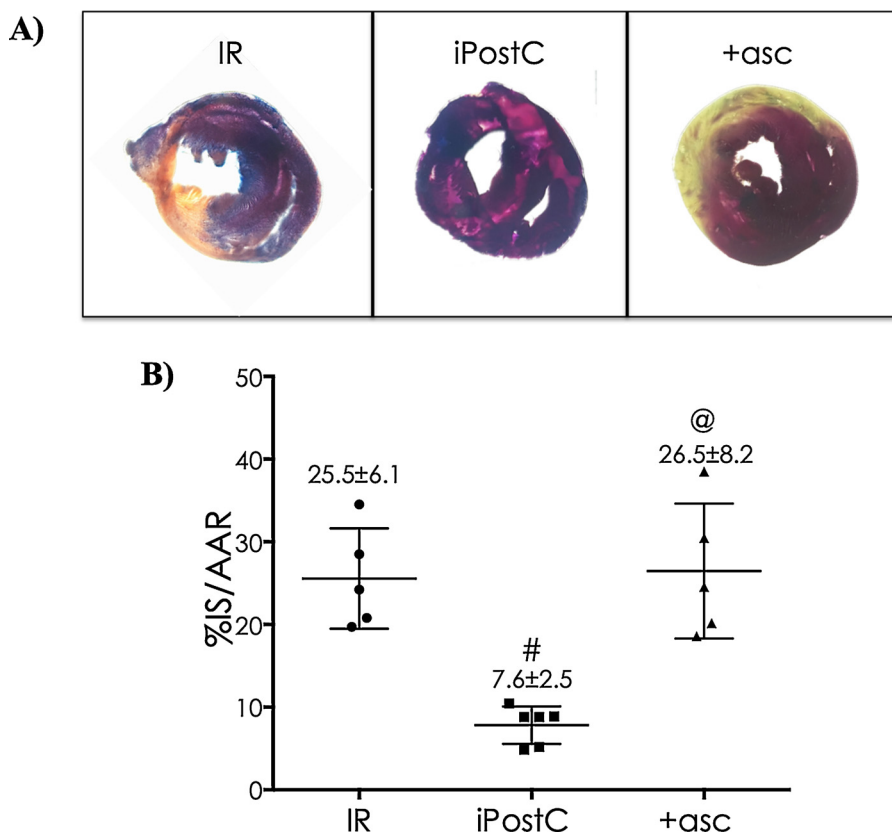
Cardiac homogenates from left ventricles reperused 10 min obtained formerly (1.5 mg; n = 20) were incubated with 4 µg of primary antibody to Nrf2 (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.) during 3 h, at 4 °C in a rotary mixer. Then, were added 50 µL of protein G-sepharose beads (slurry) and incubated overnight at 4 °C in a rotary mixer. Afterward the samples were centrifuged at 1200g, for 30 s at 4 °C. The beads were washed twice with 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0.5% Igepal, 100 mM NaF pH 8.0 and finally centrifuged at 1200g at 4 °C for 30 s. The beads were collected and 5 × SDS sample buffer was added to perform western-blot assays.

2.11. Western blotting

Left ventricles homogenates formerly obtained (reperused 10 min; n = 20) or nuclear protein samples (n = 30) were used for western blot analysis. Proteins were separated alternatively in 8%, 10% or 15% SDS-PAGE gels and electro-transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% non-fat milk or blocking buffer 1 X (Abcam, Cambridge, MA, USA) for 1 h and then incubated with primary antibodies at 4 °C overnight. After that blots were incubated with secondary antibodies coupled to HRP and detected by chemiluminescence.

2.12. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The oligonucleotide containing the sequence of the ‘antioxidant response element’ (ARE) (GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT) was manufactured by Sigma Aldrich (Toluca, Mexico) and was further biotin-labeled with a commercial kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Binding reactions were carried out at room temperature for 60 min in the presence of 50 ng/µL poly (dI⁺dC), 0.05% nonidet P-40,



2.5% glycerol, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.05 M KCl in 1 \times binding buffer using 20 fmol of biotin-end-labeled-ARE (B-ARE) and 10 μ g of nuclear extract.

The competition assay was performed by the addition of an excess of unlabeled-ARE that was incubated for 30 min before the addition of the B-ARE sequence. The reaction mixtures were loaded onto native 5% polyacrylamide gel pre-electrophoresed for 60 min in 0.5 \times Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer, electrophoresed at 100 V and finally transferred onto a positively charged nylon membrane in 0.5 \times TBE at 380 mA for 30 min. Transferred DNA was cross-linked to the membrane and chemiluminescent detection was achieved using HRP-conjugated streptavidin.

2.13. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.D. Differences in all variables were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison's test. A statistically difference of $p < .05$ or $p < .01$ was considered significant. We used the software GraphPad Prism version 6 for data analysis.

3. Results

3.1. The iPostC exerted protection by maintaining cardiac function and prevented infarct size, these effects were abolished by the presence of ascorbic acid

Left ventricular pressure (LVP), left ventricular developed pressure (LVDP), heart rate (HR), left ventricular end diastolic pressure (EDP), contractility (max dP/dt) and relaxation (min dP/dt) indexes were measured during open chest surgery. Baseline values and those registered after 60 min of reperfusion are shown in Table 1. No significant differences were obtained in the baseline registers of the different experimental groups. At the end of reperfusion LVP diminished in the IR

group as compared to the sham group (57 ± 22 mmHg vs. 127 ± 20 mmHg; $p < .01$). The iPostC maintained LVP at similar values to those registered in the sham group (120 ± 14 mmHg; 127 ± 20 mmHg) and significantly higher than those of the IR group (127 ± 14 mmHg vs. 57 ± 22 mmHg; $p < .01$). The asc addition in the iPostC hearts resulted in a significant depletion of LVP (57 ± 21 mmHg). LVDP followed a similar pattern in the IR group was significantly lower than in the sham group (59 ± 28 mmHg vs. 117 ± 21 mmHg; $p < .01$), was increased in the iPostC group (113 ± 11 mmHg) and the asc addition decreased LVDP values (38 ± 17 mmHg).

HR values were similar between the sham, IR and iPostC groups. A 36.2% decrease was observed in the asc group in comparison with the iPostC group (210 ± 39 beats/min vs. 329 ± 17 beats/min; $p < .01$). On the other hand, EDP was significantly higher in the IR in comparison to sham (15.5 ± 4.6 vs. 5.7 ± 2.2 mmHg; $p < .01$), was maintained in iPostC group (5.1 ± 1.8 mmHg) and was increased in the +asc group (12.3 ± 5.3 mmHg). The left ventricle systolic function or max dP/dt was recovered efficiently in the iPostC hearts in contrast to the IR group (6180 ± 1026 mmHg/s vs. 1158 ± 705 mmHg/s; $p < .01$) and was affected by asc addition (+asc) (1319 ± 622 mmHg/s vs. 6180 ± 1026 mmHg/s; $p < .01$). The values corresponding to min dP/dt was improved in iPostC hearts as compared with IR hearts (-4412 ± 1605 mmHg/s vs. -404 ± 178 mmHg/s; $p < .01$). The asc addition rendered higher relaxation values than iPostC (-925 ± 492 mmHg/s vs. -4412 ± 1605 mmHg/s; $p < .01$). Due to the asc addition in iPostC hearts the cardiac function was hindered, probably by perturbation of redox homeostasis disturbing in consequence activation of protective mechanisms. Conversely the effect of asc in IR hearts had indeed protective effects by alleviating oxidative stress in such condition (Suppl. Table 1). Besides the protective effect of iPostC was able to limit IS caused by reperfusion injury by a clear diminishment of infarct area relative to AAR in hearts with iPostC in comparison to IR, this

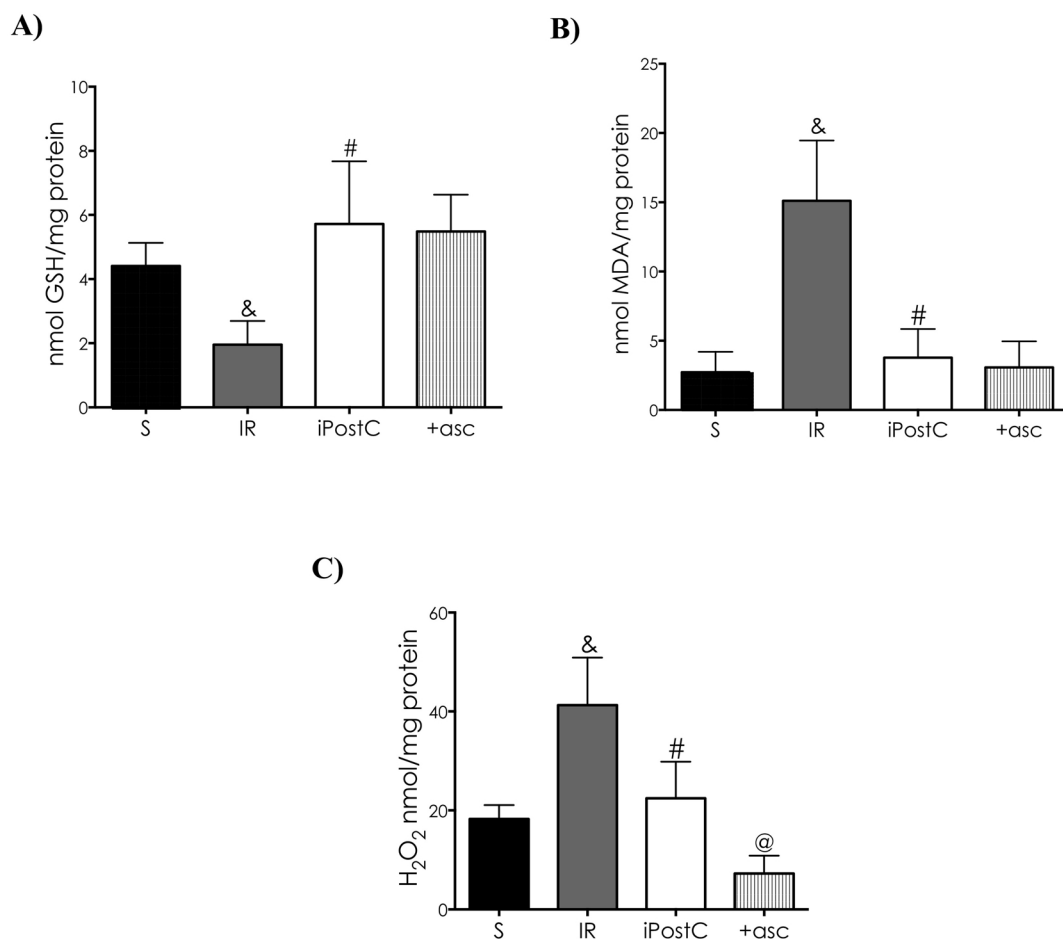


Fig. 3. Ischemic postconditioning preserves redox homeostasis.

(A) Reduced glutathione (GSH) content expressed as nmol per mg protein. (B) Malondialdehyde (MDA) content expressed as nmol/mg protein. (C) Quantification of hydrogen peroxide (H₂O₂) expressed as nmol per mg protein. Data are the mean of at least 5 experiments. &*p* < .01 vs. Sham; #*p* < .01 vs. IR and @*p* < .01 vs. iPostC. (1.5 column fitting image).

protective effect was also abolished by the *asc* addition in iPostC hearts (Fig. 2). These results indicate that redox homeostasis is crucial for a proper cardiac function afforded by iPostC application.

3.2. Application of iPostC preserved redox homeostasis and was disturbed by addition of ascorbic acid

GSH is a reliable indicator of the intracellular redox balance. GSH content decreased in IR hearts after 10 min of reperfusion as compared with the sham group (1.96 ± 0.7 vs. 4.4 ± 0.7 nmol/mg protein; *p* < .01), whereas in hearts subjected to iPostC, GSH content increased to 5.7 ± 1.9 nmol/mg. In the iPostC hearts with *asc* addition (+asc) the GSH level was not altered and remained at a similar level to iPostC (5.5 ± 1.1 nmol/mg) (Fig. 3A). Oxidative stress damage was evaluated by MDA assessment, a toxic byproduct of lipid peroxidation. The loss of redox balance by IR was confirmed since MDA levels were increased as compared with sham group (15.1 ± 4.3 vs. 2.7 ± 1.5 nmol/mg protein; *p* < .01), whereas the levels of MDA in iPostC hearts were lower than those observed in the IR group (3.8 ± 2.1 nmol/mg protein; *p* < .01). MDA levels in the +asc group did not change in comparison to those levels of iPostC group (3.1 ± 1.9 nmol/mg protein; Fig. 3B). Additionally, we quantified hydrogen peroxide after early reperfusion (10 min). Hydrogen peroxide concentration increased 2.3-fold in the IR group in comparison to the sham group as represented in Fig. 3C (41.3 ± 9.6 vs. 18.3 ± 2.8 nmol/mg protein; *p* < .01); this increase was prevented by iPostC that was 1.8-fold lower than in IR hearts (22.5 ± 7.4 vs.

41.3 ± 9.6 nmol/mg protein; *p* < .01). These data indicate that IR disrupts the redox balance towards pro-oxidative state during early reperfusion, conversely to iPostC, which preserved a redox balance, since GSH levels were higher, lipid peroxidation was prevented, and hydrogen peroxide was decreased in comparison to IR group. The chemical nature of hydrogen peroxide determines its properties as a triggering molecule in redox signaling. We observed that *asc* addition to iPostC hearts (+asc) dramatically decreased hydrogen peroxide concentration by 3.1-fold in comparison to iPostC group (7.2 ± 3.6 vs. 22.5 ± 7.4 nmol/mg protein; *p* < .01) and this concurred with the impairment of cardiac function previously shown in Table 1, indicating that hydrogen peroxide is involved in cardiac protection afforded by application of iPostC.

3.3. In iPostC hearts the activation of PKC and Erk1/2 was redox-dependent but not PI3K/AKT

To investigate the role of redox signaling on RISK activation, we assessed PKC activity in the +asc group. Increased PKC activity in iPostC hearts as compared with the IR group was abolished by the *asc* addition (Suppl. Fig. 1A and B). To determine if the diminishment observed in PKC activity corresponding to +asc group correlated with changes in PKC ϵ activation, we evaluated its phosphorylation (PHO-PKC ϵ) by western blotting. As shown in Fig. 4A, PHO-PKC ϵ decreased in IR hearts in comparison with the sham group (*p* < .01). In contrast, the application of iPostC increased its phosphorylation as compared to IR hearts (*p* < .01), whereas *asc* addition hindered the activation of

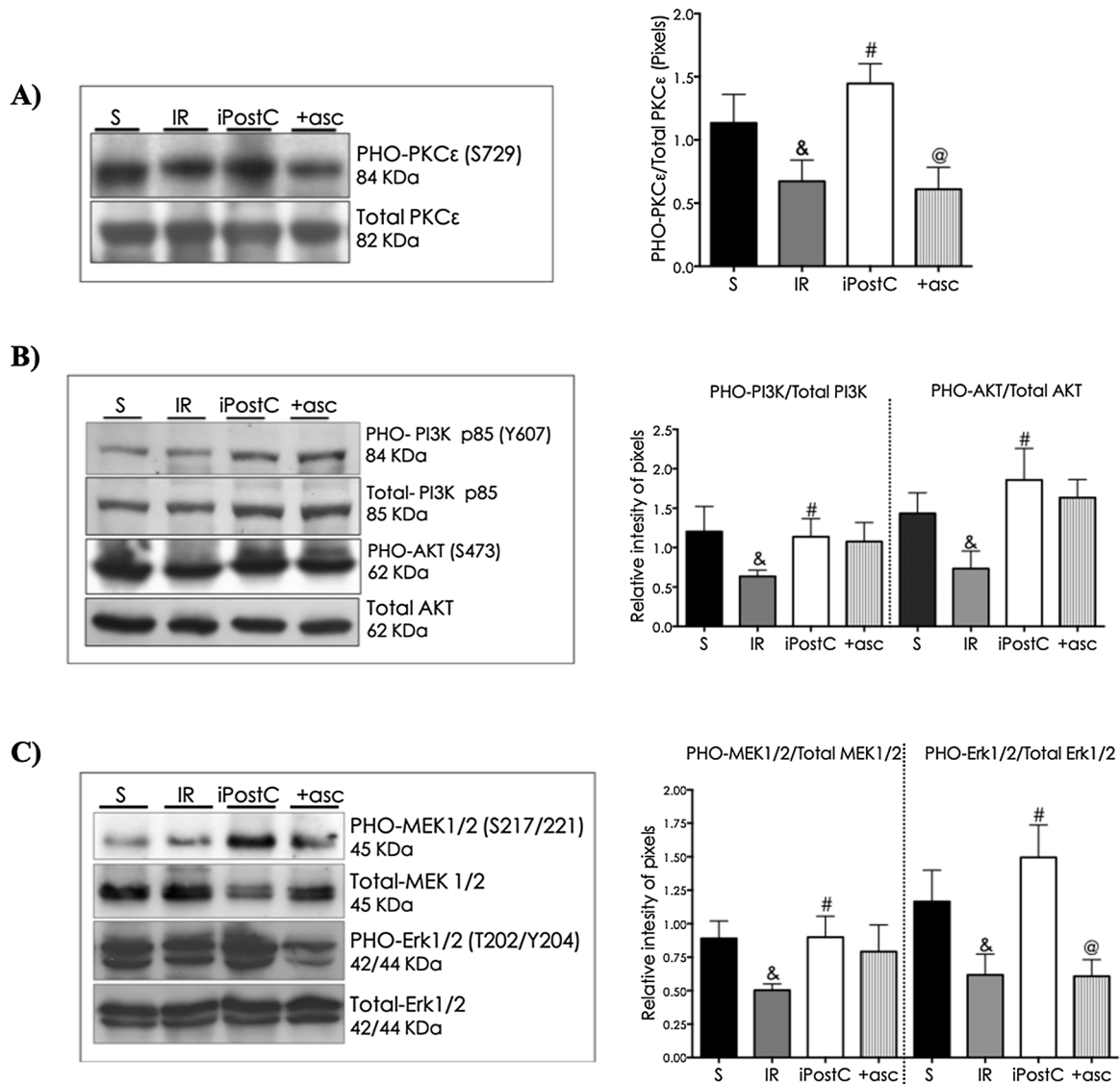


Fig. 4. PKC ϵ and Erk1/2 activation in iPostC hearts was abolished by ascorbic acid. (A) PHO-PKC ϵ and PKC ϵ content were immunodetected. The content corresponding to phosphorylated PKC was normalized to total PKC ϵ . (B) Representative blots of total and phosphorylated PI3K and AKT (C) PHO-Erk1/2 and PHO-MEK normalized to their corresponding total protein. Data represents the mean of at least 5 experiments \pm S.D. & $p < .01$ vs. Sham; # $p < .01$ vs. IR and @ $p < .01$ vs. iPostC. (1.5-column image).

PKC ϵ observed in iPostC hearts ($p < .01$). We also measured the phosphorylation of PI3K/AKT and MEK1/2-ERK1/2 in iPostC hearts in such conditions (Fig. 4B, C). Both PHO-PI3K and PHO-AKT levels decreased in the IR group as compared to the sham group ($p < .01$) and were recovered by iPostC ($p < .01$). On the contrary to that observed with PKC ϵ , no changes between iPostC and + asc groups were detected neither AKT nor PI3K phosphorylation. We also observed that PHO-MEK1/2 ($p < .01$) and PHO-Erk1/2 ($p < .01$) decreased in IR group in comparison to sham group and both kinases augmented in the iPostC group ($p < .01$). Although no changes in MEK activation were induced by asc addition in iPostC hearts, indeed decreased Erk1/2 activation as compared to iPostC hearts ($p < .01$). Our data suggests that PI3K, AKT and MEK activity do not depend of redox signaling, in contraposition with that observed for Erk1/2 activity, which is redox-dependent and such activation is independent of the canonical pathway mediated by MEK. Overall, these results imply that the cardiac dysfunction induced by asc in iPostC hearts likely due to a partial inhibition of the protective redox-signals involving PKC ϵ and Erk1/2 and suggests that hydrogen peroxide could be a trigger of such condition.

3.4. Inhibition of redox signaling in iPostC hearts abolished Nrf2 activation

The nuclear accumulation of transcription factor Nrf2 after 60 min of reperfusion is shown in Fig. 5A. Nuclear content of Nrf2 was lower in the IR group than in the sham group ($p < .01$), whereas iPostC increases the content of nuclear Nrf2 in comparison to IR ($p < .01$) and this effect was diminished in presence of asc (+ asc) ($p < .05$).

EMSA assay was performed using nuclear extracts of hearts after 60 min of reperfusion to evaluate Nrf2 binding to B-ARE sequence in the different experimental groups. In Fig. 5B is shown that iPostC increased the formation of the complex Nrf2:B-ARE in comparison with IR, (upper shift band in lane 4 and 8 vs. 3 and 7), this effect was avoided by asc addition in the iPostC hearts (lanes 5 and 9 vs. 4 and 8). These results indicate that redox signaling is involved in the downstream Nrf2 nuclear accumulation and further ARE-binding.

3.5. Role of MEK/Erk1/2 signaling in Nrf2 activation by iPostC

To determine the correlation between MEK1/2-Erk1/2 phosphorylation and downstream Nrf2 activation we used the specific MEK1/2

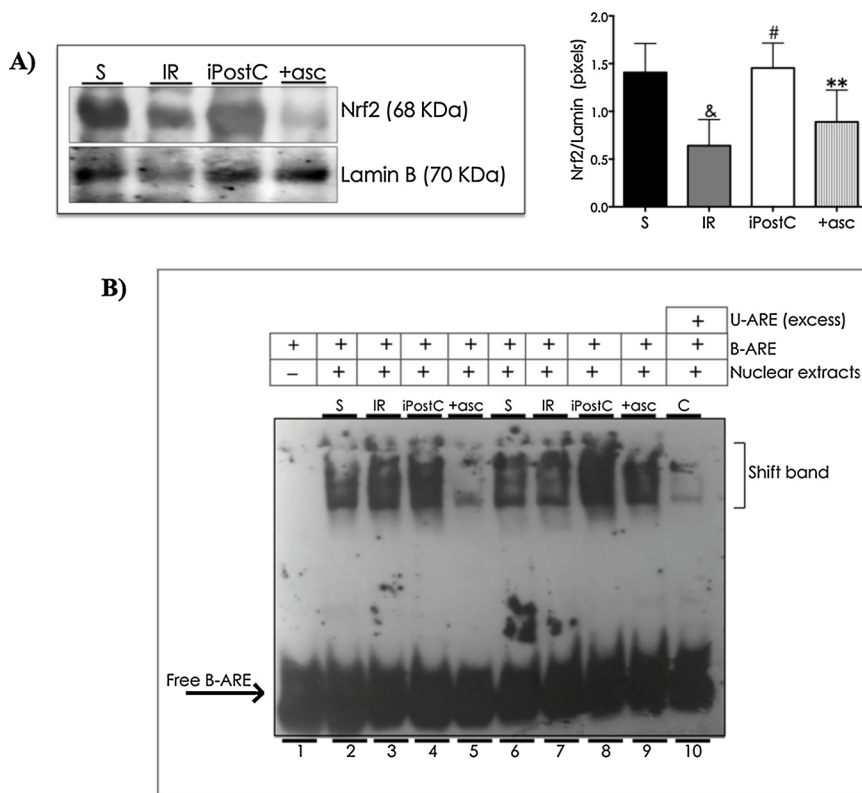


Fig. 5. In iPostC hearts ascorbic acid abolished Nrf2 nuclear translocation and its transcriptional activity. (A) Nuclear content of Nrf2 related to Lamin B. Data are the mean \pm S.D. of 5 experiments. [&]*p* < .01 vs. Sham; [#]*p* < .01 vs. IR and ^{**}*p* < .05 vs. iPostC. (B) Transcriptional activity was assessed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in all experimental groups (after 60 min reperfusion). Nrf2 binding to B-ARE (ARE-biotin labeled) forms a shift band at the top of the gel. In the lane 1 it is shown the migration of free B-ARE in the non-denaturing gel of polyacrylamide. Lanes 2–9 show the Nrf2:B-ARE complex in sham (S), ischemic-reperfused (IR), ischemic post-conditioned (iPostC) and post-conditioned hearts treated with ascorbic acid (+asc). Lane 10 shows the competition assay in which an excess of unlabeled ARE (U-ARE) was included. The image is representative of 6 independent experiments. (1.5-column fitting figure).

inhibitor, U. The pharmacological inhibition of Erk1/2 signaling in the iPostC hearts, affected the heart performance during reperfusion, LVP, LVDP, HR, EDP, contractility and relaxation indexes were altered in comparison to iPostC hearts (suppl. Table 1). In this sense, there was also an increase of 4.1-fold of IS compared to iPostC group (Fig. 8A, B). In Fig. 6A is shown PHO-MEK and PHO-Erk1/2 content in iPostC hearts treated with U after 10 min of reperfusion. A significant decrease in the phosphorylation of both kinases was observed in the IR group as compared with sham hearts (*p* < .01), application of iPostC increased the levels of PHO-MEK1/2 and PHO-Erk1/2 in comparison to IR group (*p* < .01), whereas both kinases were inhibited by U administration (+U; *p* < .01). We observed that MEK/Erk1/2 inhibition in the +U group did not decrease Nrf2 phosphorylation at Ser40 at early reperfusion (Fig. 6B). To determine if Erk1/2 inhibition could exert a late effect on Nrf2 activation, we also evaluated Nrf2 nuclear accumulation and binding to B-ARE sequence after 60 min of reperfusion in iPostC hearts. Erk1/2 inhibition in iPostC hearts (+U) did not limit Nrf2 nuclear accumulation in comparison to iPostC group (Fig. 6C). Fig. 6D shows a representative image of EMSA assay. It is observed that the basal binding of Nrf2 to the ARE sequence (lanes 2 and 5) decreased in the IR group (lanes 3 and 6), increased in the iPostC group (lanes 4 and 7) and was maintained in presence of Erk1/2 inhibitor (+U) (lanes 8 and 9).

3.6. Role of PI3K/AKT signaling in Nrf2 activation by iPostC

We also evaluated the possible correlation between PI3K/AKT and downstream Nrf2 activation using W, a specific inhibitor of this pathway. The pharmacological inhibition of PI3K/AKT signaling in the iPostC hearts (+W), altered the following hemodynamic parameters during reperfusion, LVP, LVDP, HR, EDP, contractility and relaxation indexes in comparison to iPostC hearts (suppl. Table 1). Besides the PI3K/AKT inhibition (+W) increased 2.9-fold the infarcted area in comparison to iPostC hearts (*p* < .05) (Fig. 8A and B). PI3K and AKT phosphorylation are shown in Fig. 7A; after 10 min of reperfusion the activation of PI3K and AKT of IR group decreased in comparison to

sham (*p* < .01), whereas both kinases augmented their phosphorylation in iPostC hearts in comparison to IR (*p* < .01) and PI3K/AKT inhibition in the iPostC hearts (+W) blocked such increase (*p* < .01). On the other hand, although Nrf2 phosphorylation concurred with the decrease of PI3K/AKT activity by W in iPostC hearts at early reperfusion (Fig. 7B), the nuclear accumulation of Nrf2 was not decreased and the binding to ARE sequence was even higher than iPostC group (Fig. 7C and D). To corroborate these results, we measured the content of two antioxidant enzymes transcriptionally regulated by Nrf2. In Fig. 7E is shown content corresponding to γ -GCS and HO-1, both were increased in iPostC hearts in comparison with the IR group (*p* < .01), however the effect of PI3K inhibition in iPostC hearts did not modify the antioxidant protein levels.

4. Discussion

Redox imbalance leading to oxidative injury is related with myocardial cell death and impairment of heart function during reperfusion, whereas strategies that preserves redox homeostasis allows activation of survival signaling pathways to maintain a proper heart function. Our results showed the application of iPostC is crucial to maintenance of redox balance as a part of cardiac protection owing to GSH levels were preserved and MDA was not increased after the first minutes of reperfusion. In the iPostC hearts with asc, neither GSH nor MDA levels were significant changed, indicating that the effects we found on signaling was solely due to asc presence in the cell rather than promoting a reductive state through GSH increase. It has been well established that ROS can act as second messengers. Hydrogen peroxide is the main molecule in redox signaling, as it is capable to oxidize a wide range of substrates by reacting with specific thiols, that act as sensors to transmit the redox signal [40]. Now can recognize also that ROS can act as second messengers in heart protection [41–43] and addition of exogenous antioxidants remarkably has abrogated the cardioprotective effects of strategies such as iPostC, likely by promoting a transient reductive environment [24,44]. Noteworthy, our data shows the antioxidant asc depleted hydrogen peroxide levels in the iPostC hearts and

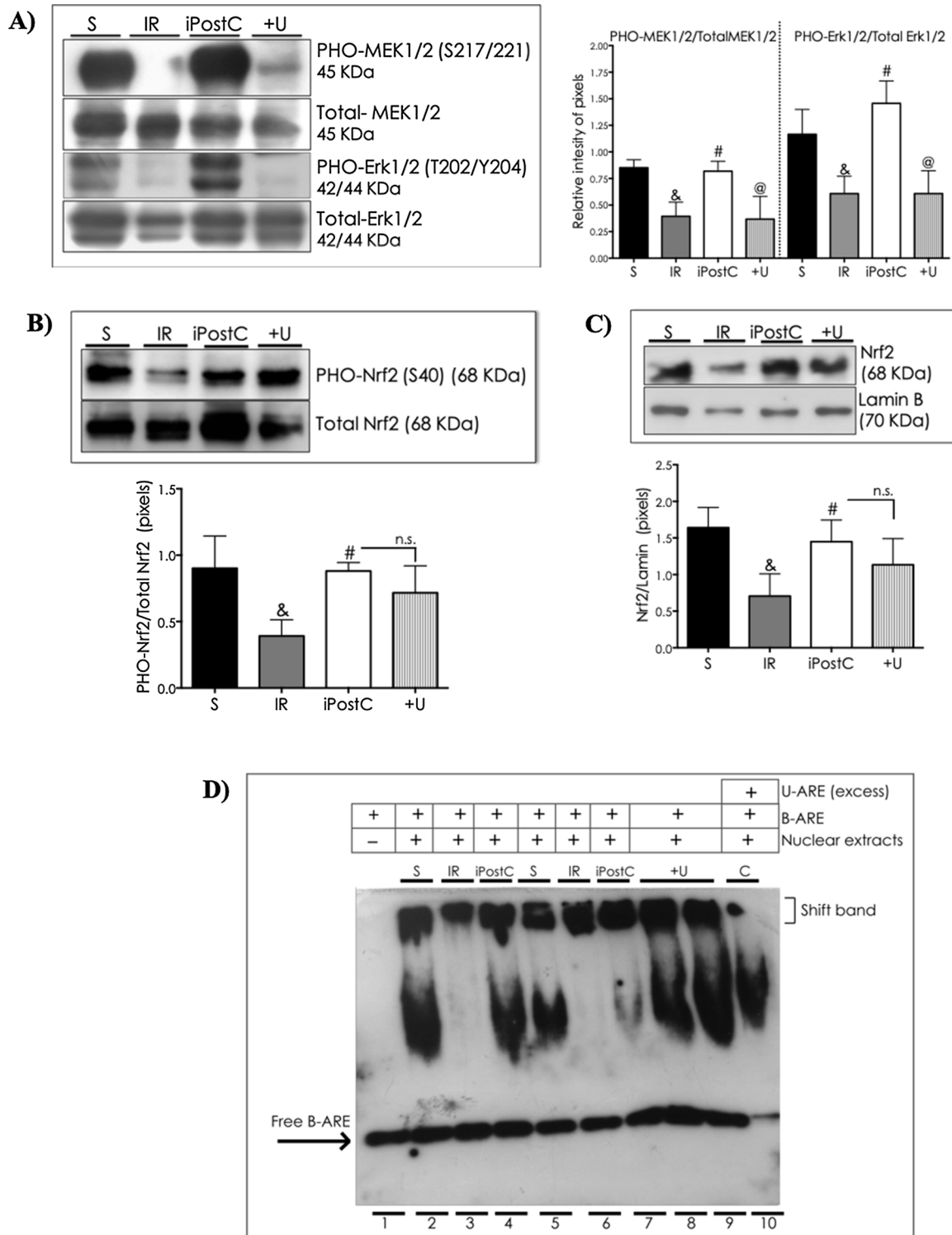


Fig. 6. Nrf2 transcriptional activation is independent of Erk1/2 signaling in iPostC hearts.

(A) PHO-MEK and PHO-Erk1/2 in the presence of U0126 (+U). (B) PHO-Nrf2 normalized to total-Nrf2 in reperused groups for 10 min. (C) Nrf2 content normalized with Lamin B in nuclear fractions. Graphics show the mean data of at least 5 experiments \pm S.D. [&]*p* < .01 vs. Sham; [#]*p* < .01 vs. IR; [@]*p* < .01 vs. iPostC and non-significant: n.s. (D) Representative EMSA of 6 different experiments, showing Nrf2:B-ARE complex formation. Lane 1 corresponds to free B-ARE migration. Lanes 2–9 show complex formation of sham (S), ischemic-reperfused (IR), ischemic post-conditioned (iPostC) and post-conditioned hearts treated with inhibitor U0126 (+U). Lane 10 shows competition assay (C). (1.5-column fitting figure).

this concurred with the impairment of heart function. Indeed, disruption of redox homeostasis towards a pro-reductive state has been described as ‘reductive stress’ [45], abolishing the redox signaling causing detrimental and pathological effects in hearts [46–48]. As prolonged

and overwhelming unbalance either towards oxidative or reductive states are harmful for the cell, it can be speculated that the disappointing results exerted by antioxidant therapies in the setting of ischemic reperused heart damage [49–51], that have been even

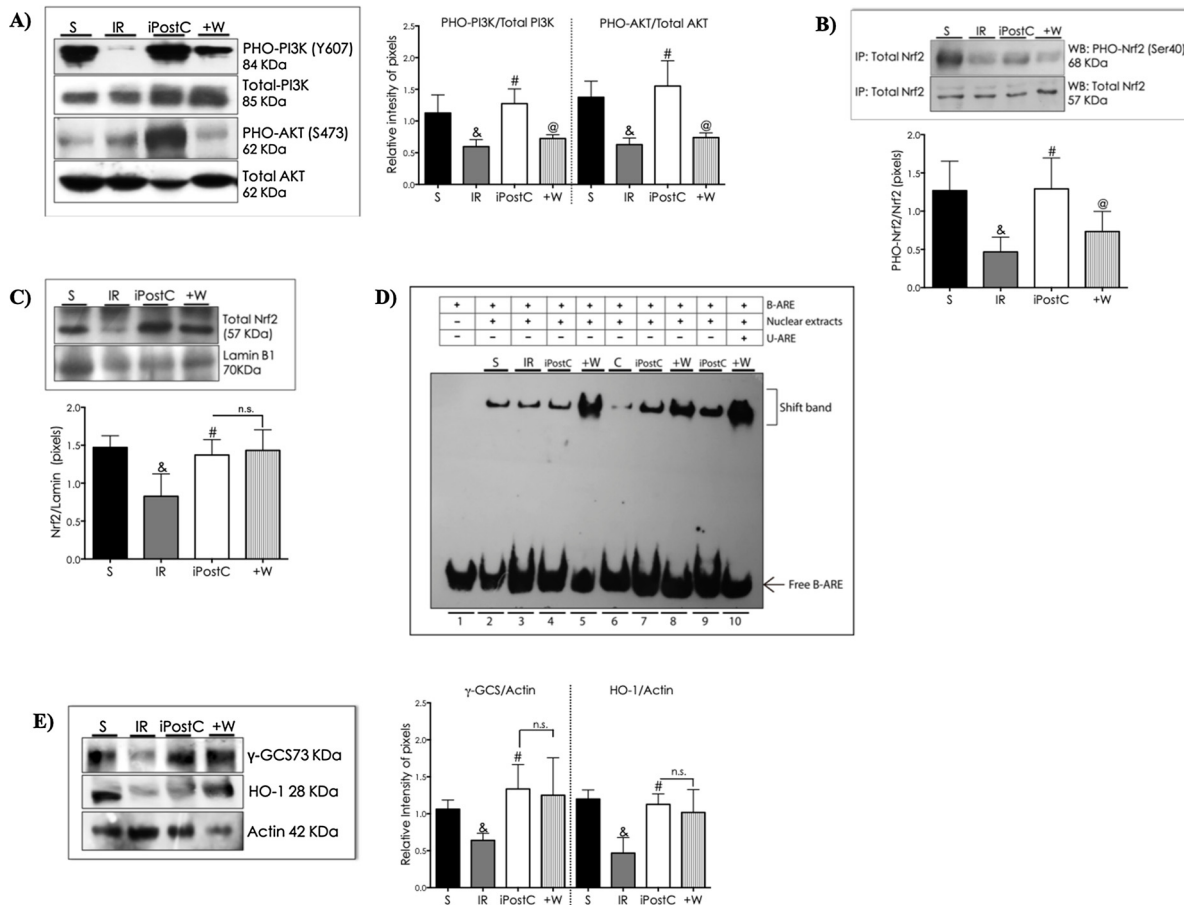


Fig. 7. Transcriptional activation of Nrf2 was not mediated by PI3K/AKT in the iPostC hearts.

(A) PHO-PI3K and PHO-AKT content obtained after 60 min of reperfusion related to their corresponding total protein. Sham (S), ischemic-reperfused (IR), ischemic post-conditioned (iPostC) and post-conditioned treated with wortmannin inhibitor (+W). (B) PHO-Nrf2 (Ser40) and total-Nrf2 detected in samples subjected to Nrf2:immunoprecipitation (IP). (C) Total Nrf2 content obtained after 60 min of reperfusion in nuclear fractions. Lamin B1 was evaluated as a loading marker. (D) EMSA showing free B-ARE migration (lane 1), complex formation in experimental groups (lanes 2–5 and 7–10) and competition assay (lane 6; C). (E) γ -Glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) and hemoxygenase-1 (HO-1) content after 60 min of reperfusion related with actin as loading marker. Data are the mean of at least 5 experiments \pm S.D. &#p < .01 vs. Sham; #p < .01 vs. IR; @p < .01 vs. iPostC and non-significant (n.s.). (2-column fitting figure).

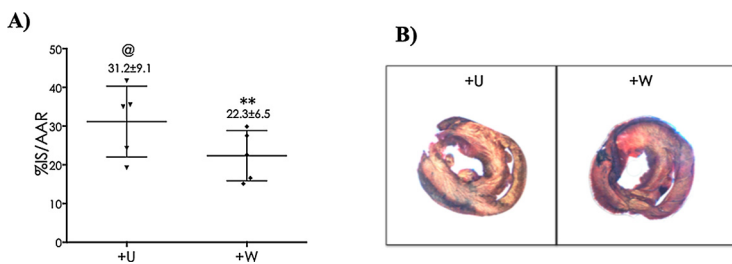


Fig. 8. Infarct size measurement.

A) Representative images of heart slices corresponding to inhibitors administration to iPostC hearts: +U (U0126) and +W (wortmannin) groups. Blue stain, non-risk area; Red stain, viable tissue; Pale stain, infarcted area. B) Infarct size was calculated as percentage related to area at risk. IS = Infarct size; AAR = area at risk; Data represents the mean of 5 independent experiments \pm S.D. @p < .01 vs. iPostC; **p < .05 vs. iPostC. (1.5-column fitting column), color figure. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

deleterious [52], might result not only from inadequate delivering in the sites of ROS generation or from the inopportune concentration, but from the establishment of a more reductive state in the cardiac cell. We found that the impairment of heart performance by the *asc* effect in iPostC hearts correlated with hydrogen peroxide depletion and with the diminishment of PKC ϵ and Erk1/2 activation but did not inhibit MEK and PI3K/AKT signaling in such conditions. In this sense, a prominent research group has proposed that ROS act as mediators rather than triggers of cardioprotection, as their concentration is raised after mitoKATP opening and regulate mitochondrial PKC activation [53]. According to our results we propose that hydrogen peroxide could act as a trigger of the redox signaling because its depletion by *asc* in the iPostC hearts, at the first minutes of reperfusion partially inhibited PKC and Erk1/2 activation. Although our results showed that PI3K/AKT

activation was not redox-dependent in these conditions, it has been described that this pathway could be regulated by S-nitrosylation process. In ischemic brains PTEN (Phosphatase with sequence homology to tensin) was inhibited by S-nitrosylation augmenting AKT signaling promoting cell survival [54]. So far, many research groups have described the activation of the RISK pathway at early reperfusion to protect heart [13,14,55], nevertheless the targets involved by such activation have not been fully described.

The transcription factor Nrf2 contributes to maintain long-lasting protection in iPostC hearts, as it involves de novo synthesis of antioxidant proteins [21]. To evaluate the implications of redox signaling on downstream activation of Nrf2, we evaluated its activity after *asc* application in iPostC hearts and after pharmacological inhibition of ERK1/2 or PI3K, in order to know if Nrf2 could be a target of these

kinases. Our results show that Nrf2 activation is likely related with hydrogen peroxide-signaling since its depletion by *asc* in iPostC hearts decreased Nrf2 activation. Pharmacological inhibition of Erk1/2 did not inhibit Nrf2 transcriptional activation in iPostC hearts, neither phosphorylation at Ser40, nuclear accumulation nor binding to ARE sequence. Of note, phosphorylation of Ser40 in Nrf2 is crucial for its activation, promoting Keap1 disruption [56]. In the sequence of Nrf2 there are only 2 potential target sites for phosphorylation at Ser426 and Ser569 by Erk1/2, that is a Ser/Thr kinase, which phosphorylates preferentially Ser flanked by Pro residues [57]. Hypothetically, Nrf2 has not suitable residues to be phosphorylated by Erk1/2. Although, it has been reported that stimulating HepG2 cells with butylated hydroxyanisole, resulted in enhancement of Nrf2 activation mediated by Erk1/2 phosphorylation [58], nevertheless Nrf2 does not appear to be a direct target of Erk1/2 in the iPostC hearts, thus Erk1/2 signaling has other protective targets. In this context, our group reported that Erk1/2 is translocated into mitochondria of iPostC hearts contributing to preserve their function and conferring cell protection [59]. Therefore, the cardioprotective effects of Erk1/2 in iPostC hearts are independent of those exerted by Nrf2. Finally, pharmacological inhibition of PI3K in the iPostC hearts did not inhibit Nrf2 transcriptional activity, it would seem that the binding to ARE sequence was increased, although HO-1 and γ -GCS content were not changed in such conditions. For instance, there is a report that propose that PI3K/AKT/Nrf2 signaling confers cardioprotection in a model of hyperbaric oxygen preconditioning [60], however in the iPostC hearts the activation of Nrf2 is independent of PI3K signaling. Our results together indicate that Nrf2 activation in iPostC hearts is related with hydrogen peroxide-signaling in an independent way of the survival signaling of PI3K and Erk1/2.

Notably, a raising question would be whether this mechanism could be activated by iPostC also in female rat hearts, because IS has shown to be gender-dependent. Indeed, it has been reported that short-duration ischemia increases IS more in female than male rat hearts [61] and besides it seems that gender differences influence the activation of cardioprotective pathways [62,63].

5. Conclusion

We provide new insights about the paramount role of redox-balance preservation by iPostC and the role of hydrogen peroxide as a trigger of survival signals driven by kinase-dependent mechanisms. The cardiac protective signaling activated by iPostC include redox-dependent and -independent mechanisms, which act in concert activating different pathways in order to prevent reperfusion injury and concurs with the activation of Nrf2.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This article is dedicated to the memory of Dr. Edmundo Chávez Cossío†, deceased December 24, 2018, we thank for his helpful advice. The authors also thank to Dr. Roxana Carbó Zabala for helpful comments and we thank for the technical assistance to **Jesus Pineda-Lugardo** B.Sc. and Victor Sosa-Morales M.D. The project received an internal funding for Research from National Institute of Cardiology, I.Ch.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109417>.

References

- [1] X. Li, F. Arslan, Y. Ren, S. Adav, K. Poh, V. Sorokin, C.N. Lee, D. de Kleijn, S.K. Lim, S.K. Sze, Metabolic adaptation to a disruption in oxygen supply during myocardial ischemia and reperfusion is underpinned by temporal and quantitative changes in the cardiac proteome, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 2331–2346, <https://doi.org/10.1021/pr201025m>.
- [2] N. Mewton, P. Croisille, G. Gahide, G. Rioufol, E. Bonnefoy, I. Sanchez, T.T. Cung, C. Sportouch, D. Angoulvant, G. Finet, X. André-Fouët, G. Derumeaux, C. Piot, H. Vernhet, D. Revel, M. Ovize, Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 55 (12) (2010) 1200–1205, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.10.052>.
- [3] S.B. Ong, P. Samangouei, S.B. Kalkhoran, D.J. Hausenloy, The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78 (2015) 23–34, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.005>.
- [4] D.J. Hausenloy, D.M. Yellon, Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 92–100 (doi:0.1172/JCI62874).
- [5] F. Tullio, C. Angotti, M.G. Perrelli, C. Penna, P. Pagliaro, Redox balance and cardioprotection, *Basic Res. Cardiol.* 108 (2013) 392, <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0392-7>.
- [6] Z.-Q. Zhao, J.S. Corvera, M.E. Halkos, F. Kerendi, N.-P. Wang, R.A. Guyton, J. Vinten-Johansen, Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285 (2003), <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002> (H579–8).
- [7] A. Skyschally, P. Caster, E. Iliodromitis, R. Schulz, D. Kremastinos, G. Heusch, Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms, *Basic Res. Cardiol.* 104 (2009) 469–483, <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0040-4>.
- [8] P. Staat, G. Rioufol, C. Piot, Y. Cottin, T. Cung, I. L'Huillier, J.-F. Aupetit, E. Bonnefoy, G. Finet, X. André-Fouët, M. Ovize, Postconditioning the human heart, *Circulation.* 112 (2005) 2143–2148, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.558122>.
- [9] C.M. Zhao, X.J. Yang, J.H. Yang, X.J. Cheng, X. Zhao, B.Y. Zhou, S.D. Xu, H.F. Wang, Effect of ischaemic postconditioning on recovery of left ventricular contractile function after acute myocardial infarction, *J. Int. Med.* 260 (3) (2012) 1082–1088, <https://doi.org/10.1111/j.147323001204000327>.
- [10] J. Lønborg, L. Holmvang, H. Kelbæk, N. Vejstrup, E. Jørgensen, S. Helqvist, K. Saunamäki, P. Clemmensen, M. Treiman, J. Jensen, T. Engstrøm, ST-Segment resolution and clinical outcome with ischemic postconditioning and comparison to magnetic resonance, *Am. Heart J.* 160 (2010) 1085–1091, <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.09.026>.
- [11] A.R. Khan, A.A. Binabduhah, Y. Alastal, S. Khan, B.M. Faricy-Beredo, F.K. Luni, W.M. Lee, S. Khuder, J. Tinkel, Cardioprotective role of ischemic postconditioning in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis, *Am. Heart J.* 168 (2014) 512–21e4, <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2014.06.021>.
- [12] X.-M. Yang, S. Philipp, J. Downey, M. Cohen, Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation, *Basic Res. Cardiol.* 100 (2005) 57–63, <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0498-4>.
- [13] A. Tsang, D.J. Hausenloy, M.M. Mocanu, D.M. Yellon, Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway, *Circ. Res.* 95 (2004) 230–232, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000138303.76488.fe>.
- [14] C.E. Darling, R. Jiang, M. Maynard, P. Whittaker, J. Vinten-Johansen, K. Przyklenk, Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289 (2005) H1618–H1626, <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00055.2005>.
- [15] L.M. Schwartz, C.J. Lagranha, Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (2006) H1011–H1018, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00864.2005>.
- [16] A.J. Zatta, H. Kin, G. Lee, N. Wang, R. Jiang, R. Lust, J.G. Reeves, J. Mykytenko, R.A. Guyton, Z.Q. Zhao, J. Vinten-Johansen, Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling, *Cardiovasc. Res.* 70 (2006) 315–324, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.11.030>.
- [17] S. Dong, Z. Teng, F.-H. Lu, Y.-J. Zhao, H. Li, H. Ren, H. Chen, Z.-W. Pan, Y.-J. Lv, B.-F. Yang, Y. Tian, C.-Q. Xu, W.-H. Zhang, Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC (epsilon)-interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk, *Mol. Cell. Biochem.* 341 (2010), <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0450-5> (195–06).
- [18] G. Serviddio, N. Di Venosa, A. Federici, D. D'Agostino, T. Rollo, F. Prigigallo, E. Altomare, T. Fiore, G. Vendemiale, Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion, *FASEB J.* 19 (2005) 354–361, <https://doi.org/10.1096/fj.04-2338com>.
- [19] F. Arreguín, N. García, S. Hernández-Reséndiz, M. Buelna-Chontal, F. Correa, V. Olin-Sandoval, O.N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, C. Zazueta, Attenuation of oxidant damage in the postconditioned heart involves non-enzymatic response and partial catalytic protection, *Exp. Physiol.* 97 (2012) 1119–1130, <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.065763>.
- [20] F. Correa, M. Buelna-Chontal, V. Chagoya, G. García-Rivas, R.M. Viguera, J. Pedraza-Chaverri, C. Zazueta, Post-conditioning activates the nitric oxide/ cGMP pathway in hearts with apical myocardial infarction conferring cardioprotection, *Eur. J. Pharmacol.* 765 (2015) 472–481, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.018>.

- [21] M. Buelna-Chontal, J.G. Guevara-Chávez, A. Silva-Palacios, O.-N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, C. Zazueta, Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts, *Free Radic. Biol. Med.* 74 (2014) 145–156, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.021>.
- [22] T. Finkel, Signal transduction by reactive oxygen species, *J. Cell Biol.* 194 (1) (2011) 7–15, <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>.
- [23] M. Buelna-Chontal, C. Zazueta, Redox activation of Nrf2 & NF-kappaB: a double end sword? *Cell. Signal.* 25 (12) (2013) 2548–2557, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.007>.
- [24] C. Penna, R. Rastaldo, D. Mancardi, S. Raimondo, S. Cappello, D. Gattullo, G. Losano, P. Pagliaro, Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation, *Basic Res. Cardiol.* 101 (2006) 180–189, <https://doi.org/10.1007/s00395-006-0584-5>.
- [25] H.E. Bøtker, D. Hausenloy, I. Andreadou, S. Antonucci, K. Boengler, S.M. Davidson, S. Deshwal, Y. Devaux, F. Di Lisa, M. Di Sante, P. Efentakis, S. Femminò, D. García-Dorado, Z. Giricz, B. Ibanez, E. Iliodromitis, N. Kaluderic, P. Kleinbongard, M. Neuhäuser, M. Ovize, P. Pagliaro, M. Rahbeck-Shmidt, M. Ruiz-Meana, K.D. Schlüter, R. Schulz, A. Skyschally, C. Wilder, D.M. Yellon, P. Ferdinandy, G. Heusch, Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection, *Basic Res. Cardiol.* 113 (5) (2018) 39, <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0696-8>.
- [26] E. Parra, D. Cruz, G. García, C. Zazueta, F. Correa, N. García, E. Chávez, Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart, *Mol. Cell. Biochem.* 269 (1–2) (2005) 19–26, <https://doi.org/10.1007/s11010-005-2989-0>.
- [27] R.A. Kloner, J. Dow, A. Bhandari, Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 11 (1) (2006) 55–63, <https://doi.org/10.4103/0253-7613.174545>.
- [28] J.M. Hagar, S.L. Hale, R.A. Kloner, Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat, *Circ. Res.* 68 (1991) 61–68, <https://doi.org/10.1161/01.cir.68.1.61>.
- [29] H. Kin, Z.Q. Zhao, H.-Y. Sun, N.P. Wang, J.S. Corvera, M.E. Halkos, F. Kerendi, R.A. Guyton, J. Vinten-Johansen, Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion, *Cardiovasc. Res.* 62 (2004) 74–85, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.006>.
- [30] J. Fang, L. Wu, L. Chen, Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats, *Acta Cardiol.* 63 (2008) 377–387, <https://doi.org/10.2143/AC.63.3.1020316>.
- [31] K. Boengler, G. Heusch, R. Schulz, Mitochondria in postconditioning, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (5) (2011) 863–880, <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3309>.
- [32] M.S. Tsai, C.H. Huang, C.Y. Tsai, H.W. Chen, H.J. Cheng, C.Y. Hsu, W.T. Chang, W.S. Chen, Combination of intravenous ascorbic acid administration and hypothermia after resuscitation improves myocardial function and survival in a ventricular fibrillation cardiac arrest model in the rat, *Acad. Emerg. Med.* 21 (3) (2014) 257–265, <https://doi.org/10.1111/acem.12335>.
- [33] A. Gladbach, J. van Eersel, M. Bi, Y.D. Ke, L.M. Ittner, ERK inhibition with PD184161 mitigates brain damage in a mouse model of stroke, *J. Neural Transm. (Vienna)* 121 (5) (2014) 543–547, <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1138-2>.
- [34] A. Arcaro, M.P. Wymann, Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses, *Biochem. J.* 296 (1993) 297–301 Pt 2. (PMID: 8257416).
- [35] K. Boengler, D. Hilfiker-Kleiner, G. Heusch, R. Schulz, Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion, *Basic Res. Cardiol.* 105 (2010) 771–785, <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0124-1>.
- [36] S. Dikalov, K.K. Griendling, D.G. Harrison, Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies, *Hypertension.* 49 (4) (2007) 717–727, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b>.
- [37] D. Gérard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Régnard, N. Moze-Henry, J.C. Yadan, J. Chaudière, Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (10) (1998) 1176–1183, <https://doi.org/10.1021/cx9701790>.
- [38] J.C. Fernández-Checa, N. Kaplowitz, The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis, *Anal. Biochem.* 190 (2) (1990) 212–219, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90468-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90468-8).
- [39] D.W. Kuster, D. Merkus, H.J. Jorna, D.H. Dekkers, D.J. Duncker, A.J. Verhoeven, Nuclear protein extraction from frozen porcine myocardium, *J. Physiol. Biochem.* 67 (2) (2011) 165–173, <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0059-x>.
- [40] C.C. Winterbourn, Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic. Biol. Med.* 80 (2015) 164–170, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.017>.
- [41] C.P. Baines, M. Goto, J.M. Downey, Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29 (1) (1997) 207–216, <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0265>.
- [42] Y. Liu, X.M. Yang, E.K. Iliodromitis, D.T. Kremastinos, T. Dost, M.V. Cohen, J.M. Downey, Redox signaling at reperfusion is required for protection from ischemic preconditioning but not from a direct PKC activator, *Basic Res. Cardiol.* 103 (1) (2008) 54–59, <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0683-y>.
- [43] T. Yamamura, H. Otani, Y. Nakao, R. Hattori, M. Osako, H. Imamura, D.K. Das, Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria, *Antioxid. Redox Signal.* 3 (1) (2001) 103–112, <https://doi.org/10.1089/152308601750100588>.
- [44] C. Penna, D. Mancardi, R. Rastaldo, G. Losano, P. Pagliaro, Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling, *Cardiovasc. Res.* 75 (2007) 168–177, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.001>.
- [45] N.S. Rajasekaran, P. Connell, E.S. Christians, L.J. Yan, R.P. Taylor, A. Orosz, X.Q. Zhang, T.J. Stevenson, R.M. Peshock, J.A. Leopold, W.H. Barry, J. Loscalzo, S.J. Odelberg, I.J. Benjamin, Human alpha B-crystallin mutation causes oxidative stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice, *Cell* 130 (3) (2007) 427–439, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.044>.
- [46] S. Kannan, V.R. Muthusamy, K.J. Whitehead, L. Wang, A.V. Gomes, S.E. Litwin, T.W. Kensler, E.D. Abel, J.R. Hoidal, N.S. Rajasekaran, Nrf2 deficiency prevents reductive stress-induced hypertrophic cardiomyopathy, *Cardiovasc. Res.* 100 (1) (2013) 63–73, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt150>.
- [47] C.X. Santos, N. Anilkumar, M. Zhang, A.C. Brewer, A.M. Shah, Redox signaling in cardiac myocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (7) (2011) 777–793, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003>.
- [48] G. Shanmugan, M. Narasimhan, S. Tamowski, V. Darley-Usmar, N.S. Rajasekaran, Constitutive activation of Nrf2 induces a stable reductive state in the mouse myocardium, *Redox Biol.* 12 (2017) 937–945, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.038>.
- [49] C. Sinning, D. Westermann, P. Clemmensen, Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives, *Biomark. Med* 11 (11) (2017) 11031–11040, <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0110>.
- [50] A. Separham, S. Ghaffari, H. Najafi, R. Ghaffari, M. Ziaee, H. Babaei, The impact of allopurinol on patients with acute ST elevation myocardial infarction undergoing thromolytic therapy, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 68 (4) (2016) 265–268, <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000409>.
- [51] N. Valls, J.G. Gormaz, R. Aguayo, J. González, R. Brito, D. Hasson, M. Libuy, C. Ramos, R. Carrasco, J.C. Prieto, G. Dussallant, A. Puentes, V. Noriega, R. Rodrigo, Amelioration of persistent left ventricular function impairment through increased plasma ascorbate levels following myocardial infarction, *Redox Rep.* 21 (2) (2016), <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000018> (75–3).
- [52] H.H. Schmidt, R. Stocker, C. Vollbacht, G. Paulsen, D. Riley, A. Daiber, A. Cuadrado, Antioxidants in translational medicine, *Antioxid. Redox Signal.* 23 (14) (2015) 1130–1143, <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6393>.
- [53] C. Penna, D. Mancardi, R. Rastaldo, P. Pagliaro, Cardioprotection: a radical view free radicals in pre and postconditioning, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (7) (2009) 781–793, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.008>.
- [54] N. Numajiri, K. Takasawa, T. Nishiya, H. Tanaka, K. Ohno, W. Hayakawa, M. Asada, H. Matsuda, K. Azumi, H. Kamata, T. Nakamura, H. Hara, M. Minami, S.A. Lipton, T. Uehara, On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (25) (2011) 10349–10354, <https://doi.org/10.1073/pnas.1103503108>.
- [55] S. Philipp, X.M. Yang, L. Cui, A.M. Davis, J.M. Downey, M.V. Cohen, Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade, *Cardiovasc. Res.* 70 (2) (2006) 308–314, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.014>.
- [56] H.C. Huang, T. Nguyen, C.B. Pickett, Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42769–42774, <https://doi.org/10.1074/jbc.M206911200>.
- [57] F.A. Gonzalez, D.L. Raden, R.J. Davis, Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK 2 protein kinases, *J. Biol. Chem.* 266 (33) (1991) 22159–22163, <https://doi.org/10.1074/jbc.266.33.22159>.
- [58] X. Yuan, C. Xu, Z. Pan, Y.S. Keum, J.H. Kim, G. Shen, S. Yu, K.T. Oo, J. Ma, A.N. Kong, Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells, *Mol. Carcinog.* 45 (11) (2006) 841–850, <https://doi.org/10.1002/mc.20234>.
- [59] S. Hernández-Reséndiz, C. Zazueta, PHO-ERK1/2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling, *Life Sci.* 108 (1) (2014) 13–21, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.037>.
- [60] X. Yin, X. Wang, Z. Fan, C. Peng, Z. Ren, L. Huang, Z. Liu, K. Zhao, Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates myocardium ischemia-reperfusion injury through upregulation of heme oxygenase 1 expression: PI3K/Akt/Nrf2 pathway involved, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 20 (4) (2015) 428–438, <https://doi.org/10.1177/1074248414568196>.
- [61] C. Penna, F. Tullio, A. Merlino, F. Moro, S. Raimondo, R. Rastaldo, M.G. Perrelli, D. Mancardi, P. Pagliaro, Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender, *Basic Res. Cardiol.* 104 (4) (2009) 390–402, <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0762-8>.
- [62] C.J. Lagranha, A. Deschamps, A. Aponte, C. Steenberg, E. Murphy, Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females, *Circ. Res.* 106 (11) (2010) 1681–1691, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.213645>.
- [63] A. Ciocci Pardo, S. Scuri, L.F. González Arbeláez, C. Caldiz, J. Fantinelli, S.M. Mosca, Survival kinase-dependent pathways contribute to gender difference in the response to myocardial ischemia-reperfusion and ischemic post-conditioning, *Cardiovasc. Pathol.* 33 (2018) 19–26, <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2017.12.003>.