



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

*EVALUACIÓN DE LA POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
Nrf2 EN LA REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE PROTECCIÓN ENDÓGENA DEL
MIOCARDIO*

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

MABEL BUELNA CHONTAL

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA CARDIOVASCULAR
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA. IGNACIO CHÁVEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSSÍO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

MÉXICO, D. F. Octubre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria...

A mi hermosa hija REBECA, mi motivo.

A mi amado esposo ADRIÁN, mi tierra firme.

Quienes día a día me han dado su apoyo incondicional. Ustedes han sido mi motivación para superar los obstáculos y mi gran alegría de seguir perseverando en este camino de la vida.

A mis padres, y mis hermanos por su sabiduría, amor y fortaleza que me han brindado siempre para seguir adelante.

Sobre todo a Dios que me ha dado bendiciones a manos llenas siempre.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco en gran manera a mi *alma máter*:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Facultad de Medicina,

Agradezco la beca otorgada por el:

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA y TECNOLOGÍA (CONACyT)

NÚMERO DE BECARIO: 262961,

Agradezco al lugar en donde realicé mi proyecto:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA CARDIOVASCULAR

Agradecimientos

Resulta complicado expresar en unas líneas mi agradecimiento por todo el apoyo que, tanto a nivel científico como personal, he recibido de muchos compañeros, amigos y doctores a lo largo de todos estos años de *Tesis Doctoral*. Sin todo ese apoyo habría sido más difícil la travesía.

Este trabajo sin lugar a dudas no hubiera sido posible sin el gran apoyo que me ha brindado mi tutora, a quien admiro grandemente, la Dra. Cecilia Zazueta, le agradezco el haber compartido su conocimiento, experiencia y el haberme apoyado para lograr la obtención del Ph.D. y no sólo eso, sino por tener confianza en mí y en mi trabajo.

No encuentro las palabras que demuestren mi agradecimiento por el gran apoyo otorgado de mi comité tutorial, quienes aportaron en demasía a mi formación. Querido Dr. Chávez, quien además de aportar experiencia para superar obstáculos en mis experimentos fallidos y demás, me ha dado la oportunidad de colaborar en sus trabajos, lo cual valoro y agradezco en sobremanera. Querida, Dra. María Eugenia Gonsebatt, le agradezco infinitamente sus ideas, sus preguntas sus propuestas, su gran disposición siempre, pues esto influyó para que este proyecto pudiera culminarse.

Agradezco al Dr. José Pedraza por el apoyo que me ha brindado desde hace muchos años y aún ahora. Agradezco todo lo que ha aportado desde mis inicios en la investigación, su experiencia indudablemente me ayudó para la publicación que derivó de este trabajo. Aprecio mucho su contribución y no dudo que seguiremos trabajando en conjunto.

Les agradezco en demasía, por el apoyo otorgado en el laboratorio a mis alumnos José y Jorge, cuyo trabajo valoro mucho. Gracias a ustedes porque también por ustedes aprendí mucho y lo sigo haciendo.

A mi querida amiga Ixchel gracias por todo tu apoyo y amistad invaluable, gracias por ayudarme a vencer obstáculos, gracias por darme perspectiva.

A mis queridas amigas Luz y Natalia, que me han ayudado a continuar mi labor siempre a pesar de las circunstancias y obstáculos. A pesar de la distancia. De ustedes aprendí mucho. Gracias.

A todos mis compañeros agradezco su compañía, sus consejos, su conocimiento y su apoyo en el laboratorio. De todos y cada uno aprendí algo valioso. Dr. Correa, Dr. García-Niño, Nadia, Sauri y Alejandro.

Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con el conocimiento, el sentido de la maravillosa estructura de la existencia. Con el humilde intento de comprender aunque no sea más que una porción diminuta de la Razón que se manifiesta en la naturaleza.

Albert Einstein.

Contenido

1. Resumen	16
Abstract.....	17
2. Introducción General	18
2.1 El corazón.....	18
2.2 El infarto agudo al miocardio.....	19
2.3 Daño por reperfusión. Mecanismos involucrados.....	20
2.3.1 La sobrecarga de calcio intracelular.....	21
2.3.2 La disfunción mitocondrial.....	24
2.3.3 La respuesta inflamatoria.....	25
2.3.4 La disfunción endotelial.....	25
2.3.5 La producción de ERO y el estrés oxidante.....	26
2.3.6 El sistema antioxidante endógeno.....	27
2.4 Estrategias contra el daño por reperfusión en el miocardio.....	28
2.4.1 El acondicionamiento y sus ventajas.....	30
2.5 El post-acondicionamiento, estrategia protectora contra el daño por reperfusión en el miocardio.....	31
2.5.1 Mecanismos endógenos de protección que involucra el post-acondicionamiento.....	32
2.5.2 Importancia de la señalización de la vía <i>RISK</i> en el post-acondicionamiento.....	33
2.5.2.2 La vía PI3K/Akt.....	34
2.5.2.3 La vía de la proteína cinasa G.....	34
2.5.2.4 La glucógeno-sintasa cinasa-3 β	35
2.5.2.5 La señalización de Erk1/2.....	35
2.5.2.6 La vía de PKC.....	36
2.6 Nrf2, el regulador maestro del sistema antioxidante.....	39

2.6.1 Mecanismo de regulación de Nrf2. Papel de Keap1.....	40
2.7 Papel de las ERO como moléculas señalizadoras.....	41
3. Antecedentes.....	43
4. Planteamiento del problema.....	45
5. Hipótesis.....	45
6. Objetivo general.....	46
7. Metodología.....	46
7.1 Protocolo experimental en un modelo <i>in vivo</i>	46
7.2 Medición del tamaño del infarto.....	48
7.3 Análisis de actividad de las cinasas RISK (inmunodetección).....	48
7.4 Inmunoprecipitación de Nrf2 y evaluación de su fosforilación en Ser40, en treoninas y tirosinas.....	49
7.5 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).....	49
7.6 Análisis de las proteínas antioxidantes reguladas por Nrf2.....	50
7.7 Papel de PKC en la activación de Nrf2 por el post-acondicionamiento.....	50
7.8 Análisis de la actividad de PKC.....	52
7.9 Ensayo de actividad de glutatión S-transferasa.....	52
7.10 Ensayo de actividad de Cu/Zn-superóxido dismutasa.....	53
7.11 Determinación de glutatión reducido intracelular.....	53
7.12 Papel de PI3K en la activación de Nrf2 por el post-acondicionamiento.....	54
7.13 Determinación de las especies reactivas del oxígeno totales.....	54
7.14 Papel de la señalización redox en la activación de las cinasas PKC, PI3K y Erk1/2.....	55
7.15 Determinación del H ₂ O ₂ en corazones tratados con ácido ascórbico.....	55
8. Análisis estadístico.....	55
9. Resultados.....	56
9.1 Efecto cardioprotector del post-acondicionamiento.....	56

9.2	La activación de las cinasas RISK se relaciona con la fosforilación de Nrf2 en el post-acondicionamiento.....	57
9.3	La aplicación del PostC aumenta la actividad de Nrf2.....	58
9.4	Papel de PKC en la fosforilación de Nrf2 tras la aplicación del post-acondicionamiento.....	62
9.5	Relevancia de la señalización de PKC en la cardioprotección conferida por el post-acondicionamiento.....	64
9.6	La inhibición de PKC afecta la activación del factor de transcripción Nrf2 en el post-acondicionamiento.....	64
9.7	La vía PKC/Nrf2 es importante en el mantenimiento del sistema antioxidante durante la reperfusión.....	64
9.8	Efecto de la inhibición de PI3K sobre la función del corazón en el post-acondicionamiento.....	68
9.9	La inhibición de PI3K en el post-acondicionamiento no disminuyó la activación del factor Nrf2.....	68
9.10	La inhibición de PI3K causa un incremento en la activación de PKC en el post-acondicionamiento.....	71
9.11	El Post-acondicionamiento mantiene a largo plazo el estado redox en el miocardio reperfundido.....	71
9.12	La cardioprotección desencadenada por la aplicación del post-acondicionamiento es dependiente de la señalización redox.....	72
9.13	La disminución del H ₂ O ₂ inhibe la activación de PKC y Erk1/2 en el post-acondicionamiento, no así la activación de PI3K.....	74
9.14	La inhibición de la señalización redox en el post-acondicionamiento afecta la activación del factor de transcripción Nrf2.....	77
9.15	La activación del factor de transcripción Nrf2 por la aplicación del post-acondicionamiento podría no ser por medio de Erk1/2.....	77
10.	Discusión	80
11.	Consideraciones adicionales.....	86
12.	Conclusiones.....	87
13.	Perspectivas.....	88

14.	Referencias.....	88
15.	Publicaciones derivadas de este trabajo.....	108

Índice de figuras y tablas

Introducción

- Figura 1. Principales componentes involucrados en el daño por reperfusión.....22
- Figura 2. Contribuciones del daño provocado por la isquemia y por la reperfusión en el tamaño del infarto.....29
- Figura 3. Resumen del mecanismo de cardioprotección desencadenado por el PostC.....38
- Figura 4. Mecanismo de activación de Nrf2.....42

Metodología

- Figura 5. Protocolo experimental.....51

Resultados

- Figura 6. La aplicación del PostC previene arritmias características del daño por reperfusión.....60
- Figura 7. El PostC disminuye el tamaño del infarto.....61
- Figura 8. La activación de las cinasas RISK correlaciona con la fosforilación de Nrf2 en el PostC.....63
- Figura 9. El PostC activa al factor de transcripción Nrf2 e incrementa la expresión de enzimas antioxidantes.....65
- Figura 10. La inhibición de PKC en el PostC altera la función eléctrica del corazón tras la reperfusión.....67
- Figura 11. Papel de PKC en la fosforilación y activación de Nrf2 en el PostC.....69
- Figura 12. La vía PKC/Nrf2 en el PostC, es importante en el mantenimiento del sistema antioxidante durante la reperfusión.....70
- Figura 13. Efecto de la inhibición de PI3K sobre la función del corazón en el PostC.....72
- Figura 14. La inhibición de PI3K no disminuyó la activación de Nrf2 en el PostC.....73
- Figura 15. La inhibición de PI3K incrementa la activación de PKC en el

	PostC.....	74
Figura 16.	Estado redox en el miocardio post-acondicionado.....	75
Figura 17.	La cardioprotección asociada al PostC es dependiente de la señalización redox.....	76
Figura 18.	La señalización de las RISK: PKC y Erk1/2 es sensible al estado redox, no así la activación de PI3K en el PostC.....	78
Figura 19.	La inhibición de la señalización redox afecta la activación de Nrf2 en el PostC.....	79
Figura 20.	Análisis de la secuencia primaria de Nrf2.....	79
	Conclusión	
Figura 21.	La activación dependiente del estado redox de PKC/Nrf2, mediada por el H ₂ O ₂ en el PostC, activa al sistema antioxidante protegiendo al miocardio reperfundido.....	87
	Tablas	
Tabla1.	Parámetros hemodinámicos.....	59
Tabla 2.	El efecto de la inhibición de PKC sobre la función del corazón con PostC.....	66

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción	Principal función
IAM	Infarto agudo al miocardio	Principal causa de muerte a nivel mundial.
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Enzima que cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato.
ERO	Especies reactivas de oxígeno	Moléculas parcialmente reducidas del oxígeno, altamente reactivas, incluyen radicales y no radicales.
Ca ²⁺	Calcio	Participa en la contracción muscular y como segundo mensajero en señalización celular.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	Coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas.
FADH	Flavín adenín dinucleótido	Coenzima que interviene en las reacciones metabólicas de oxidación-reducción.
ATPasa	Enzimas que catalizan hidrólisis del ATP.	Enzimas capaces de producir la hidrólisis del adenosin-trifosfato (ATP) en adenosin-difosfato (ADP) y en fosfato inorgánico.
H ⁺	Protones	Establece un potencial electroquímico.
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico	Segundo mensajero en la transducción de señales celulares.
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético	Agente quelante de metales.
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico	Enzima dependiente de ATP que transporta Ca ²⁺ activamente hacia el interior del RS.
$\Delta\psi$	Potencial transmembranal de la mitocondria	Gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, necesarios para la generación de ATP por la ATP sintasa.
mPTP	Poros de la transición de la membrana interna mitocondrial	Poros inespecíficos que se forman en la membrana interna, que permiten el paso de moléculas no mayores a 1.5 kDa.
NF- κ B (p65)	Factor nuclear kappa-B (p65)	Factor de transcripción formado por el dímero p65-p50, modula la expresión de moléculas pro-inflamatorias.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	Es una ERO, involucrada en la señalización redox en la célula.
SOD	Superóxido dismutasa	Enzima antioxidante que detoxifica al anión superóxido produciendo H ₂ O ₂ .
GSH	Glutatiión reducido	Principal antioxidante de bajo peso molecular en la célula.
PKC	Proteína cinasa C	Cinasa que participa en mecanismos de supervivencia de la célula.
GSSG	Glutatiión oxidado	Es reducido por la glutatiión reductasa.

γ -GCS	Gama-glutamil cisteína sintetasa	Enzima antioxidante que cataliza el paso limitante de la síntesis del GSH.
GST	Glutación S-transferasa	Enzima antioxidante que conjuga al GSH con electrófilos.
PostC	Post-acondicionamiento	Maniobra mecánica que consiste en aplicar ciclos cortos de isquemia/reperfusión en la arteria coronaria del corazón, justo después del evento isquémico.
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G	Receptores transmembranales de 7 dominios que participan en la transducción de señales.
RISK	Señalización de 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.
PI3K/Akt	Fosfoinositol-3 cinasa/Akt (proteína cinasa B)	Está implicada en supervivencia celular al activar a la eNOS. Participa también en crecimiento, proliferación, movilidad y tráfico celular.
MEK/Erk1/2	Cinasas activadas por mitógenos/Cinasas activadas por señales extracelulares	Tiene función importante en el crecimiento y diferenciación celular. Se ha implicado en la supervivencia de la célula.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral	Citocina que interviene en la inflamación.
STAT-3	Transductor de señal y activador de transcripción 3	Participa en una gran variedad de procesos celulares como la proliferación celular y apoptosis. Se ha relacionado además con la supervivencia del corazón.
SAFE	Activación del factor de supervivencia	Vía de supervivencia que involucra la activación de TNF- α y STAT-3.
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial	Genera óxido nítrico en el endotelio. Se ha involucrado con la vasodilatación. Se asocia a mecanismos de protección.
PKG	Proteína cinasa G	Cinasa que requiere GMPc para su activación. Se ha implicado en la protección contra el daño por reperfusión.
p70S6K	Proteína cinasa ribosomal p70 S6	Componente de la maquinaria de la síntesis de proteínas.
GSK-3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3- β	Participa en metabolismo y división celular. Su inactivación se ha implicado en prevenir la disfunción mitocondrial como mecanismo de protección contra el daño por reperfusión.
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 PostC.
CaR	Receptor sensible a calcio	Receptor acoplado a proteína G que detecta los niveles extracelulares de Ca ²⁺ .
Nrf2	Factor nuclear E2	Factor que regula la transcripción de genes

	relacionado al factor 2	que codifican para enzimas antioxidantes y detoxificantes.
bZIP	Cierre ('zipper') de leucinas	Dominio estructural supersecundario de proteínas que crea fuerzas de adhesión por medio de hélices alfa. Es un dominio de dimerización común en factores de transcripción.
HO-1	Hemoxygenasa-1	Enzima antioxidante regulada por Nrf2, la cual participa en la detoxificación de los grupos hemo. Produce biliverdina y monóxido de carbono.
NQO1	NADPH-quinona óxido reductasa-1	Enzima antioxidante regulada por Nrf2, cuya función es detoxificar quinonas.
AHR	Factor de transcripción aril-hidrocarbano	Factor de transcripción activado por ligando y juega un papel importante en el desarrollo del cáncer.
MAFG	V-maf músculo aponeurótico fibrosarcoma oncogen homólogo G	Puede funcionar como represor transcripcional cuando se homodimeriza, o como co-activador transcripcional cuando se heterodimeriza con otras proteínas con cierre de leucinas.
RXRA	Receptor retinoide X alfa	Receptores nucleares que median los efectos biológicos de los retinoides por su papel en la activación de genes mediada por el ácido retinoico.
MyC	v-myc mielocistomatosis ciral oncogenhomólogo	Son una familia de protooncogenes. Se encuentran en células normales y regulan la actividad de otros genes.
CEBPA	CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP) alfa	Co-activador transcripcional.
YAF2	Factor asociado 2aYY1	Puede ser co-activador o co-represor transcripcional.
HES1	Potenciador 'hairy' de división 1	Factor de transcripción que regula genes que codifican para proteínas que suprimen la transcripción de genes blanco.
Keap 1	Proteína 1 asociada al dominio SH parecida a Kelch	Represor citosólico de Nrf2.
Cul3	Complejo de ubiquitinación Cullin-3	Complejo de ubiquitinación ligasa E3. Participa en la degradación proteosomal de proteínas blanco.
ARE	Elementos de respuesta antioxidante	Secuencia de ADN que reconoce Nrf2 en el promotor de sus genes blanco.
ARE-B	Secuencia ARE-biotinilada	
ARE-U	Secuencia ARE-no marcada con biotina	
TBE	Amortiguador Tris-borato-	Usado en electroforesis para separar ácidos

	EDTA	nucleicos.
Q	Quelitrina	Inhibidor de PKC.
CDNB	1-Cloro 2,4-dinitro-benceno	Usado para evaluar la actividad de la GST. La GST cataliza una reacción de conjugación del CDNB con el GSH.
NBT	Nitro azul de tetrazolio	Utilizado para medir la actividad de la SOD. Este reactivo puede detectar la formación del anión superóxido, al reducirse formando una sal de formazán color azul.
mCB	Monoclorobimano	Reacciona con los tioles, es utilizado para la medición del GSH, en una reacción acoplada a la GST.
W	Wortmanina	Inhibidor de PI3K.
DCFH-DA	2,7-dicloro-dihidro fluoresceína-diacetato	Reactivo utilizado para la medición de ERO totales. La forma oxidada de esta molécula es altamente fluorescente.
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia	Para expresar cuantitativamente los resultados de los ensayos fluorométricos, normalizados por mg de proteína en el ensayo.
asc	Ácido ascórbico	Antioxidante con capacidad de atrapar H_2O_2 .
HRP	Peroxidasa de rábano	Enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del H_2O_2 .
Amplex Red	N-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina	Reactivo fluorométrico para evaluar al H_2O_2 , cuando se acopla la reacción con la enzima HRP, la cual cataliza su oxidación para producir resorufina que es altamente fluorescente.
HR	Frecuencia cardiaca	Medida que se expresa en latidos/minutos para evaluar el desempeño del corazón.
LVP	Presión del ventrículo izquierdo	Presión sistólica del ventrículo izquierdo en mmHg.
LVDP	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo	Sirve para evaluar la función sistólica del corazón.
dP/dt_{max}	Máximo valor de variación de presión sobre la variación del tiempo, durante el ciclo cardiaco	Índice de contractilidad
dP/dt_{min}	Mínimo valor de variación de presión sobre la variación del tiempo, durante el ciclo cardiaco	Índice de relajación
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.
EGFR-1	Regulador de la respuesta temprana al crecimiento-1	Su activación es importante para la respuesta inmune innata en la piel humana.
IL-6	Interleucina-6	Citocina pro-inflamatoria.
Zac-1	Proteína con dedos de zinc que regula la apoptosis y el arresto del ciclo celular	Es un factor de transcripción esencial para la morfogénesis cardíaca.
preC	Pre-acondicionamiento	Estrategia mecánica que acondiciona al corazón antes de la isquemia. Consiste en aplicar ciclos cortos de isquemia/reperfusión en la arteria coronaria.

1. Resumen

El Post-acondicionamiento (PostC) activa mecanismos endógenos en el miocardio que protegen contra el daño por reperfusión. Sin embargo, aunque la eficiencia protectora del PostC en el miocardio, se ha demostrado ampliamente en estudios experimentales y de manera limitada en pruebas clínicas, sigue faltando un panorama completo de los mecanismos que se activan. Es particularmente importante el estudio de la relación entre el mantenimiento redox en la célula y la señalización de cinasas de la vía RISK (*"Reperfusion Injury Salvage Kinases"*). Nuestros resultados permitieron dilucidar que la cardioprotección que activa el PostC en el miocardio reperfundido, involucra la señalización dependiente de las especies reactivas de oxígeno (ERO), específicamente del H₂O₂. La señalización redox regula la activación de las cinasas RISK: Erk1/2 y PKC, pero no de PI3K/Akt. Además, encontramos que el factor de transcripción Nrf2 (*"Nuclear factor E2-Related Factor 2"*), el principal regulador de la respuesta antioxidante intracelular, es blanco de PKC y no de PI3K/Akt ni de Erk1/2. Finalmente proponemos que **la activación de la vía PKC/Nrf2 es dependiente de la regulación redox y participa de forma importante en la cardioprotección conferida por el PostC**, al mantener al sistema antioxidante activo en la reperfusión, siendo ésta la segunda ventana de cardioprotección a largo plazo activada por la maniobra.

Abstract

Postconditioning (PostC) activates endogenous protective mechanisms in the myocardium against reperfusion injury. Nevertheless, although PostC efficiency in the myocardium has been extensively demonstrated in experimental studies and in a limited way in clinical trials, is still lacking a complete picture of the activated mechanisms. Of particular relevance is the study of the relationship between cellular redox maintenance and kinase signaling of the RISK pathway ('Reperfusion Injury Salvage Kinase'). Our results led us to elucidate that cardiac protection activated by PostC in the reperfused myocardium involves reactive oxygen species (ERO)-dependent signaling, specifically H₂O₂. The redox-signaling regulates RISK kinase activation: Erk1/2 and PKC but no PI3K/Akt in the PostC. Besides, we found that the transcription factor Nrf2 ('Nuclear factor E2-Related Factor 2'), the main regulator of intracellular antioxidant response, is a target of PKC, but not of PI3K/Akt nor of Erk1/2. Finally we propose that the **redox-dependent activation of the PKC/Nrf2 pathway participates importantly in the cardiac protection triggered by PostC**, maintaining active the antioxidant system during reperfusion that constitutes the second window of long term cardiac protection activated by the maneuver.

2. Introducción General

2.1 El corazón

El corazón como bomba contráctil tiene el más alto consumo de O₂, entre todos los órganos del cuerpo, pudiendo incrementarse hasta 5 veces más durante el ejercicio (Ramanathan & Skinner, 2005). La microvasculatura se encarga de suministrar O₂ y nutrientes a los cardiomiocitos; se sabe que existe una relación 1:1 entre el número de cardiomiocitos y de capilares (Buja & Vela 2008). El balance entre el suministro de O₂ miocárdico y su consumo se mantiene a través de mecanismos complejos, que regulan la función contráctil cuando ocurren fluctuaciones fisiológicas, por ejemplo durante el crecimiento y la diferenciación, así como durante condiciones patológicas como hipoxia, isquemia, presión y sobrecarga de volumen (Santos *et al.*, 2011).

Aunque el número de células endoteliales y otras células no-miocíticas constituyen aproximadamente el 75% del número de células en el miocardio, los grandes cardiomiocitos constituyen el 75% del volumen del mismo (Buja, 2013; Buja & Vela, 2008). Los cardiomiocitos están especializados en la actividad contráctil y como resultado tienen una alta demanda energética (Santos *et al.*, 2011) que deriva del gran número de mitocondrias, las cuales representan aproximadamente 30% del volumen del cardiomiocito (Long *et al.*, 2015; Givvimani *et al.*, 2015). Las mitocondrias están organizadas en filas ordenadas, espaciadas entre los miofilamentos cercanos al retículo sarcoplásmico y también agrupadas alrededor del núcleo. Tal organización facilita la disponibilidad de ATP y de calcio (regulada por el retículo sarcoplásmico) para que se lleve a cabo la contracción de los miofilamentos (Santos *et al.*, 2011).

En el corazón adulto, la β -oxidación de los ácidos grasos aporta entre el 60-80% de la producción de ATP, mientras que el resto proviene de la glucólisis aerobia

y la oxidación de los cuerpos cetónicos (Jaswal *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2007; Aon *et al.*, 2014). Bajo condiciones fisiológicas normales, existe un estricto balance entre la oxidación de glucosa y la β -oxidación de ácidos grasos, sin embargo en ciertas condiciones puede alterarse de manera que la producción de ATP dependa de la glucólisis, lo que disminuye la eficiencia cardiaca (Jaswal *et al.*, 2011).

2.2 El infarto agudo al miocardio

La aterosclerosis coronaria, es la principal causa en el desarrollo de las enfermedades coronarias del corazón (Hasan *et al.*, 2014), pues al reducirse de manera significativa la irrigación del flujo sanguíneo en el tejido, el aporte de nutrientes y de O_2 disminuye, produciéndose la condición denominada *isquemia miocárdica*. El insulto isquémico en el miocardio, mejor conocido como *infarto agudo al miocardio* (IAM), es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, de acuerdo a estadísticas de la organización mundial de la salud (OMS, 2012).

Durante el IAM, la función contráctil se pierde rápidamente desde el inicio de la oclusión coronaria, aumentando la inestabilidad eléctrica que puede llevar a la fibrilación ventricular y a la muerte súbita (Buja, 2013).

Dependiendo de la severidad del daño y de la duración de la isquemia, la muerte del miocardio progresa rápidamente desde la región isquémica extendiéndose del subendocardio al subepicardio, pudiendo alcanzar todo el grosor de la pared ventricular (Burke & Virmani, 2007; Basso *et al.*, 2010).

Durante la isquemia, la ausencia de O_2 inhibe el metabolismo oxidativo y en cambio activa la glucólisis anaerobia. Este cambio metabólico, es acompañado por cambios en la expresión y la actividad de numerosas

proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa, entre las cuales destaca la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), enzima limitante en la vía de las pentosas fosfato. Por otro lado, se sabe también que durante la isquemia existe una acumulación intracelular de lípidos que está ligada a la disfunción cardíaca. La acumulación de lípidos en el corazón es uno de los trastornos metabólicos que perseveran aún después de la isquemia, inclusive en el miocardio circundante a la lesión (Perman *et al.*, 2011; Drevinge *et al.*, 2013).

La única manera de revertir la isquemia por la oclusión coronaria es restableciendo el flujo sanguíneo. A esta condición se le conoce como *reperfusión*. Las terapias de reperfusión utilizadas en la clínica son: terapia trombolítica, cirugía de *bypass* y la intervención coronaria percutánea. Sin embargo, de manera paradójica la reperfusión del tejido isquémico puede causar daño adicional al producido por la isquemia en el miocardio, afectando la función del corazón, a este fenómeno se le ha denominado *daño por reperfusión* (Li *et al.*, 2012).

2.3 Daño por reperfusión. Mecanismos involucrados.

El daño por reperfusión se manifiesta al menos de cuatro formas distintas, dos de las cuales son reversibles y las otras dos irreversibles (Ong *et al.*, 2015; Hausenloy & Yellon, 2013):

- I. Reperfusión con arritmias, eventos que ocurren comúnmente, y que logran estabilizarse en la clínica pues son relativamente fáciles de manejar.
- II. Aturdimiento miocárdico, se refiere a la disfunción contráctil aguda y reversible del miocardio, que se asocia con la pérdida temporal de la función de los cardiomiocitos.

- III. Obstrucción microvascular, está caracterizada por la disminución en la perfusión del miocardio a nivel de la microvasculatura y se manifiesta como no-reflujo coronario en estudios de angiografía.
- IV. Daño por reperfusión letal, se refiere a la muerte de los cardiomiocitos adicional a la que provocó la isquemia; contribuye al tamaño del infarto final del miocardio.

En este trabajo, nos enfocamos en esta última forma de daño por reperfusión miocárdica, la cual representa un blanco terapéutico para el desarrollo de estrategias protectoras.

Los mecanismos que promueven el daño por reperfusión letal, son complejos e involucran una multitud de procesos fisiopatológicos, estos incluyen la acumulación de Ca^{2+} , la sobre-producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la inflamación por la activación de neutrófilos, plaquetas y citocinas. El daño por reperfusión es una entidad clínica relevante, ya que el tamaño del infarto determina la prognosis del paciente. Tras el IAM, aumenta la susceptibilidad a episodios isquémicos recurrentes, a desarrollar falla cardíaca e incluso a la muerte, debido al remodelaje ventricular patológico, a la deficiencia en el aporte de O_2 y al daño en la microvasculatura (Ong *et al.*, 2015). Los microtúbulos juegan un papel importante en la transmisión de fuerzas mecánicas dentro del miocardio y en el mantenimiento de la función de los organelos, sin embargo esta red intracelular se desestabiliza en la reperfusión miocárdica (Rodríguez-Sinovas *et al.*, 2015). La *figura 1* esquematiza los principales procesos involucrados en el daño por reperfusión.

2.3.1 La sobrecarga de calcio intracelular

El *daño por reperfusión* es resultado de la alteración de los procesos bioquímicos en el cardiomiocito durante la isquemia, que ya no son

compatibles con el ambiente oxigenado en la reperfusión del miocardio. El establecimiento del metabolismo anaerobio en la isquemia, resulta en la acumulación de productos metabólicos como el ADP, fosfatos inorgánicos, coenzimas reducidas (NADH y FADH), ácido láctico y H^+ . Los H^+ contribuyen

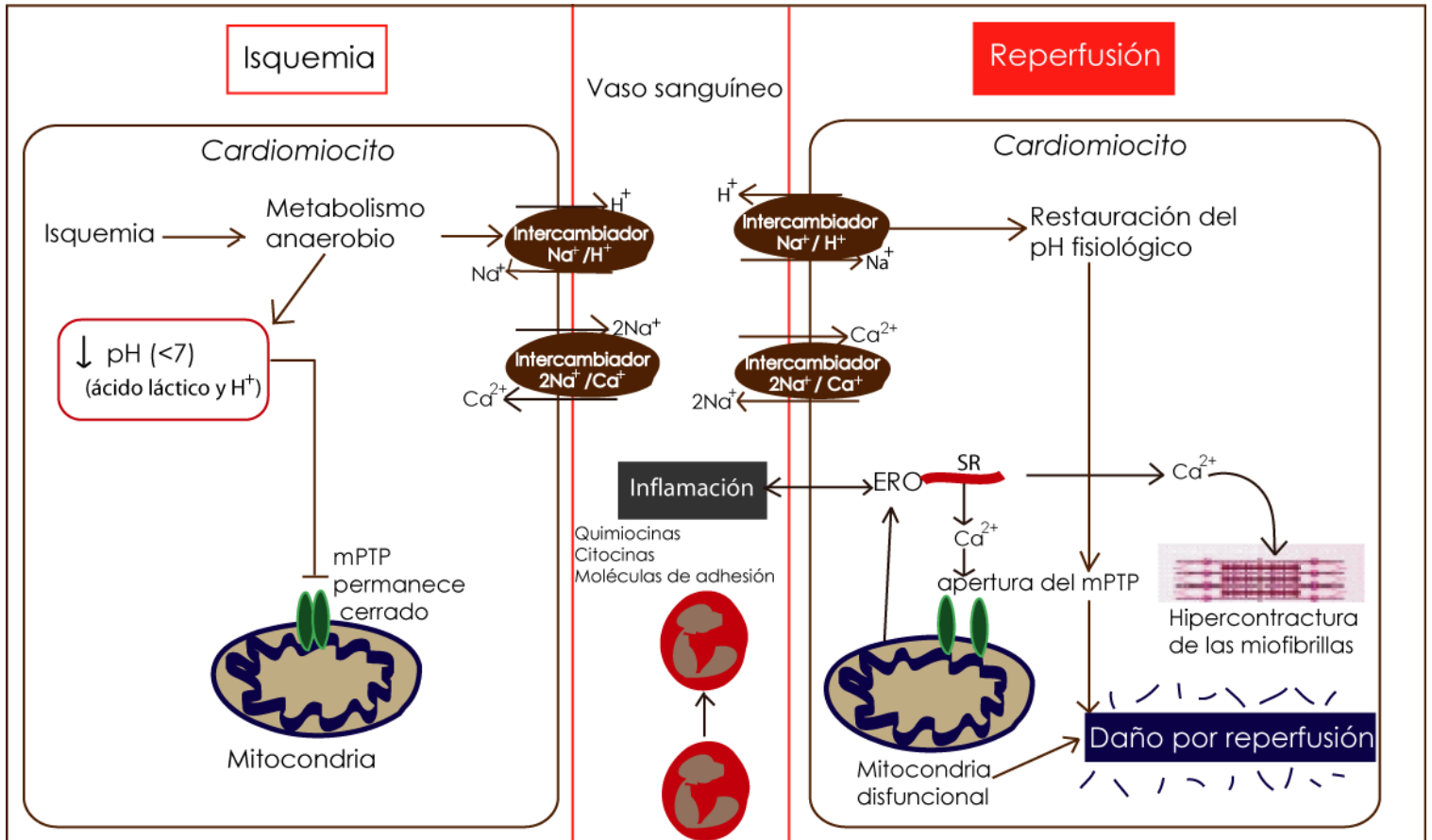


Figura 1. Principales componentes involucrados en el daño por reperfusión.

Durante la isquemia en el infarto agudo al miocardio, la falta de O_2 provoca la activación del metabolismo anaerobio, resultando en la producción de lactato con la consecuente disminución en el pH intracelular. Esto activa al intercambiador Na^+/H^+ , lo que produce un incremento en la $[Na^+]$ intracelular, lo cual activa en forma reversa al intercambiador $2Na^+/Ca^{2+}$, aumentando la $[Ca^{2+}]$. La falta de ATP inhibe la función de la Na^+/K^+ ATPasa, exacerbando la sobrecarga intracelular de Na^+ . Las condiciones ácidas durante la isquemia previenen la apertura del mPTP. En la reperfusión, la cadena de transporte de electrones es reactivada, generando ERO. Otras fuentes de producción de ERO como el sistema xantina oxidasa y la NADPH oxidasa también contribuyen al estrés oxidante. El estrés oxidante generado en la reperfusión contribuye al daño miocárdico, por un lado, induciendo la apertura del mPTP, además de contribuir a la disfunción del retículo sarcoplásmico (SR). Esto contribuye a la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular y al daño de la membrana celular por la peroxidación

de lípidos, lo que lleva eventualmente al daño oxidante de enzimas y el ADN. Durante la reperfusión, se restaura rápidamente el pH extracelular, creando un enorme gradiente de concentración dentro y fuera del cardiomiocito, por lo que se sigue acumulando Na^+ , a través del intercambiador Na^+/H^+ y en consecuencia se acumula más Ca^{2+} . La restauración del pH, libera el efecto inhibitorio sobre el mPTP. La restauración del potencial de la membrana mitocondrial dirige el Ca^{2+} dentro de la mitocondria, lo cual permite la apertura del mPTP. Tras algunas horas después del inicio de la reperfusión, los neutrófilos se acumulan en el miocardio infartado en respuesta a la liberación de ERO y citocinas. ERO: Especies Reactivas de Oxígeno; mPTP: Poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial; SR: retículo sarcoplásmico. Modificado de Hausenloy & Yellon, 2013.

de manera directa en la acidificación del pH intracelular (Li *et al.*, 2012). La disminución del pH promueve la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , lo que genera la acumulación intracelular de Na^+ , ya que éste no puede ser eliminado de la célula a través de la ATPasa de Na^+/K^+ , debido a la falta de ATP. El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimula la activación en la forma reversa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que propicia la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Gateau-Roesch *et al.*, 2006; Mewton *et al.*, 2010). En la isquemia, cuando las concentraciones de ATP son menores al umbral crítico de $100 \mu\text{M}$, se genera entrecruzamiento de las miofibrillas sarcoméricas y su contractura aunque es independiente del Ca^{2+} , marca el comienzo del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol, por el daño de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ y de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), esto representa un evento clave en la progresión del daño isquémico (García-Dorado *et al.*, 2012).

Una vez restablecido el flujo sanguíneo (*reperfusión*), el pH fisiológico se restablece rápidamente y el lactato es eliminado, lo que provoca un gradiente muy grande de concentración de H^+ dentro y fuera del cardiomiocito, por lo que el intercambiador Na^+/H^+ continúa transportando $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que causa la activación secundaria del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la forma reversa, lo que agrava la acumulación de Ca^{2+} . El paso de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria se reactiva ante la presencia de O_2 ,

generándose de nuevo ATP y permitiendo el establecimiento de un potencial transmembranal ($\Delta\psi$) negativo en la mitocondria. El Ca^{2+} se acumula en la matriz mitocondrial a favor del $\Delta\psi$ y en respuesta al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gateu-Roesch *et al.*, 2006). Estudios previos han indicado que la reanudación de la síntesis de ATP en presencia de una alta concentración de Ca^{2+} y su rápida circulación por el retículo sarcoplásmico, genera la hipercontractura en la reperfusión, resultando en una apariencia histológica característica de necrosis en bandas de contracción (García-Dorado *et al.*, 2012).

Por otra parte, la abrupta re-exposición al O_2 durante la reperfusión, estimula la producción masiva de especies parcialmente reducidas del O_2 , mejor conocidas como ERO, que contribuyen, junto con la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, a la disfunción de estos organelos y eventualmente a la muerte de la célula (Gateu-Roesch *et al.*, 2006; Mewton *et al.*, 2010).

2.3.2 La disfunción mitocondrial

Tanto la sobrecarga de Ca^{2+} , el estrés oxidante, la alta concentración de fosfato inorgánico y la depleción de nucleótidos de adenina, contribuyen a la formación de un poro que media la transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (mPTP) (Halestrap & Richardson, 2015). El mPTP es un poro dependiente del voltaje, de alta conductancia, no específico que se forma en la membrana interna mitocondrial (Ong *et al.*, 2015). La formación de mPTP causa que se desacople la fosforilación oxidativa trayendo como consecuencia la depleción de ATP y por lo tanto la muerte de la célula (Hausenloy & Yellon, 2003). En su estado completamente abierto, el diámetro aparente del poro es 2.3 nm, permitiendo la difusión pasiva de solutos con masa molecular de hasta de 1.5 KDa (Di Lisa *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2015). Un importante efecto de la formación del mPTP es el hinchamiento de la matriz mitocondrial y la ruptura de la membrana externa mitocondrial, resultando en

la salida de factores pro-apoptóticos tales como citocromo C del espacio intermembranal hacia el citosol, iniciando la muerte celular por apoptosis (Ong *et al.*, 2015).

2.3.3 *La respuesta inflamatoria.*

El infarto al miocardio desencadena una intensa respuesta inflamatoria que es esencial para la reparación cardiaca, sin embargo también se ha implicado en la patogénesis de la remodelación post-infarto y en falla cardiaca (Frangogiannis, 2014). La respuesta de quimiocinas es un regulador importante de la remodelación cardiaca pues afecta la función sistólica alterando las características geométricas del ventrículo. La dilatación ventricular tras el IAM es un predictor fuerte de mortalidad y de efectos adversos cardiacos, incluyendo el desarrollo de falla cardiaca y arritmias ventriculares (Frangogiannis, 2007).

La señalización en el tejido infartado activa la vía de receptores tipo *toll*, que junto con el estrés oxidante, inducen la sobre-expresión de moléculas pro-inflamatorias (Frangogiannis, 2014) a través de la activación del factor nuclear-*kappa* B (NF- κ B; p65), el cual regula la expresión de las moléculas pro-inflamatorias: quimiocinas, citocinas y moléculas de adhesión (Frangogiannis, 2007; Zhang *et al.*, 2013).

2.3.4 *La disfunción endotelial.*

Durante los primeros minutos de la reperfusión se establece daño en el endotelio vascular, que es el punto de partida para el desarrollo del fenómeno de *no-reflujo*. El fenómeno de *no-reflujo* es sólo una manifestación del daño por reperfusión y corresponde a la disminución o pérdida de perfusión en la microcirculación del flujo coronario. Se han propuesto 4 mecanismos que podrían explicar este fenómeno (Basso *et al.*, 2010):

- *edema intracelular e intersticial*, que produce compresión extravascular de las arterias y arteriolas,
- *daño a las células del músculo liso coronario* con aumento del tono vascular y falta de relajación frente al estímulo con acetilcolina,
- *liberación disminuida de óxido nítrico* que acompaña un aumento del tono vascular y
- *bloqueo capilar* por material tromboembólico.

2.3.5 La producción de ERO y el estrés oxidante.

La sobreproducción de ERO ocurre en los primeros minutos de la reperfusión y está asociada con el daño por estrés oxidante. El metabolismo energético mitocondrial es reconocido como la fuente más importante de ERO. La cadena de transporte de electrones, reduce el 95% de O₂ a H₂O a través de la reducción tetravalente, sin generar ERO. Sin embargo el 5% del O₂ es reducido univalentemente a anión superóxido, que se convierte en otras especies parcialmente reducidas del oxígeno, como el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Kowaltowski *et al.*, 2009). En condiciones fisiológicas, el anión superóxido es dismutado a H₂O₂, por acción de la superóxido dismutasa (SOD). Las células poseen mecanismos para continuar con la reducción del H₂O₂, por lo que éste es tóxico sólo a altas concentraciones. Generalmente es convertido a H₂O por acción de la catalasa y por la glutatión peroxidasa, en la que el glutatión oxidado (GSSG) es nuevamente reducido a través de la glutatión reductasa (Becker, 2004). El anión superóxido está en equilibrio con su forma protonada ·HO₂, la cual prevalece en estados de acidosis, como ocurre en la isquemia. Esto contribuye al daño en las membranas celulares debido a su alta reactividad. Durante la reperfusión, la sobreproducción de las ERO por la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, así como por otras

fuentes enzimáticas como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa, no puede ser regulada eficientemente por el sistema antioxidante endógeno, lo que conduce a un desbalance del estado redox, condición conocida como estrés oxidante (Sies *et al.*, 1991; Grech & Ramsdale, 1996; Arroyo *et al.*, 1987; Bolli *et al.*, 1989). El estrés oxidante severo genera daño al producir peroxidación de lípidos, oxidación de grupos sulfhidrilos, fragmentación del ADN y reducción del sistema antioxidante (Lin *et al.*, 1997; Radi *et al.*, 1991), afectando al cardiomiocito, lo que se ha relacionado con la pérdida de la función contráctil del ventrículo izquierdo (Hori & Nishida, 2009; Andreadou *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha asociado la activación y eventual translocación a la mitocondria de la proteína cinasa C (PKC) isoforma delta, con la sobreproducción del anión superóxido, lo que contribuye también al daño por reperfusión en el miocardio reperfundido (Churchill *et al.*, 2005).

2.3.6 *El sistema antioxidante endógeno*

El sistema antioxidante endógeno tiene la finalidad de mantener el balance redox en la célula. Este sistema incluye a la SOD, la cual cataliza la dismutación del anión superóxido para producir H_2O_2 . La Cu/Zn-SOD está presente en el citoplasma y en el espacio intermembrana en la mitocondria mientras que la Mn-SOD está presente en la matriz mitocondrial (Dhalla, 2000).

La enzima catalasa reduce al H_2O_2 a H_2O , ésta es una enzima unida a la membrana la cual está presente en los peroxisomas, aunque su actividad también se ha observado en la matriz mitocondrial (Steare & Yellon, 1993). Muchas isoformas de las tioredoxinas, reducen proteínas oxidadas a través del intercambio tiol-disulfuro de las cisteínas. Además, las enzimas glutatión peroxidadas catalizan la reducción de los hidroperóxidos de lípidos a alcoholes y reducen también al H_2O_2 en presencia de GSH para formar agua y GSSG. Los niveles de GSH se mantienen mediante la reducción del GSSG, llevada a cabo

por la glutatión reductasa, en una reacción dependiente del NADPH y además por acción de la glutatión sintetasa y la gama-glutamil cisteína sintetasa (γ -GCS), que son responsables de la síntesis *de novo* del GSH (Revisado en Buelna-Chontal & Zazueta, 2013). La glutatión S-transferasa (GST) comprende una gran familia de enzimas que catalizan la detoxificación y metabolismo de compuestos electrofílicos, mediante la conjugación con el GSH (Tebay *et al.*, 2015).

Ante la posibilidad del desarrollo de un proceso patológico subyacente a la isquemia y reperfusión en el miocardio, se requieren opciones terapéuticas cuya finalidad sea la de brindar protección. En este sentido, la evidencia experimental en los últimos años ha demostrado que los primeros minutos de reperfusión representan una ventana de oportunidad para la aplicación de terapias adicionales que combatan el daño generado por el restablecimiento del flujo sanguíneo al miocardio (Tullio *et al.*, 2013), aunque también debe existir una segunda ventana de protección que se mantenga a largo plazo. La figura 2 ilustra las contribuciones del daño provocado por la isquemia y por la reperfusión, además resalta las 2 ventanas de oportunidades para proteger al miocardio del daño por reperfusión.

2.4 Estrategias contra el daño por reperfusión en el miocardio.

Aunque muchos agentes y estrategias cardioprotectoras, dirigidas a prevenir los procesos previamente descritos, han tenido resultados prometedores en estudios experimentales, han fallado al aplicarse en la clínica (Kloner, 2013). Algunos de estos agentes son:

- Eniporide, un inhibidor del intercambiador de Na^+/H^+ (Aldakkak *et al.*, 2008; Avkiran *et al.*, 2008)
- Caldaret, un modulador de Ca^{2+} intracelular (Kawasumi *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2007).

- Antioxidantes, como la SOD (humana recombinante) (Flaherty *et al.*, 1994), alopurinol (Guan *et al.*, 2003) y edaravone (Zheng *et al.*, 2015).
- Delcasertib que es un inhibidor de PKC- δ (Lincoff *et al.*, 2014).

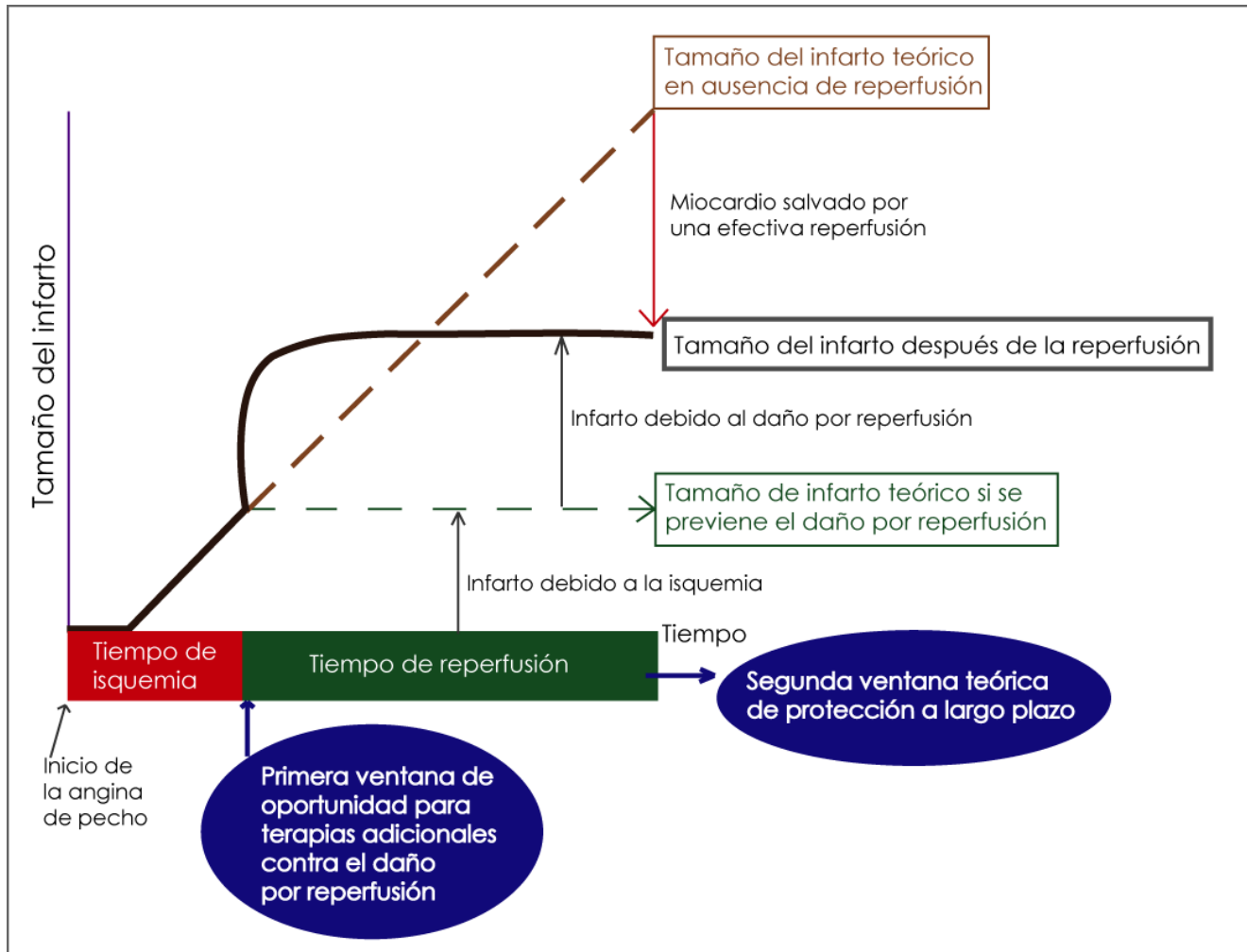


Figura 2. Contribuciones del daño provocado por la isquemia y por la reperfusión en el tamaño del infarto. El esquema ilustra las aportaciones de la isquemia y reperfusión, en el tamaño del infarto final en el miocardio, descritas de manera individual. La línea negra en el gráfico representa las contribuciones al tamaño del infarto final en el miocardio, de la isquemia y la reperfusión. La línea punteada roja indica el tamaño del infarto (total) teórico del miocardio cuando no es sometido a ninguna terapia de reperfusión. La flecha roja indica el tamaño del infarto en el miocardio que es salvado por una efectiva terapia de reperfusión, sin embargo no se previene el incremento en el tamaño del infarto generado por la reperfusión. La línea punteada verde indica el tamaño del infarto teórico, cuando se aplica alguna estrategia que prevenga el daño por reperfusión (así que el tamaño del infarto generado por la isquemia es el que contribuye al tamaño del infarto final). Las flechas azules indican la primera ventana de protección, en los primeros minutos de reperfusión, resaltando que es el momento ideal de aplicar estrategias para prevenir el daño por reperfusión; la segunda ventana de protección

teórica es igualmente importante para mantener la cardioprotección a largo plazo. Figura modificada de Ovize *et al.*, 2010.

Sin embargo, otras estrategias han dado mejores resultados tanto en modelos experimentales como en pacientes. Destacan la terapia de oxígeno sobresaturado (Stone *et al.*, 2009), la ciclosporina un inhibidor del mPTP, (Mewton *et al.*, 2010; Gomez *et al.*, 2009), infusiones intravenosas de adenosina, donadores de óxido nítrico, (Niccoli *et al.*, 2013; Grygier *et al.*, 2011), péptido natriurético atrial, supresores del sistema renina-angiotensina: aldosterona y endotelina-1, (Kitakaze *et al.*, 2007), hipotermia suave inducida antes de la reperfusión (Kloner, 2013) y las estrategias acondicionadoras: Pre-, Per- y Post-acondicionamiento, así como el acondicionamiento remoto (Vinten-Johansen & Shi, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Thuny *et al.*, 2012; Staat *et al.*, 2005).

2.4.1 El acondicionamiento y sus ventajas

Las maniobras acondicionadoras sobresalen entre las estrategias que combaten el daño por reperfusión, por su capacidad de activar mecanismos endógenos del miocardio que evitan el daño por reperfusión. Ya que su efecto no depende de la aplicación de fármacos, no existe el riesgo de efectos secundarios asociados a muchos de estos compuestos.

El Pre-acondicionamiento (PreC), descrito por primera vez en 1986 por Murry y colaboradores, es una maniobra que consiste en aplicar ciclos cortos alternados de oclusión/reperfusión de la arteria coronaria, antes del evento isquémico severo (Murry *et al.*, 1986). Su aplicación es limitada, ya que no es posible predecir el momento exacto de un evento isquémico en pacientes, sin embargo es muy efectiva en cirugía cardíaca (Yellon *et al.*, 1993). Por otro lado, la maniobra de Per-acondicionamiento descrita recientemente, consiste en aplicar eventos cortos de isquemia/reperfusión en la arteria, durante la oclusión coronaria. Esta estrategia es principalmente aplicada de manera

remota, es decir en alguna de las extremidades (Schmidt *et al.*, 2006), lo que representa cierta ventaja sobre el pre-acondicionamiento, además de no ser una estrategia invasiva (*per-acondicionamiento remoto*), sin embargo los mecanismos involucrados aún se desconocen. Zhao y colaboradores, con la esperanza de hacer al acondicionamiento clínicamente relevante, usaron los principios del pre-acondicionamiento y los aplicaron después del evento isquémico severo. En 2003, describieron por primera vez la maniobra llamada Post-acondicionamiento (PostC) y su efecto protector contra el daño por reperfusión, al reducir el tamaño del infarto en un modelo experimental canino. La maniobra consiste en aplicar ciclos cortos de isquemia/reperfusión en la arteria coronaria, antes de la reperfusión prolongada y evidentemente después del evento isquémico severo (Zhao *et al.*, 2003). Fue precisamente la maniobra del PostC la que captó nuestra atención para el desarrollo de este trabajo.

2.5 El post-acondicionamiento, estrategia protectora contra el daño por reperfusión en el miocardio

El PostC isquémico es una maniobra mecánica simple y segura. Dado que el daño por reperfusión es iniciado en los primeros minutos de la restauración del flujo sanguíneo, el PostC debe ser aplicado al inicio de la reperfusión. La maniobra del PostC consiste esencialmente, en modificar la reperfusión en la etapa temprana, mediante la restauración gradual de la reperfusión. Para lo cual se aplican ciclos cortos de reperfusión/re-oclusión de la arteria coronaria, justo después del evento isquémico y antes de la reperfusión prolongada. Esta maniobra activa una respuesta innata de protección miocárdica, reduciendo eficientemente el tamaño del infarto en diversos modelos animales (Skyschally *et al.*, 2009) e incluso en estudios clínicos (Staat *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2012; Lønborg *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2014). También se ha demostrado que disminuye las arritmias características del daño por reperfusión (Iliodromitis *et al.*, 2006; Kloner *et al.*, 2006). Desde que se describió esta estrategia, ha existido

gran interés de la comunidad científica por identificar a los activadores, mediadores y efectores, así como también definir si existen mecanismos que participen en la normalización gradual del pH, en la reducción de las ERO y en la prevención de la hipercontractura.

2.5.1. Mecanismos endógenos de protección que involucra el PostC.

La estimulación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) para adenosina, bradicinina y opiodes (Gross & Gross, 2006; Cohen *et al.*, 2007; Penna *et al.*, 2007), constituye el paso desencadenante en la señalización que activa el PostC. La unión de estos ligandos a los GPCRs, resulta en la transactivación de receptores tirosina-cinasa (Hausenloy & Yellon, 2007), los cuales a su vez activan a las cinasas "*Reperfusion Injury Salvage Kinases*" (RISK) (Yang *et al.*, 2005; Tsang *et al.*, 2004) que incluyen las vías de PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt), MEK/Erk1/2 (Cinasas activadas por mitógenos/ Cinasas activadas por señales extracelulares) (Tsang *et al.*, 2004; Darling *et al.*, 2005; Schwartz & Lagranha, 2006) y la PKC isoforma *épsilon* (PKC ϵ) (Zatta *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2010). Estas vías son las principales mediadoras de la respuesta protectora. También se ha reportado la activación de la vía "*Survivor Activating Factor Enhancement*" (SAFE), aunque se ha demostrado que esta vía no es indispensable para conferir cardioprotección (Lacerda *et al.*, 2009; Lecour, 2009). Estas cinasas promueven la activación de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) y también promueven la activación de otras cinasas, que a su vez actúan sobre blancos moleculares intracelulares. Destaca la regulación del mPTP, que es considerado como efector final de la protección miocárdica durante el PostC y en el que se ha sugerido que convergen múltiples vías de señalización (Vinten-Johansen & Shi, 2011; Pagliaro & Penna, 2011; Gateau-Roesch *et al.*, 2006). La *figura 3* esquematiza a los principales

participantes en el mecanismo de protección activado por el PostC en el miocardio isquémico.

2.5.2 Importancia de la señalización de la vía RISK en el PostC

El término de *quinasas de sobrevivencia al daño por reperfusión*, “RISK” por sus siglas en inglés (*‘Reperfusion Injury Salvaged Kinases’*), se acuñó por Yellon y colaboradores en el año 2002. Estudios previos evidenciaron que la activación de la señalización mediada por Erk1/2 y PI3K/Akt estaba relacionada con la sobrevivencia del miocardio isquémico tras la reperfusión (Gottlieb *et al.*, 1994; Freude *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003). Posteriormente, el grupo de Yellon demostró de forma contundente que la señalización mediada por Erk1/2 previene el daño por reperfusión, al evaluar el efecto del inhibidor de Erk1/2 (PD-98059) en presencia de urocortina (activador de Erk1/2 y miembro de la familia de factores liberadores de corticotropina) en corazones reperfundidos (Schulman *et al.*, 2002). Más tarde, ellos mismos y otros grupos de investigación, expandieron el concepto de la vía RISK. Se ha demostrado que la activación farmacológica de otras quinasas de sobrevivencia, como PI3K/Akt, reduce el tamaño del infarto en un 40 al 50% (Hausenloy *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2003). La activación de las quinasas RISK se relaciona con la acción de una gran variedad de agentes como agonistas de GPCRs, péptidos natriuréticos y estatinas. Estudios posteriores han confirmado el papel de Akt y Erk1/2, en corazones de animales sin patologías, así como con remodelación ventricular post-infarto (Yang *et al.*, 2004; Tsang *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006).

Los miembros originales de esta vía son PI3K/Akt y Erk1/2 (Yellon & Baxter, 1999; Hausenloy & Yellon, 2004); sin embargo, ahora se incluyen otras quinasas de cardioprotección, como la proteína cinasa G (PKG), la proteína cinasa ribosomal p70 s6 (p70s6k), la glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β) (Hausenloy & Yellon, 2007) y la PKC ϵ (Hausenloy & Yellon, 2004).

2.5.2.2 La vía PI3K/Akt

La vía de señalización PI3K/Akt es activada en respuesta a una gran variedad de receptores, incluyendo factores de crecimiento y GPCRs (Cross *et al.*, 2000). La unión de bradicinina a su receptor causa la activación de PI3K, la cual fosforila al fosfatidil-inositol-4,5 bifosfato, para producir fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato, activando vías de señalización que involucran cinasas dependientes de fosfolípidos, los que a su vez activan a Akt (una serina-treonin-cinasa, también llamada PKB), implicada en el crecimiento celular, sobrevivencia y migración celular (Cantley, 2002). Diversos estudios sugieren que la cardioprotección asociada al PostC, es en gran parte debido a la activación de la vía PI3K/Akt en los primeros minutos de la reperfusión (Tsang *et al.*, 2004; Bopassa *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). En los mecanismos activados por el PostC, la vía de PI3K/Akt se ha involucrado directamente con la activación de la eNOS (Tsang *et al.*, 2004). El óxido nítrico puede activar diferentes blancos como PKC, la cual se ha involucrado con la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP (mitoK_{ATP}) en la membrana externa mitocondrial (Quinlan *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que la activación de PI3K puede reducir la entrada de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico y por tanto su liberación al citosol, lo que podría a su vez evitar la apertura del mPTP, previniendo la disfunción mitocondrial durante la reperfusión del miocardio (Abdallah *et al.*, 2006).

2.5.2.3 La vía de la proteína cinasa G

PKG es también un efector río abajo de la cascada de PI3K/Akt (Hausenloy *et al.*, 2011; Ovize *et al.*, 2010). Akt fosforila a la eNOS, que aumenta la síntesis de óxido nítrico y activa a la guanilato ciclasa produciendo GMPc, activando a PKG. PKG tiene como blancos a los mitoK_{ATP} (Oldenburg *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005) y al mPTP, a través de la fosforilación de la GSK3-β (Juhászova *et al.*, 2004). Incluso se ha propuesto que PKG inhibe al intercambiador Na⁺/H⁺,

retardando la normalización del pH intracelular durante la reperfusión en corazones post-acondicionados (Inserte *et al.*, 2011), lo que atenúa las oscilaciones de Ca^{2+} (Abdallah *et al.*, 2006) y reduce la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} (Inserte *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 1994).

2.5.2.4 La Glucógeno-sintasa cinasa-3 β

GSK3- β es constitutivamente activa en las células pues contribuye a muchos procesos celulares importantes, incluyendo el metabolismo del glucógeno, división celular (Lal *et al.*, 2015) e incluso sobrevivencia celular (Juhaszova *et al.*, 2004). En este respecto, puede ser considerado además como un blanco de la vía RISK. Algunos de los reguladores negativos de GSK3- β pueden ser PI3K, PKC, TOR (*target of rapamycin*) y las MAPKs (Gateau-Roesch *et al.*, 2006). Se sabe que Erk1/2, a través de la cinasa p90RSK (proteína cinasa s6 ribosomal de 90KDa), puede fosforilar e inhibir a GSK3- β (Eldar-Finkelman *et al.*, 1995) y en consecuencia inhibir la apertura del mPTP (Juhaszova *et al.*, 2004). Esto último, probablemente a través de la interacción de GSK3- β con la translocasa de nucleótidos de adenina, que es uno de los componentes del mPTP y que se localiza en la membrana interna mitocondrial (Nishihara *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2008). Animales experimentales, que contienen una forma mutada de GSK-3 β , cuya mutación impide que sea fosforilada, mostraron ser resistentes a los efectos benéficos del PostC, en la reducción del tamaño del infarto, sugiriendo que la inactivación de GSK-3 β es requerida para los efectos de protección del PostC (Gomez *et al.*, 2008).

2.5.2.5 La señalización de Erk1/2

El PostC protege el miocardio en gran parte, a través de la activación de la vía MEK1/2-Erk1/2 (Darling *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2004). El mecanismo a través del

cual Erk1/2 es activada en los corazones post-acondicionados en los primeros minutos de la reperfusión, aún se desconoce; sin embargo los posibles responsables de su activación pueden ser la adenosina, PKC o las ERO (Hausenloy & Yellon, 2006). Aunque la activación de esta vía es esencial en la cardioprotección por el PostC, sus blancos aún no han sido completamente dilucidados. Se sabe que el mecanismo de supervivencia celular activado por estas cinasas involucra la habilidad de fosforilación e inactivación de proteínas pro-apoptóticas. Erk1/2 puede fosforilar directamente a la proteína pro-apoptótica BAD (Datta *et al.*, 1997) o indirectamente a través del reclutamiento de la cinasa p90RSK (Harada *et al.*, 2001), resultando en la prevención de la apoptosis (Zha *et al.*, 1996).

Recientemente se ha propuesto, que la vía de Erk1/2 puede incidir directamente en el proteoma de la mitocondria, a través de vesículas asociadas a la membrana mitocondrial, que podrían transportar otras cinasas activas (Hernández-Reséndiz & Zazueta, 2014), inhibiendo la apertura del mPTP y previniendo la disfunción mitocondrial.

2.5.2.6 La vía de PKC

En relación al papel de PKC, los primeros hallazgos demostraron que su inhibición farmacológica abrogó los efectos protectores del PostC, pues evitó la disminución del tamaño del infarto (Penna *et al.*, 2006). Este efecto se ha relacionado con la activación de los mitoK_{ATP} (Penna *et al.*, 2006; Lemoine *et al.*, 2010), aunque en realidad no se conoce el mecanismo exacto. Por otro lado se evidenció que el receptor sensible a calcio (CaR), causa una reducción en el inositol trifosfato, lo que contribuye a un incremento de la liberación de Ca²⁺ intracelular del retículo endoplásmico. Este proceso es regulado negativamente por PKC ϵ en el PostC isquémico al fosforilar la Thr-888 del CaR, contribuyendo a la prevención de la apoptosis en el cardiomiocito y

reduciendo la $[Ca^{2+}]_i$, aliviando también la liberación de $[Ca^{2+}]$ del retículo endoplásmico y la elevación de $[Ca^{2+}]$ mitocondrial (Dong *et al.*, 2010).

Aún quedan muchos aspectos de la actividad de estas cinasas que permanecen sin resolver en el contexto de la cardioprotección, principalmente la identidad de sus blancos moleculares y cómo se regula la compleja interrelación entre las diferentes vías de señalización. Lo que se considera consenso, es que la activación de la vía *RISK*, ya sea la farmacológica o por la aplicación del PostC isquémico, debe ocurrir al inicio de la reperfusión miocárdica, demostrando que hay una ventana de tiempo crítica y limitada para iniciar la respuesta de protección contra el daño por reperfusión (Jonassen *et al.*, 2001; Kin *et al.*, 2004).

En este sentido, la inhibición farmacológica del mPTP una vez iniciada la reperfusión, es totalmente ineficiente (Hausenloy *et al.*, 2003), confirmando que la activación de la señalización cardioprotectora debe ser al comienzo de la reperfusión.

Aunque la activación de las señales que llevan a la protección del miocardio isquémico en la reperfusión, debe ocurrir en los primeros minutos de la reperfusión, en la llamada *primera ventana de protección*, es necesaria una *segunda ventana de protección* que involucre la síntesis *de novo* de proteínas o la inhibición de síntesis de otras, para ayudar al mantenimiento de la cardioprotección a largo plazo. Al respecto, se ha demostrado que el daño por reperfusión involucra la activación, dependiente del estrés oxidante, de NF- κ B (p65) y que la aplicación del PostC inhibe su activación, reduciendo la síntesis de moléculas pro-inflamatorias (Kin *et al.*, 2008). Así, la disminución de la inflamación tras aplicar el PostC, contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular.

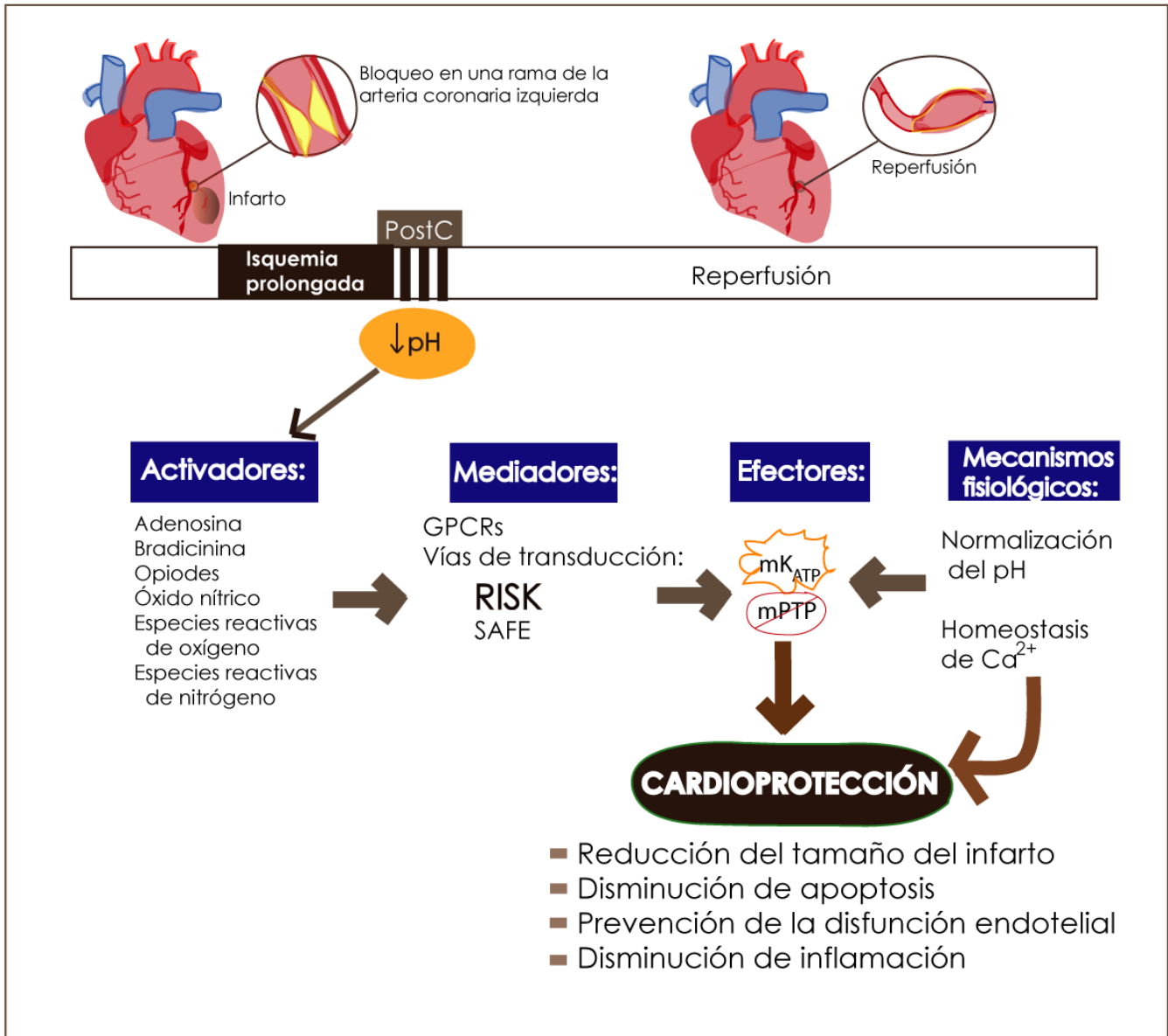


Figura 3. Resumen del mecanismo de cardioprotección desencadenado por el PostC.

La figura ilustra los principales activadores que se han descrito a la fecha, óxido nítrico, opioides, adenosina y bradicinina, los cuales contribuyen a la activación de los mediadores: las vías RISK y SAFE, a través de los GPCRs (receptores acoplados a proteínas G). Como efectores se han descrito: la apertura de los mitoK_{ATP} (canales de potasio sensibles a ATP en la membrana mitocondrial) y la inhibición de la formación del mPTP (poro de la transición de la membrana mitocondrial). Los efectores, dan lugar al restablecimiento de mecanismos fisiológicos como la normalización del pH y la homeostasis del Ca²⁺, contribuyendo a la protección del miocardio isquémico post-acondicionado.

2.6 Nrf2, el regulador maestro del sistema antioxidante

El factor nuclear E2 relacionado al factor 2 (Nrf2), es el factor de transcripción encargado de mantener el equilibrio redox intracelular. Es miembro de la familia *Cap'n'collar*, una subfamilia de factores de transcripción con un cierre ('zipper') de leucinas (bZIP) (Bryan *et al.*, 2013). Es responsable de la expresión constitutiva e inducible de proteínas involucradas en el sistema antioxidante y detoxificante, tales como hemoxigenasa-1 (HO-1) (Chorley *et al.*, 2012; Hirotsu *et al.*, 2012; Ishii *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 1999), NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) (Malhotra *et al.*, 2010; Hirotsu *et al.*, 2012; Thimmulappa *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001b), GST isoenzimas $\alpha 4$, $\mu 2$, $\mu 3$ (Malhotra *et al.*, 2010; Hirotsu *et al.*, 2012; Chanas *et al.*, 2002), $\mu 1$, $\mu 5$, $\alpha 1$, $\alpha 3$, y $\pi 1$ (Thimmulappa *et al.*, 2002; Chanas *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2006), GST microsomal 1 y 2, epóxido hidrolasa (Malhotra *et al.*, 2010; Hirotsu *et al.*, 2012; Thimmulappa *et al.*, 2002), UDP-glucuronosiltransferasa, aldocetoreductasa 1B7 y 1B8, aldehído deshidrogenasa 1A1, 1A7 (Thimmulappa *et al.*, 2002, Leonard *et al.*, 2006), γ -GCS tanto la subunidad reguladora (GCLM) como la subunidad catalítica (GCLC), glutatión reductasa (Chorley *et al.*, 2012; Hirotsu *et al.*, 2012; Thimmulappa *et al.*, 2002), SOD-Cu/Zn (Park & Rho, 2002) y glutatión peroxidasa (Thimmulappa *et al.*, 2002).

Además el Nrf2 regula a múltiples factores de transcripción, tales como el receptor aril-hidrocarbano (AHR), *v-maf músculo-aponeurótico fibrosarcoma oncogen homólogo G* (MAFG), receptor retinoide X alfa (RXRA), *v-myc mielocistomatosis ciral oncogen homólogo* (MYC), CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP) alfa (CEBPA), el factor asociado 2 a YY1 (YAF2) y el potenciador 'hairy' de división 1 (HES1) (Malhotra *et al.*, 2010; Chorley *et al.*, 2012; Hirotsu *et al.*, 2012).

2.6.1 Mecanismo de regulación de Nrf2. Papel de Keap1.

Nrf2 es regulado por su represor citosólico, conocido como: proteína 1 asociada al dominio ECH parecida a Kelch (*Keap1*). *Keap1* está principalmente distribuido en el citoplasma, unido a través del dominio *Kelch/DGR* a los filamentos de actina y/o miosina VIIa en el citoesqueleto (Li & Kong, 2009). *Keap1* en combinación con un componente adaptador del complejo E3 ligasa-ubiquitina basada en *Cul3* (cullin 3), promueve la ubiquitinación y degradación proteosomal en condiciones basales (Eggler *et al.*, 2009; Takaya *et al.*, 2012). *Keap1* actúa como un sensor redox en presencia de ERO, pues al oxidarse en cisteínas reactivas específicas, promueve la liberación de Nrf2, permitiendo su acumulación en el núcleo (Baird & Dinkova-Kostova, 2011). Una vez dentro del núcleo, Nrf2 se heterodimeriza con proteínas Maf pequeñas, MafG, MafF y MafK (una familia de reguladores transcripcionales bZIP bidireccionales) (Baird & Dinkova-Kostova, 2011) favoreciendo su unión a ARE (Elementos de Respuesta Antioxidante).

Por medio de análisis de unión, se ha demostrado que los heterodímeros Nrf2-Maf requieren una secuencia GC (o caja GC) sobre la región 3'-ARE (Hirotzu *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que múltiples reguladores transcripcionales como los co-activadores de la familia p160, CREB-binding protein (CBP)/p300 (Zhu & Fahl, 2001; Sun *et al.*, 2009), co-represores tales como el silenciador mediador de receptores retinoides tiroideos (SMRT) y la desacetilasa de histona (HDAC) 3, pueden interaccionar con el Nrf2 para formar un complejo nuclear (Ki *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). Por otro lado se ha propuesto que la fosforilación de Nrf2 puede inducir su liberación de *Keap1*. Nrf2 puede ser potencialmente fosforilado en múltiples sitios por diferentes cinasas y tal fosforilación parece ser importante en su activación. Aunque este factor de transcripción puede ser hiperfosforilado, la fosforilación en Ser40 parece ser crucial para su disociación de *Keap1* (Huang *et al.*, 2002; Bloom & Jaiswal, 2003). En este sentido, miembros

de la familia MAPKs, tales como Erk1/2, p38 y JNK (c-Jun-N-cinasa terminal) han sido señaladas como cinasas potenciales que promueven la activación de Nrf2 (Zipper *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2012).

Además, algunos estudios indican que la PI3K (Deng *et al.*, 2013; Niture *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2013) y la PKC pueden catalizar la fosforilación de Nrf2 en la serina 40 (Ser40) (Huang *et al.*, 2002; Li & Kong, 2009). También se sabe que algunas proteínas moduladoras son blancos de fosforilación, lo que constituye otro punto de regulación en la expresión de genes mediados por Nrf2 (Bellezza *et al.*, 2010). La *figura 4* esquematiza el mecanismo de regulación de Nrf2.

El estudio de este factor de transcripción ha tomado gran relevancia en diversas patologías, convirtiéndose en un posible candidato para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, un estudio reciente demostró efectos benéficos sobre la disfunción renal crónica y cardíaca a través de la activación de Nrf2. El estudio demuestra que el tratamiento crónico de curcumina en ratas con disfunción renal crónica, puede proteger contra la remodelación patológica cardíaca, al disminuir eventos isquémicos y preservar la función cardíaca. La cardioprotección involucró la disminución en la producción de ERO, así como la prevención del daño por estrés oxidante y el aumento de la respuesta antioxidante endógena, mediante activación de Nrf2 por el antioxidante curcumina (Correa *et al.*, 2013).

2.7 Papel de las ERO como moléculas señalizadoras

Clásicamente las ERO eran considerados únicamente como dañinas, sin embargo sabemos que éstas se forman continuamente en la célula (Halliwell & Gutteridge, 1984) y que el sistema antioxidante endógeno establece un fino balance para mantener el equilibrio redox que permite la homeostasis en la

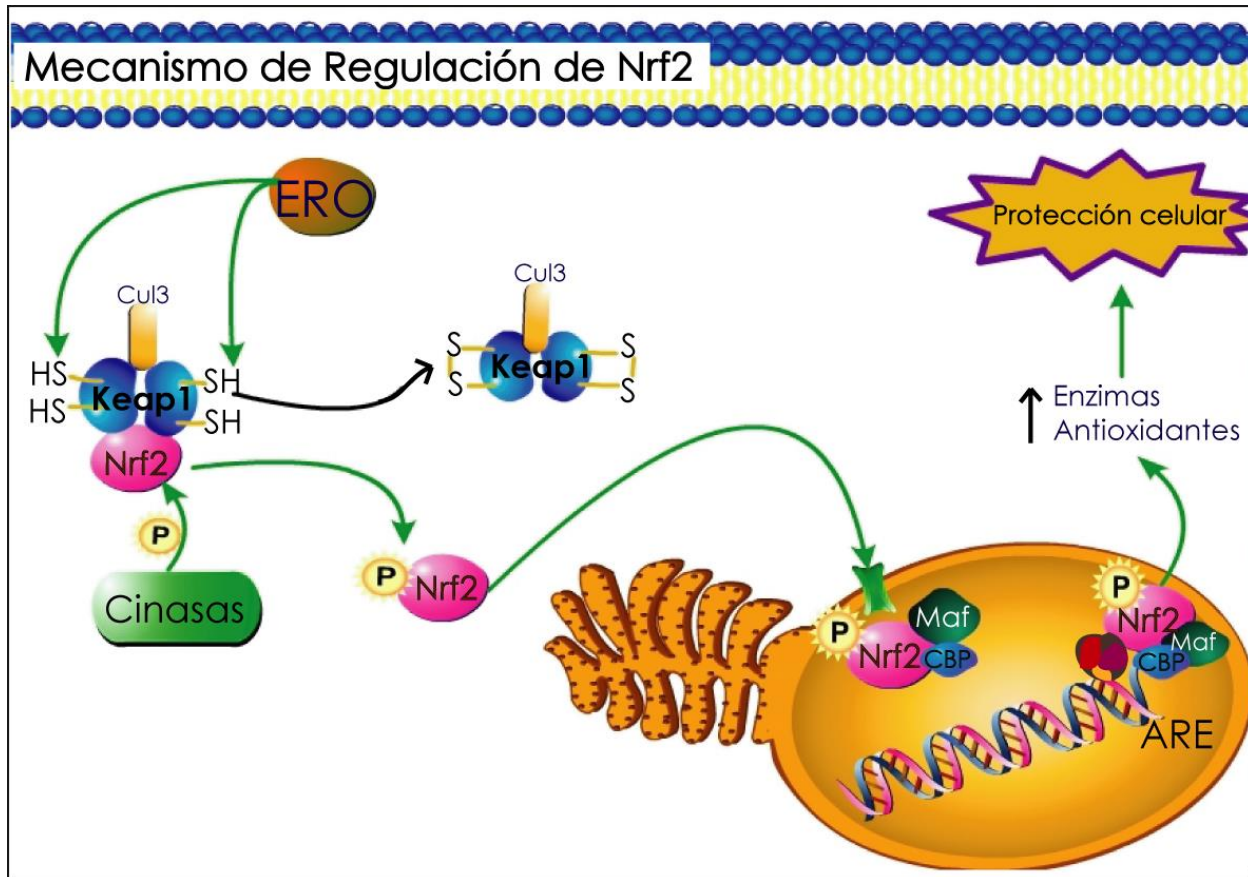


Figura 4. Mecanismo de activación de Nrf2. En condiciones normales, Nrf2 es secuestrado en el citoplasma por su proteína represora Keap1, la cual funciona como un adaptador entre Nrf2 y Cul3 (para la degradación de Nrf2 vía proteosomal). En respuesta al estrés oxidante, Nrf2 se acumula dentro del núcleo interaccionando con proteínas Maf pequeñas y con el co-activador CBP, para su unión a la cromatina en la secuencia ARE, que se encuentra en la región promotora de sus genes blanco. El papel de Nrf2 como regulador maestro del sistema antioxidante ha sido relacionado directamente con efectos protectores en la célula.

célula. Las ERO regulan un gran número de procesos vitales en la célula como el metabolismo energético, respuestas de sobrevivencia/estrés, apoptosis, respuesta inflamatoria, diferenciación y la respuesta inmune, por lo que su papel en la señalización es muy importante (Becker, 2004; Andreadou *et al.*, 2009).

Así pues, el balance del estado redox determina las funciones fisiológicas o deletéreas de las ERO en la célula (Betteridge, 2000). Recientemente, se ha

empezado a estudiar el papel potencial de las ERO como moléculas señalizadoras, sin embargo aún se desconocen los mecanismos a través de los cuales podrían actuar. Respecto a la protección miocárdica sólo existen un par de artículos que sugieren que las ERO participan en la cardioprotección por el PostC. Por un lado, Penna y colaboradores (2006) administraron N-acetilcisteína (NAC) poco antes de aplicar el PostC en un modelo de corazón aislado, lo que eliminó la protección conferida por la maniobra. Cuando administraron NAC una vez aplicado el PostC y empezada la reperfusión, se mantuvo el efecto protector del PostC, sugiriendo que las ERO generadas durante la maniobra son indispensables para que se active la respuesta endógena de protección. En otro estudio, se encontraron hallazgos similares. La utilización de un buffer con una concentración baja de O₂, durante los ciclos de PostC, abatió la protección, evaluada como tamaño del infarto en un modelo de corazón aislado (Cohen *et al.*, 2008). Estos reportes sugieren que la presencia de las ERO en el miocardio durante la maniobra del PostC, es esencial para activar la respuesta de protección, además de que su presencia no altera el balance redox en el corazón.

Aunque los mecanismos de acción de las ERO en la señalización cardioprotectora, aún no se entienden por completo, es posible que se relacionen con la modificación selectiva y reversible de aminoácidos redox-sensibles de diferentes proteínas como cinasas, fosfatasas, canales iónicos y factores de transcripción, afectando así su actividad (Winterbourn & Hampton, 2008).

3. Antecedentes

Está plenamente demostrado que el PostC isquémico protege al miocardio contra el daño por reperfusión, previniendo arritmias, disminuyendo el tamaño del infarto y manteniendo la función cardíaca tras una reperfusión prolongada.

La efectividad del PostC se ha evaluado en el modelo experimental de corazón aislado de perfusión retrógrada *Langendorff* (Goodman *et al.*, 2008; Yong *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2008; Moriguchi *et al.*, 2010; Somers *et al.*, 2011; Arreguín *et al.*, 2012) y en el llamado 'working heart' (du Toit *et al.*, 2008), así como en el modelo *in vivo* (Wagner *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Kolettis *et al.*, 2013; Hernández-Reséndiz & Zazueta, 2014). Además se sabe que las vías PI3K/Akt y Erk1/2, participan, no sólo en el mecanismo de protección de corazones sin antecedente patológico sometidos a isquemia y reperfusión (Tsang *et al.*, 2004; Hausenloy & Yellon, 2006; Hausenloy *et al.*, 2011; Ovize *et al.*, 2010), sino también en modelos con co-morbilidad asociada, aunque en algunos de estos, la incapacidad de activar dichas cinasas provoca la abolición de la cardioprotección del PostC (Wagner *et al.*, 2008; Oosterlinck *et al.*, 2013; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

En relación al estado redox, es importante destacar que aplicando el PostC isquémico, los niveles de GSH se mantienen en la reperfusión, tanto en corazones sin antecedente patológico (Serviddio *et al.*, 2005; Arreguín *et al.*, 2012) como con co-morbilidad asociada, por ejemplo en ratas con infarto apical previo a un segundo insulto isquémico (Correa *et al.*, 2015). En ambas condiciones, los niveles de GSH son comparables a los de un animal sin el insulto isquémico; también se ha documentado el aumento de la actividad de las principales enzimas antioxidantes como resultado del PostC (Penna *et al.*, 2011). Al respecto, aunque se ha reportado la disminución del estrés oxidante a consecuencia de la aplicación del PostC, el papel del factor de transcripción Nrf2 no había sido estudiado, por lo que en este trabajo se planteó medir los posibles cambios en su activación en un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión, para establecer si existe una relación entre la cardioprotección sostenida a largo plazo y el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes reguladas por este factor de transcripción. Ya que la actividad del factor de transcripción Nrf2 puede ser regulada por la acción de cinasas citosólicas *in*

vitro (Bloom & Jaiswal, 2003; Zipper & Mulcahy, 2000; Lee *et al.*, 2001a), también se planteó estudiar si la activación de este factor puede ser inducida por las cinasas activadas por el PostC: PI3K, PKC y/o Erk1/2, las cuales forman parte de la vía de señalización RISK y cuya activación podría ser a su vez sensible al estado redox.

4. Planteamiento del problema

El fundamento de este proyecto fue estudiar si en corazones con PostC, el mantenimiento del balance redox contribuye a que las ERO puedan activar la señalización de cinasas RISK y éstas a su vez puedan inducir la activación de la respuesta antioxidante endógena, mediante la activación del factor de transcripción Nrf2. Planteamos que esta vía es crucial para mantener el balance redox celular durante la reperfusión, protegiendo al miocardio a largo plazo.

5. Hipótesis

Si la activación del factor de transcripción Nrf2 participa en la cardioprotección y depende de la señalización que involucra a las cinasas PKC, PI3K y Erk1/2, entonces la inhibición de una o varias de estas cascadas de señalización, se reflejará en la disminución de la activación transcripcional de Nrf2 y en el estado redox de los corazones PostC. Por otro lado, si la activación de PKC, PI3K y Erk1/2 tras la aplicación del PostC es dependiente del estado redox, al eliminar las ERO durante el PostC, evitará la activación de las cinasas y a su vez de Nrf2.

6. Objetivo General

Evaluar si el factor de transcripción Nrf2 contribuye a la cardioprotección conferida por el PostC, en corazones reperfundidos y si su función es regulada por la activación redox de las cinasas PKC, PI3K o Erk1/2.

6.1 Objetivos particulares

- Determinar si existe un incremento en la activación de Nrf2 en corazones sometidos al PostC.
- Determinar el estado de fosforilación de Nrf2, su eventual acumulación nuclear y su afinidad por ARE.
- Evaluar el estado redox para relacionar la respuesta cardioprotectora a largo plazo, con el posible aumento del sistema antioxidante promovida por la activación de Nrf2.
- Definir la contribución de PKC, PI3K y Erk1/2 en la activación de Nrf2 en corazones post-acondicionados.
- Determinar la participación de la señalización-redox sobre la activación de las cinasas PKC, PI3K y Erk1/2 en los mecanismos de protección miocárdica, asociados al PostC.

7. Metodología

7.1 Protocolo experimental en un modelo *in vivo*

El protocolo experimental se realizó en un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión. Ratas *wistar* machos de 450 g fueron inyectadas con pentobarbital de sodio (1U/100 g *i.p.*) y heparina (1.7 U/Kg *i.p.*). Se evaluó una completa falta de respuesta al dolor determinando el reflejo de retracción pedal. Las ratas

fueron ventiladas artificialmente a través de la inserción de una cánula en la tráquea, conectada a un ventilador para animales pequeños (*Harvard Apparatus 683*). Después se realizó una toracotomía lateral izquierda, para exponer el corazón y localizar la arteria coronaria descendente anterior (LAD), la cual se ocluyó desde su nacimiento con un nudo hecho con hilo de seda para sutura 6-0, después el nudo fue liberado para la reperfusión miocárdica (*Pavón et al., 2012*). La actividad eléctrica fue monitoreada frecuentemente con 3 electrodos conectados, uno en la extremidad inferior izquierda, otro en la extremidad superior derecha y otro en el ápex, mientras que los parámetros hemodinámicos fueron evaluados mediante la introducción de un catéter presión-volumen (*Mikro-Tip; Millar*) dentro de la cavidad del ventrículo izquierdo. La función cardiaca se evaluó con el software *PVAN Ultra*, mediante la generación de una tabla hemodinámica.

Todos los grupos experimentales fueron estabilizados durante 10 min. El grupo de isquemia-reperfusión (IR) fue sometido a 5 minutos de oclusión de la arteria LAD, como se ha descrito previamente por diferentes grupos (*Manning et al., 1984; Hagar et al., 1991; Parra et al., 1991; García-Rivas et al., 2006*). La oclusión de LAD induce una inmediata palidez de la zona isquémica en la pared ventricular. Posteriormente, se liberó la oclusión permitiendo la reperfusión por 10 y 60 minutos (IR₁₀; IR₆₀). La reperfusión se confirmó por el cambio de coloración en la pared ventricular de cianosis a hiperemia y por el comienzo de taquicardias ventriculares. El grupo PostC fue sometido a un restablecimiento intermitente del flujo sanguíneo, a través de 3 ciclos de reperfusión/re-oclusión (10 s cada uno) después de la oclusión de la arteria LAD y antes de 10 o 60 min de reperfusión (IR₁₀+PostC; IR₆₀+PostC). También se realizó un procedimiento de cirugía simulada en animales *sham*, pasando el hilo de sutura alrededor de la arteria LAD al minuto 10 de estabilización, sin realizar la oclusión. Los protocolos de IR, PostC y la administración de inhibidores, son señalados en la *Figura 5*.

7.2 Medición del tamaño del infarto

Al final de los protocolos experimentales, la arteria LAD fue re-ocluida para inyectar 1 mL de una solución de azul de Evans al 5% en el ventrículo izquierdo y así determinar la extensión del área de riesgo (área no coloreada de azul) (Boengler *et al.*, 2010).

Posteriormente, los corazones fueron extraídos y congelados a -20°C durante 30 min, una vez congelados fueron cortados en secciones transversales de aproximadamente 2 mm (6 a 9 rebanadas). Las rebanadas se incubaron en una solución de 2,3,5-cloruro de trifeníl tetrazolio al 1% en amortiguador de fosfatos (pH 7.4) a 37°C por 20 minutos, con agitación constante. Después, las rebanadas fueron preservadas en una solución salina de fosfatos con 0.01 % de azida de sodio, para aumentar el contraste entre el área de no riesgo (azul), área de riesgo (color pálido), área de riesgo viable (color rojo) y el área infartada (blanca) (Ertracht *et al.*, 2014; Buelna-Chontal *et al.*, 2011). Finalmente las rebanadas fueron fotografiadas y el tamaño del infarto se calculó como porcentaje respecto al área de riesgo (AAR) en el ventrículo izquierdo, usando el programa *Image J* (NIH, Bethesda, MD, USA).

7.3 Análisis de activación de las cinasas RISK (Inmunodetección)

Se realizó inmunodetección por *western-blot*, a partir de los homogenados obtenidos de los ventrículos izquierdos. Se analizó el contenido de PKC y PKC ϵ fosforilada (P-PKC, P-PKC ϵ), PKC total, PI3K fosforilada (P-PI3K), PI3K total, Erk1/2 fosforilada (P-Erk1/2) y Erk1/2 total, se empleó como control de carga la proteína total respectiva.

7.4 Inmunoprecipitación de Nrf2 y evaluación de su fosforilación en Ser40, en treoninas y tirosinas.

Los homogenados de ventrículo izquierdo (3 mg) fueron incubados con 4 µg de anticuerpo contra Nrf2 (C-20) en agitación durante 3 h a 4°C. Después se agregó proteína G acoplada a perlas de sefarosa (50 µL del 'slurry') y se incubaron toda la noche en frío. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 30 seg a 4°C. Las perlas de sefarosa fueron lavadas con amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, Igepal 0.5 %, NaF 100 mM, pH 8.0 y nuevamente centrifugadas. El sobrenadante fue descartado y las perlas de sefarosa fueron incubadas en amortiguador con SDS 5X para posteriormente determinar por inmunodetección la fosforilación en Ser40, así como la fosforilación en los aminoácidos treoninas (Thr) y tirosinas (Tyr), de Nrf2. La relación entre la proteína fosforilada y total fue obtenida en la misma membrana en todos los experimentos y después los datos fueron comparados entre los grupos.

7.5 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

Los extractos nucleares fueron obtenidos de acuerdo a las instrucciones del fabricante, usando un kit de extracción nuclear (*Chemicon 2900*). El oligonucleótido biotinilado con la secuencia ARE (GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT) fabricado por *Accesolab S.A. de C.V.* (México D.F.) fue utilizado como ADN blanco. Las reacciones de unión se incubaron 60 min a temperatura ambiente, en presencia de 50 ng/µL de poly (dl · dC), nonidet P-40 al 0.05%, glicerol al 2.5 %, EDTA 10 mM, MgCl₂ 5mM, KCl 0.05 M en el amortiguador de unión 1X, usando 20 fmol del oligo ARE-Biotinilado (ARE-B) y 10 µg del extracto nuclear. El ensayo de competencia fue llevado a cabo incubando un exceso de ARE-no marcado (ARE-U) durante 30 min, antes de la adición del ARE-B. Para identificar a Nrf2 en el complejo formado por

ADN-proteína, se realizó el ensayo de *super-retardo*, incubando 10 µg del extracto nuclear con 2.5 µg del anticuerpo contra Nrf2 toda la noche a 4°C. Posteriormente se adicionó B-ARE, seguida de una incubación de 60 min. Después las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 5%, pre-corrido 60 min en amortiguador Tris-Borato-EDTA 0.5X (TBE). Los complejos fueron separados a 100 V y transferidos a una membrana de nylon cargada positivamente, 30 min a 380 mA en amortiguador TBE 0.5 X. El ADN transferido fue entrecruzado a la membrana con luz U.V. y finalmente fue detectado por quimioluminiscencia usando el conjugado estreptavidina estabilizada-HRP.

7.6 *Análisis de proteínas antioxidantes reguladas por Nrf2*

La determinación del contenido de las proteínas γ -GCS, GST y Cu/Zn-SOD se realizó con anticuerpos específicos, utilizando un sistema de detección quimioluminiscente. Se utilizó como control de carga GAPDH o β -actina. La relación entre la proteína analizada y la proteína de control de carga fue obtenida en la misma membrana en todos los experimentos y posteriormente los datos fueron comparados entre los grupos.

7.7 *Papel de PKC en la activación de Nrf2 por el PostC*

Para evaluar el efecto de PKC sobre la activación de Nrf2, varias concentraciones del inhibidor *queleritrina* (Q), se administraron a las ratas vía *i.v.* a los 5 minutos del período de estabilización. A una dosis de 70 mg/kg de Q, la PKC se inhibió sustancialmente, por lo que esta dosis se utilizó en los experimentos posteriores.

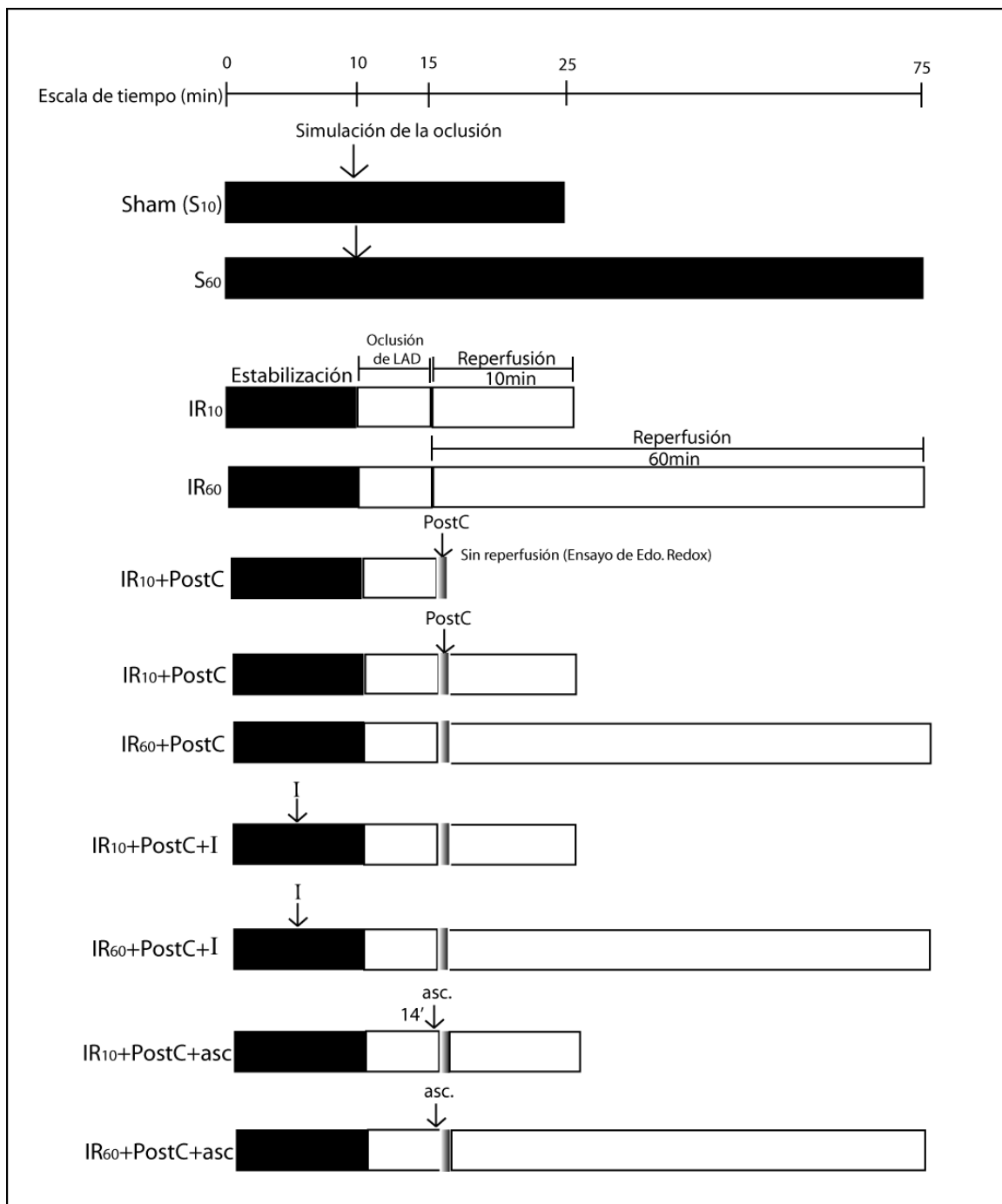


Figura 5. Protocolo experimental. Los grupos experimentales fueron estabilizados durante 10 minutos (barras negras). En los grupos *Sham*, la flecha indica la simulación de la oclusión. La barra blanca, después de la estabilización, indica la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior (LAD) por 5 min, seguida por 10 o 60 min de reperfusion. Los grupos: *IR₁₀+PostC* y *IR₆₀+PostC* fueron sometidos a la maniobra del PostC (3 ciclos de reperfusion/re-occlusion de 10 segundos cada uno). El grupo *PostC*, fue sometido solamente a la isquemia y al PostC, una vez aplicada la maniobra se recolectó el ventrículo izquierdo para la determinación

del estado redox en el miocardio. Los grupos: $IR_{10}+PostC+AA$ y $IR_{60}+PostC+AA$, fueron tratados con ácido ascórbico (AA), inyectado en el ventrículo izquierdo al minuto 3 de la isquemia. Los grupos: $IR_{10}+PostC+I$ e $IR_{60}+PostC+I$ fueron tratados con queleritrina (Q), inhibidor de PKC, a una dosis de 70 mg/kg *i.v.* al minuto 5 de la estabilización o con wortmanina (W), inhibidor de PI3K, a una dosis de 50 nM inyectada en el ventrículo izquierdo durante la estabilización. La flecha indica el momento de la administración del inhibidor (I), ya sea Q o W.

Al final de los experimentos, los corazones fueron rápidamente extraídos, se obtuvieron los ventrículos izquierdos, que inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido para ser almacenados a $-70^{\circ}C$ hasta el ensayo. Posteriormente los ventrículos izquierdos fueron pulverizados con un pistilo pre-enfriado en un mortero pre-enfriado y el tejido pulverizado fue disuelto en un amortiguador de extracción de proteína frío de Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, Igepal 0.5 %, NaF 100 mM, pH 8.0, para los experimentos posteriores.

7.8 *Análisis de la actividad de PKC*

Se obtuvieron homogenados de los ventrículos izquierdos recolectados de acuerdo a los protocolos experimentales. Se analizaron en la mayoría de los experimentos mediante inmunodetección por *western-blot*, evaluando PKC fosforilada y total. También se realizó por medio del kit *Peptag*, un ensayo no radioactivo para la detección de la actividad de PKC (*PROMEGA*) de forma cualitativa y cuantitativa. Se reportaron unidades de actividad de PKC.

7.9 *Ensayo de actividad de la glutatión S-transferasa*

Se preparó la mezcla de reacción con de amortiguador de fosfatos 0.05 M (0.91 ml) pH 6, con 0.02 ml de GSH 0.1 M, 0.05 ml de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0.1 M, y 0.02 ml del homogenado del ventrículo izquierdo correspondiente, de acuerdo al método descrito por Habig y colaboradores

(1974). El incremento en la absorbencia fue medida a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65 (usando el módulo de cinética *Soft-Pac kinetics*). La reacción fue monitoreada durante 3 min y registrada cada 60 s. La actividad de GST se calculó con el coeficiente de extinción molar para el CDNB de $9.6 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ y los resultados fueron expresados como unidades de actividad por mg de proteína (1 unidad de GST conjuga 1 μmol de CDNB con GSH por min a 25°C, pH 6.5).

7.10 Ensayo de actividad de la Cu/Zn-superóxido dismutasa

La actividad de la SOD fue determinada midiendo su capacidad para inhibir la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) por el anión superóxido, generado con el sistema xantina/xantina oxidasa. La mezcla de reacción se preparó con EDTA 0.6 mM, NBT 150 μM , xantina 0.3 mM, albúmina sérica bovina al 0.1 % y carbonato de sodio 400 mM. Los homogenados de ventrículo izquierdo (en una dilución 1:50) más 30 μl de xantina oxidasa (2.5 U/L) fueron agregados a la mezcla de reacción para una posterior incubación a temperatura ambiente por 30 minutos. La reacción fue detenida con 132 μl de cloruro de cobre 0.8 mM. La densidad óptica fue medida a 560 nm. La actividad total de la SOD fue evaluada primero de la manera previamente descrita y posteriormente se desarrolló el ensayo en presencia de cianuro de potasio 50 mM, para inhibir a la Cu/Zn-SOD, así se obtuvo la actividad de Mn-SOD (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000) y se calculó la actividad correspondiente a la Cu/Zn-SOD. Los resultados fueron expresados como unidades de Cu/Zn-SOD por mg de proteína total.

7.11 Determinación de glutatión reducido intracelular.

En una reacción catalizada por la GST, el compuesto monoclorobimano (mCB), forma un aducto estable con el GSH, que puede ser medido

fluorométricamente. La mezcla de reacción contiene amortiguador *Krebs-Henseleit*, pH 7.4, mCB 1mM, GST 1U/mL y el homogenado del ventrículo izquierdo. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, los cambios en la fluorescencia fueron medidos a λ_{ex} 385 nm y λ_{em} 478 nm en un lector de microplacas (*Synergy HT multimode microplate reader*). Las lecturas fueron tomadas cada 15 minutos y los valores obtenidos fueron comparados con una curva estándar de GSH. (García-Niño *et al.*, 2013).

7.12 Papel de PI3K en la activación de Nrf2 por el PostC

Para evaluar el efecto de PI3K sobre la activación de Nrf2, se utilizó wortmanina (W) 50 nM, administrada a las ratas durante el periodo de estabilización (al minuto 5), mediante una inyección directa al ventrículo izquierdo. A esta dosis, la cinasa PI3K fue sustancialmente inhibida en el grupo con PostC. Al final de los experimentos, los corazones fueron rápidamente extraídos, se obtuvo el ventrículo izquierdo y se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido. Posteriormente los ventrículos izquierdos fueron pulverizados con un pistilo y mortero pre-enfriados y fueron disueltos en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, Igepal al 0.5 %, NaF 100 mM, pH 8.0, para los experimentos posteriores.

7.13 Determinación de especies reactivas de oxígeno totales

Se utilizaron homogenados frescos del ventrículo izquierdo, preparados en amortiguador de fosfatos *Dulbecco's* con una mezcla de inhibidores de proteasas y fluoruro de sodio (100 mM). El ensayo se desarrolló incubando los homogenados con 2,7-dicloro-dihidro fluoresceína-diacetato (DCFH-DA) 10 μ M durante 15 minutos en oscuridad y agitación constante a 37°C. Se midió la fluorescencia usando un espectrofluorómetro *Shimadzu RF5000* a λ_{ex} 488 nm y

λ_{em} 530 nm (Rhee *et al.*, 2010). Se reportaron unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) ajustadas por mg de proteína total.

7.14 *Papel de la señalización redox en la activación de las cinasas PKC, PI3K y Erk1/2, en el PostC*

Para definir si el efecto protector del PostC es sensible al estado redox, se incluyó un grupo tratado con el antioxidante ácido ascórbico (asc) como atrapador de las ERO en el PostC (grupos IR₁₀+PostC+asc; IR₆₀+PostC+asc). El asc se aplicó a una dosis 100 mg/Kg, administrada directamente en el ventrículo izquierdo al minuto 4 de la isquemia (antes del PostC) y seguida de 10 y 60 min de reperfusión.

7.15 *Determinación del H₂O₂ en corazones tratados con ácido ascórbico*

Se prepararon homogenados frescos del ventrículo izquierdo, en amortiguador de fosfatos *Dulbecco's* con una mezcla de inhibidores de proteasas y NaF (100 mM). El ensayo se realizó incubando los homogenados con N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina 10 μ M (*Amplex Red*), 0.2 U/ml de HRP en amortiguador *Krebs-Ringer*, durante 60 minutos a 37°C en oscuridad y en agitación constante. Se midió la fluorescencia usando un espectrofluorómetro *Shimadzu RF5000* a λ_{ex} 530 nm y λ_{em} 590 nm (Dikalov *et al.*, 2007). La concentración de H₂O₂ en la muestra se calculó usando estándares de H₂O₂ y se ajustó por mg de proteína total.

8. Análisis estadístico

Los datos representan el promedio \pm S.D. del número indicado de experimento de acuerdo al protocolo experimental. La significancia ($P < 0.05$) fue

determinada por mediciones repetidas usando ANOVA y la prueba *post hoc* *test Bonferroni*, pares seleccionados (*GraphPad Prism* versión 5.00).

9. Resultados

9.1 Efecto cardioprotector del PostC

El análisis de los electrocardiogramas muestra las alteraciones de la función del corazón por la reperfusión y el efecto protector del PostC. Durante los primeros 10 minutos de la reperfusión, la frecuencia cardiaca (HR) incrementa súbitamente, debido a la generación de arritmias en el miocardio (*Figura 6B*), en comparación al ritmo sinusal observado en el *sham* (S_{10}). La generación de arritmias características del daño por reperfusión, presentes desde los primeros minutos de la reperfusión, fueron efectivamente prevenidos por la aplicación del PostC, pues al aplicar la maniobra después de la isquemia se recobra el ritmo sinusal al minuto 7 de la reperfusión (*Figura 6C*). Posteriormente y conforme se prolonga la reperfusión hasta los 60 min, la HR disminuye drásticamente en comparación al grupo sin insulto isquémico, *sham* (*Tabla 1*). Tanto la reperfusión corta (10 min) como la prolongada (60 min), provocaron una disminución significativa de la presión del ventrículo izquierdo (LVP) y de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVDP), junto con una disminución en las tasas de contractilidad (dP/dt_{max}) y un aumento en la relajación (dP/dt_{min}) en comparación al grupo *sham* (S_{10} ; S_{60}) (*Tabla 1*). La disminución en LVP, LVDP y dP/dt_{max} fueron efectivamente prevenidas en los grupos con PostC ($IR_{10}+PostC$ e $IR_{60}+PostC$) después de 10 o 60 min de reperfusión, en comparación a los grupos IR_{10} e IR_{60} ; $P<0.05$ (*Tabla 1*), mientras que el PostC disminuyó significativamente la HR sólo en el grupo IR_{60} y no en el IR_{10} ($IR_{60}+PostC$; $P<0.05$; *Tabla 1*). Por otro lado el PostC previno el cambio en la dP/dt_{min} , sólo tras 10 min de reperfusión ($IR_{10}+PostC$; $P<0.05$). Ninguno de los

grupos experimentales mostró diferencias en los parámetros hemodinámicos evaluados durante la estabilización (*Basal; Tabla 1*).

La cardioprotección conferida por la maniobra del PostC fue evidente también tras la determinación del tamaño del infarto (*Figura 7*). El área de riesgo del ventrículo izquierdo fue similar en los grupos: IR₁₀, IR₆₀, IR₁₀+PostC e IR₆₀+PostC; el tamaño del infarto (relativo al área de riesgo, AAR) fue significativamente menor en el grupo IR₁₀+PostC (19±4%) comparado con el IR₁₀ (63±14%; P<0.05; *Figura 7A*), en el grupo IR₆₀+PostC el tamaño del infarto fue de 18±5% en comparación al 72±16% del grupo IR₆₀ (P<0.05; *Figura 7B*). El PostC logró prevenir el incremento en el tamaño del infarto ocasionado por la reperfusión de manera independiente del tiempo de reperfusión, indicando que las señales de sobrevivencia son activadas durante el PostC en los primeros minutos de la reperfusión y que son mantenidos en la reperfusión prolongada.

9.2 *La activación de las cinasas RISK se relaciona con la fosforilación de Nrf2 en el PostC.*

En los grupos reperfundidos durante 10 minutos se evaluó la activación de las *cinasas de sobrevivencia al daño por reperfusión*, midiendo los niveles de fosforilación correspondientes. En el grupo IR₁₀+PostC se encontró un incremento significativo en la activación de PKC, PKC ϵ , PI3K y Erk1/2, en comparación al grupo IR₁₀ (P<0.05; *Figura 8A*). Al final de 10 min de reperfusión y una vez realizada la inmunoprecipitación de Nrf2 (descrita previamente), se evaluó la fosforilación del factor tanto en Ser40 y como en los aminoácidos treoninas y tirosinas. Se encontró un incremento significativo en el grupo IR₁₀+PostC en comparación al grupo IR₁₀, tanto en Ser40, como en Thr y Tyr (P<0.05; *Figura 8B*), que fue incluso mayor que en el grupo S₁₀.

9.3 La aplicación del PostC aumenta la actividad transcripcional de Nrf2

Para determinar si el aumento en la fosforilación de Nrf2 por el PostC, corresponde a un incremento en su actividad transcripcional, se evaluó su acumulación nuclear, su unión a la secuencia ARE y la expresión de algunas de las enzimas reguladas por este factor después de 60 min de reperusión. Encontramos que la aplicación del PostC (IR₆₀+PostC) incrementa significativamente la acumulación nuclear de Nrf2 respecto al grupo IR₆₀ (P<0.05; *Figura 9A*). En el ensayo de EMSA (*Figura 9B*) se observa en el carril 1, la movilidad electroforética de la secuencia ARE-B. En los siguientes carriles (2-7) podemos observar un retardo en la movilidad electroforética debido a la presencia de proteína nuclear (correspondiente a los grupos experimentales), lo que demuestra la formación de complejo Nrf2/ARE-B. Podemos observar un incremento en la intensidad de la banda correspondiente al grupo IR₆₀+PostC, respecto al grupo IR₆₀ (*Figura 9B*, carriles 6 y 7 vs. 4 y 5, respectivamente) incluso en comparación al grupo S₆₀ (*Figura 9B*, carriles 6 y 7 vs. 2 y 3, respectivamente). Se evaluó el contenido de enzimas antioxidantes GST, Cu/Zn-SOD y a la γ -GCS, cuya expresión es modulada por Nrf2. Se encontró que la aplicación del PostC tras 60 minutos de reperusión (IR₆₀+PostC) incrementó de manera significativa los niveles de GST, Cu/Zn-SOD y γ -GCS en comparación al grupo IR₆₀ (P<0.05; *Figura 9C*).

Tabla 1. Parámetros hemodinámicos. La tabla muestra los parámetros hemodinámicos de corazones post-acondicionados después de 10 y 60 min de reperfusión en comparación a los grupos *sham* e *IR*. **HR**, Frecuencia cardiaca al final de la reperfusión; **LVP**: Presión del ventrículo izquierdo; **LVDP**, Presión desarrollada del ventrículo izquierdo = Presión sistólica – LVEDP; **LVEDP**: Presión final diastólica del ventrículo izquierdo; **dp/dt_{max}**, primera derivada positiva del ventrículo izquierdo (índice de contractilidad); **dp/dt_{min}**: primera derivada negativa del ventrículo izquierdo (índice de relajación). * P<0.05 vs *IR*.

Grupo	Basal						Reperfusión (10 min)					
	HR (BPM)	LVDP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	dp/dt _{max} (mmHg/s)	dp/dt _{min} (mmHg/s)	LVP (mmHg)	HR (BPM)	LVDP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	dp/dt _{max} (mmHg/s)	dp/dt _{min} (mmHg/s)	LVP (mmHg)
S₁₀	329±75	109±52	5.9±5.1	6472±2268	-3886±1016	117±23	350±50	96±43	3.8±2.9	5665±832	-4919±843	107±42
IR₁₀	373±41	100±18	1.47±0.5	6757±1677	-4917±945	106±15	292±67	31±14	4.5±0.9	1067±150	-773±233	42±10
IR₁₀+PostC	351±55	102±20	5.2±2.2	6338±2476	-4842±1881	107±16	320±47	92±17*	7.1±4.4	4482±1930*	-4270±1763*	95±15*
	Basal						Reperfusión (60 min)					
	HR (BPM)	LVDP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	dp/dt _{max} (mmHg/s)	dp/dt _{min} (mmHg/s)	LVP (mmHg)	HR (BPM)	LVDP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	dp/dt _{max} (mmHg/s)	dp/dt _{min} (mmHg/s)	LVP (mmHg)
S₆₀	364±53	103±20	4.1±2.7	6905±2077	-4639±1904	107±23	318±61	113±26	8.1±4.0	6509±3035	-5341±2431	117±25
IR₆₀	322±75	105±17	3.2±1.6	6820±2369	-4413±2766	107±16	48±26	26±3	2.2±1.7	630±309	-2378±3442	33±9
IR₆₀+PostC	349±50	93±10	4.8±2.6	6005±1339	-4043±990	94±4	281±21*	78±12*	4.1±1.9	4191±1063*	-3421±1420	98±19*

Figura 6. La aplicación del PostC previene arritmias características del daño por reperfusión. **(A)** Ritmo sinusal en Sham; **(B)** IR₁₀: Taquicardias en la reperfusión desde el minuto 3 y hasta el final de la reperfusión, se observa que la presión sistémica disminuye notablemente; **(C)** IR₁₀+PostC: las arritmias observadas durante la isquemia, se normalizan desde el minuto 3 de la reperfusión. A este tiempo se observa baja presión que se restablece al minuto 7 de la reperfusión; **HR**: Frecuencia cardiaca; **BP**: Presión sanguínea.

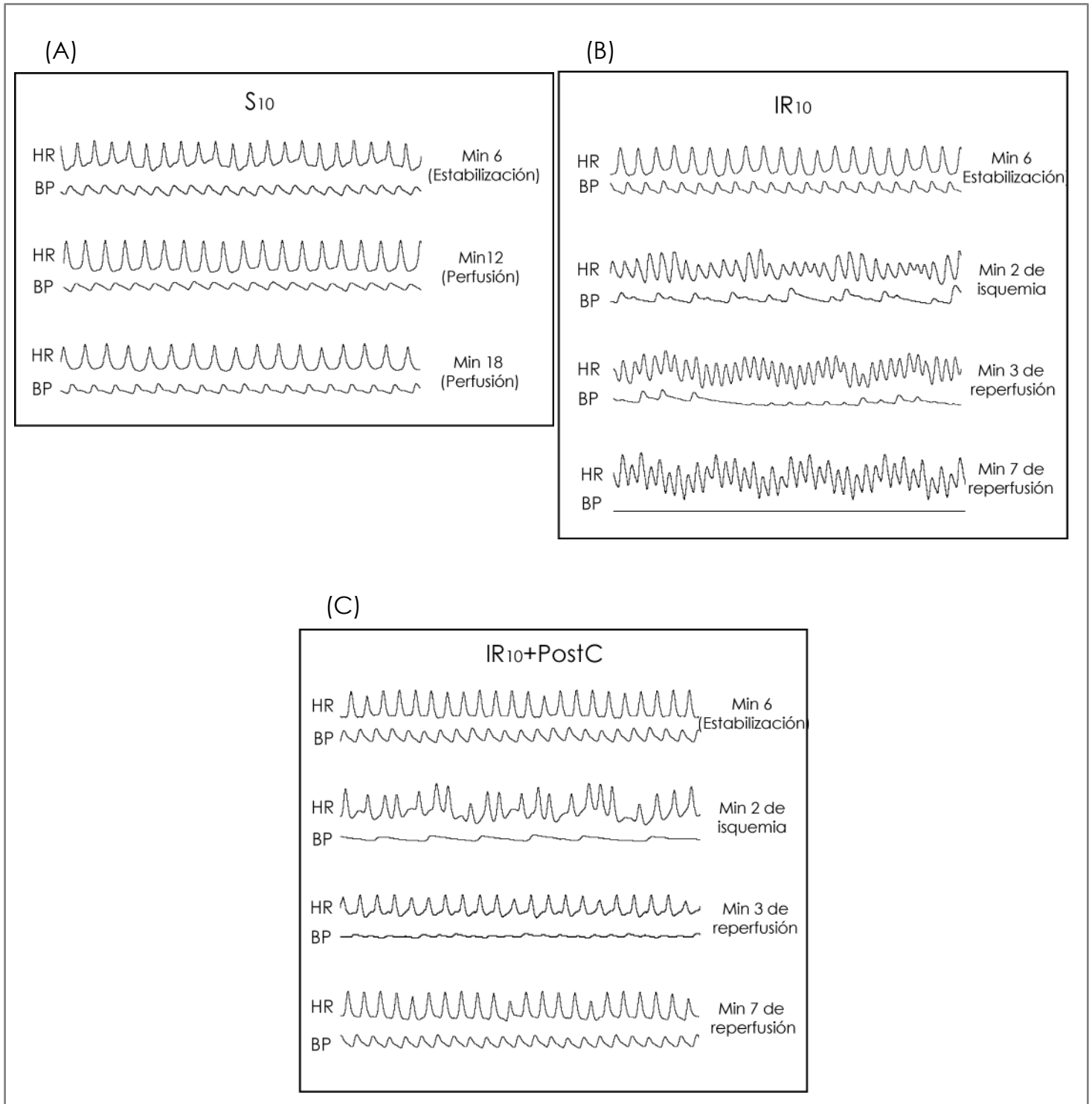
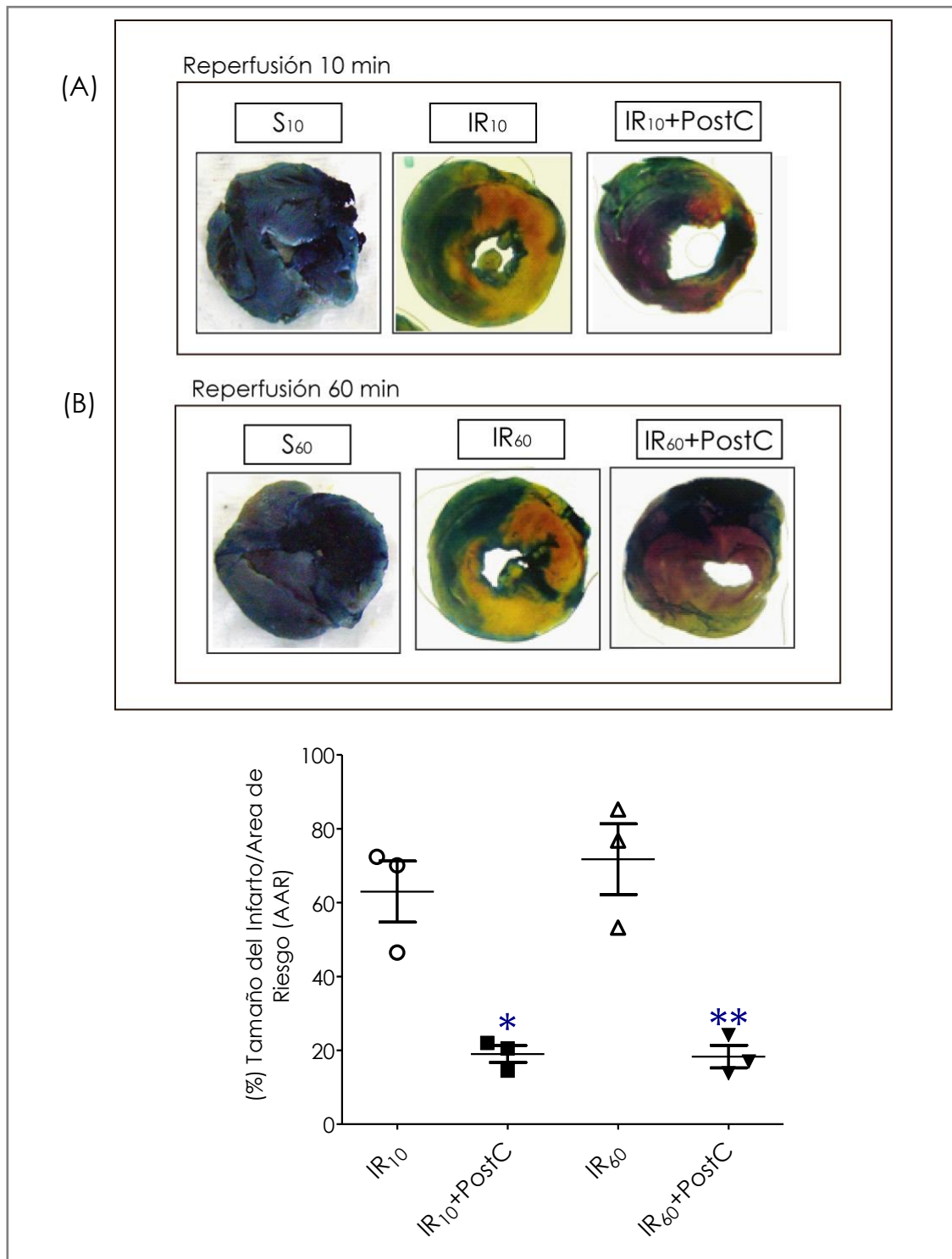


Figura 7. El Post-acondicionamiento disminuye el tamaño del Infarto. Imágenes representativas de rebanadas transversales de corazones sham, IR e IR+PostC, después de 10 (A) y 60 minutos de reperfusión (B). Zona de no riesgo: tinción azul; Zona de riesgo [color rojo-tejido viable y color amarillento-área infartada (no viable)]. (C) El tamaño del infarto fue calculado como porcentaje de área de riesgo del ventrículo izquierdo. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm S.D. * $P < 0.05$ vs. IR_{10} ; ** $P < 0.05$ vs. IR_{60} .



9.4 Papel de PKC en la fosforilación de Nrf2 tras la aplicación del PostC

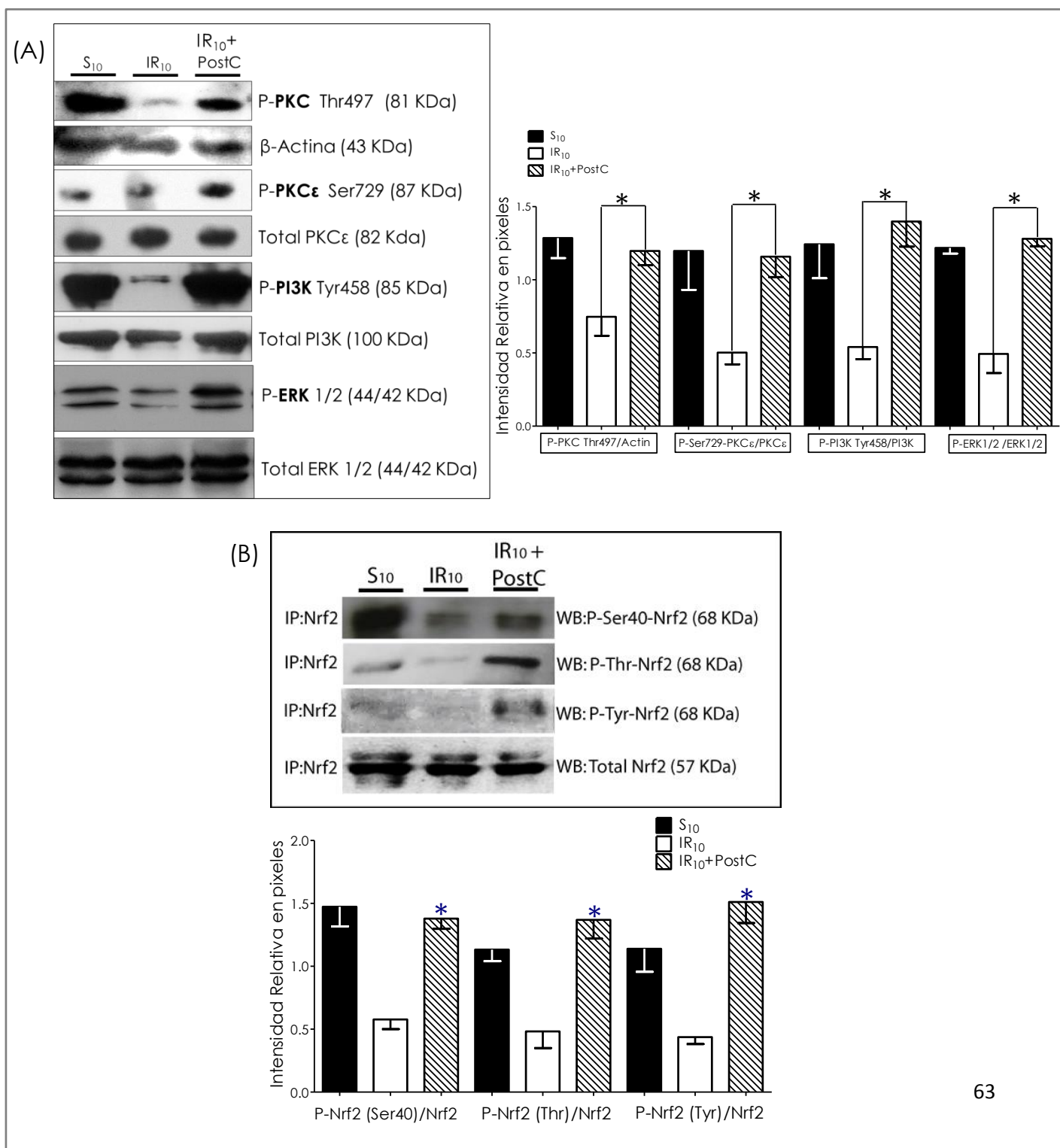
Ya que el incremento en la fosforilación del factor de transcripción Nrf2 ocurre al mismo tiempo que la activación de PKC, PI3K y Erk1/2, se evaluó en primer lugar la posible participación de PKC en la activación del factor de transcripción Nrf2. Realizamos un tratamiento con el inhibidor de PKC (Q: queleritina) a diferentes dosis (15, 34, 70 mg/Kg, i.v.), encontramos que la inhibición de PKC en el PostC, se asocia con una disminución importante en la fosforilación de Nrf2 en Ser40 (evaluada en muestras previamente inmunoprecipitadas) respecto al grupo IR₁₀+PostC (P<0.05; *Figura 10A*).

9.5 Relevancia de la señalización de PKC en la cardioprotección conferida por el PostC

Una vez establecida una relación entre PKC y la fosforilación de Nrf2 en el PostC a los 10 minutos de reperfusión, evaluamos el efecto de la inhibición de PKC sobre la respuesta cardioprotectora. Primero analizamos la función del corazón en presencia de Q, administrada a varias dosis durante el período de estabilización. A la dosis más alta (70 mg/Kg) se observó una disminución significativa de LVP en el grupo (IR₆₀+PostC+Q₇₀; 57±32 mmHg; *Tabla 2*) en comparación al grupo IR₆₀+PostC (98±19 mmHg; P<0.05). Por otro lado, los electrocardiogramas en los corazones con PostC tratados con Q muestran que el ritmo sinusal y la presión sanguínea se recuperan (dependiendo de la concentración de Q), después de una inestabilidad temporal durante los primeros minutos de reperfusión. En la *figura 10B* se observa que la aplicación de Q a una dosis de 34 mg/Kg (IR₁₀+PostC+Q₃₄) no afecta la función eléctrica del corazón en comparación al electrocardiograma del grupo IR₁₀+PostC (*Figura 10A*). Por otro lado, la disminución de arritmias características del daño por reperfusión en el grupo PostC, se pierde tras la administración de Q a una dosis de 70 mg/Kg (IR₁₀+PostC+Q₇₀). Esto sólo ocurre durante los primeros

minutos de la reperfusión (minuto 3 de la reperfusión), sin embargo a los 7 min reperfusión se recupera el ritmo sinusal (Figura 10C).

Figura 8. La activación de las cinasas RISK se relaciona con la fosforilación de Nrf2 en el PostC. (A) La fosforilación de PKC, PKCε, PI3K y Erk1/2 fue determinada al final de 10 min de reperfusión. (B) La fosforilación de Nrf2 se realizó después de 10 min de reperfusión y tras el proceso de inmunoprecipitación (IP) fue evaluada la fosforilación en Ser40, Thr's y Tyr's mediante western blot (WB). *P<0.05 vs. IR₁₀; n ≥ 4 experimentos independientes.



9.6 *La inhibición de PKC afecta la activación del factor de transcripción Nrf2 en el PostC*

Con la finalidad de establecer una conexión más sólida entre PKC y Nrf2, evaluamos si la inhibición de PKC afecta no sólo la fosforilación de Nrf2 sino su actividad transcripcional (evaluada tras 60 min de reperfusión). Así que determinamos la acumulación nuclear de Nrf2 en presencia de Q (70 mg/Kg) y encontramos que la inhibición de PKC disminuye drásticamente la acumulación nuclear de Nrf2 en el grupo IR₆₀+PostC+Q en comparación al grupo sin inhibidor (IR₆₀+PostC) (P<0.05; *Figura 11B*). Además evaluamos mediante el EMSA la capacidad de unión de Nrf2 por la secuencia ARE. Podemos observar en la *figura 11C* que la intensidad de la banda de retardo (correspondiente al complejo formado Nrf2/ARE) del grupo IR₆₀+PostC (carril 4; *Figura 11C*) disminuye en presencia de Q (IR₆₀+PostC+Q; carril 5; *Figura 11C*). En el carril 6 (C) se muestra la disminución en la intensidad del complejo Nrf2/ARE-B tras incubarlo con un exceso de la secuencia ARE no marcada con biotina, lo que nos ayudó a validar la especificidad del ensayo. Además el carril 7 (SS) demuestra que el retardo encontrado en presencia de los extractos nucleares, es debido a la unión de Nrf2 con ARE-B, pues la reacción fue incubada en presencia del anticuerpo contra Nrf2 (C-20), lo que provoca un super-retardo en la movilidad electroforética. Estos resultados sugieren que la inhibición de PKC en el PostC afecta la activación de Nrf2 y compromete el desempeño del corazón en la reperfusión, lo que permite establecer una probable relación entre ambas proteínas y proponer a Nrf2 como posible blanco de PKC en el PostC.

9.7 *La vía PKC/Nrf2 en el PostC, es importante en el mantenimiento del sistema antioxidante durante la reperfusión*

Una vez establecida la relación entre PKC y Nrf2, evaluamos el efecto de la inhibición de esta posible vía, en la expresión de 3 enzimas antioxidantes que

Figura 9. El PostC activa al factor de transcripción Nrf2 e incrementa la expresión de enzimas antioxidantes. **(A)** La acumulación nuclear de Nrf2 se evaluó después de 60 minutos de reperusión en los extractos nucleares y se usó *histona H1.0* como control de carga. * $P < 0.05$ vs. IR_{60} , $n \geq 4$ experimentos independientes. **(B)** Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA), en el que la afinidad de Nrf2 por su secuencia ARE se evaluó en los grupos reperfundidos durante 60 min; B-ARE: Secuencia ARE-biotinilada. El primer carril muestra la migración del B-ARE libre en un gel de poliacrilamida no-desnaturalizante, los siguientes carriles muestran el retardo del complejo formado Nrf2/B-ARE en los grupos experimentales correspondientes. La imagen es representativa de 5 ensayos EMSA. **(C)** Se muestra el contenido de 3 enzimas reguladas por Nrf2: GST, Cu/Zn-SOD, γ -GCS, evaluadas en los grupos reperfundidos por 60 min por WB en homogenados de ventrículo izquierdo; GAPDH fue usada como control de carga. * $P < 0.05$ vs. IR_{10} ; $n \geq 4$ experimentos independientes.

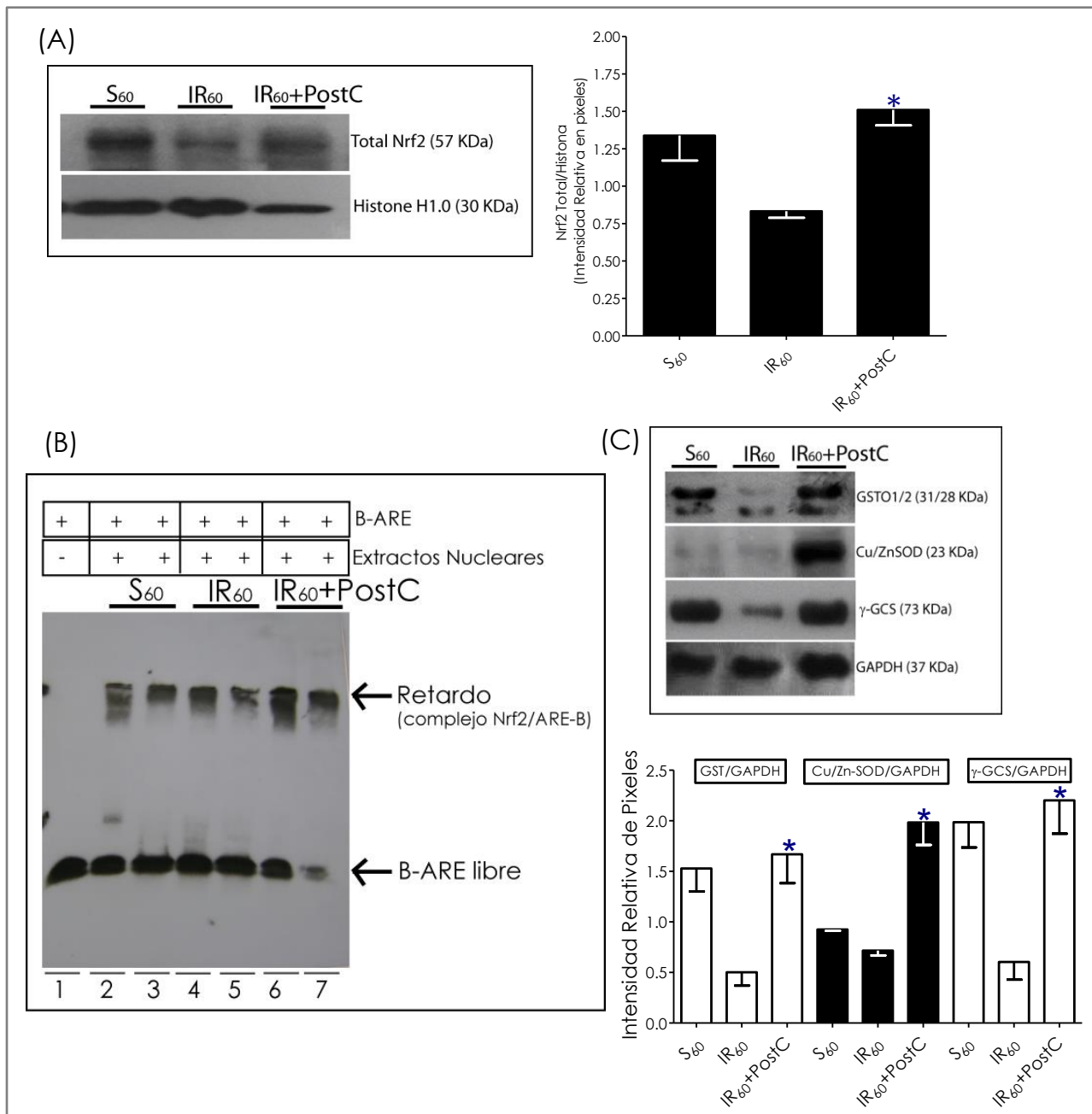
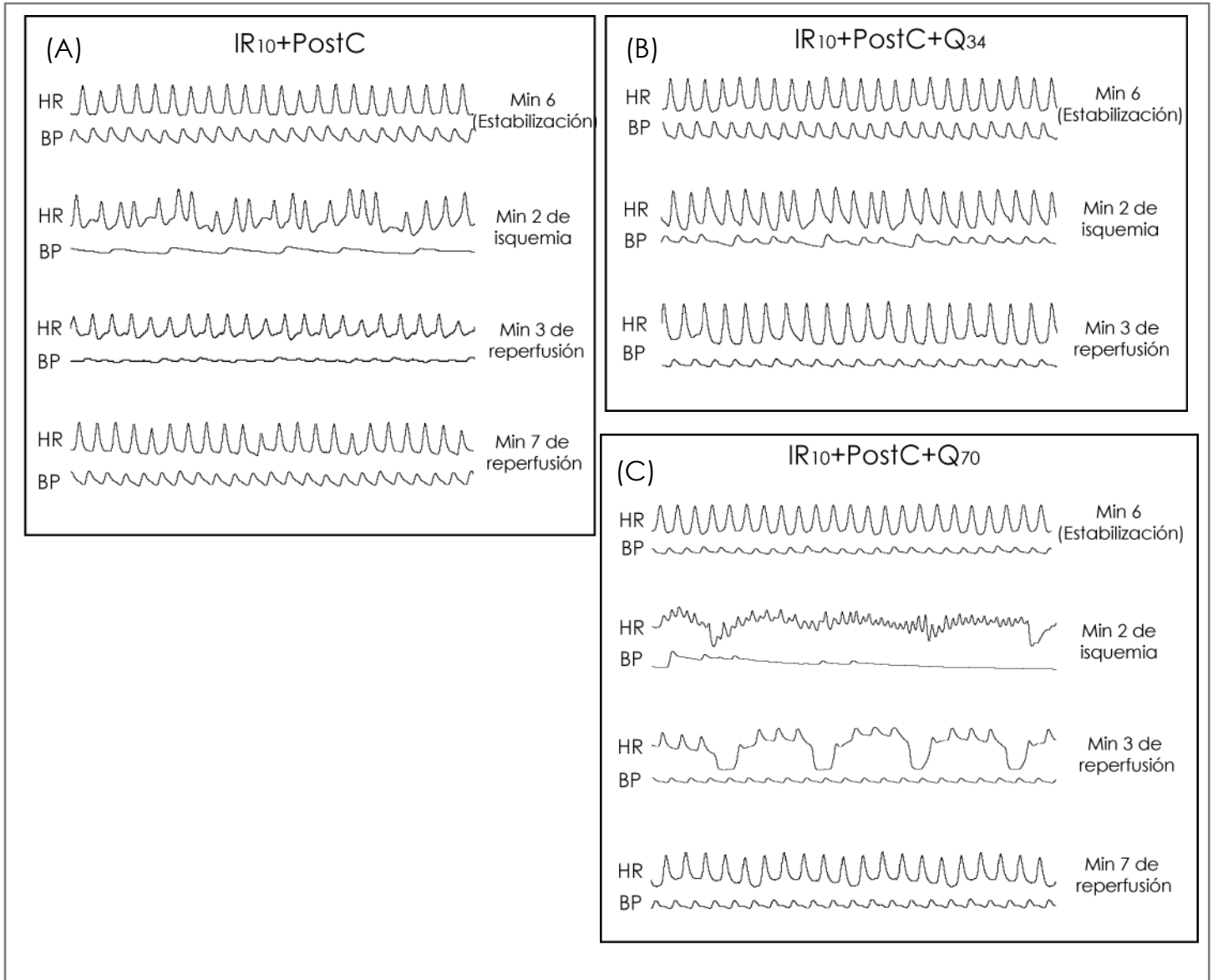


Tabla 2. Efecto de la inhibición de PKC sobre la función del corazón PostC. Tabla de parámetros hemodinámicos. La tabla muestra los parámetros hemodinámicos de corazones IR+PostC+Q después de 10 o 60 min de reperfusión en comparación al IR+PostC. **HR**, Frecuencia Cardíaca al final de la reperfusión; **LVP**: Presión del ventrículo izquierdo; **LVDP**, Presión desarrollada del ventrículo izquierdo = Presión sistólica – LVEDP; **LVEDP**: Presión final diastólica del ventrículo izquierdo; **dp/dt_{max}**, primera derivada positiva del ventrículo izquierdo (índice de contractilidad); **dp/dt_{min}**: primera derivada negativa del ventrículo izquierdo (índice de relajación). Q₃₄: queleritrina 34 µg/Kg; Q₇₀: queleritrina 70 µg/Kg. *P<0.05 vs. IR; **P<0.05 vs. IR₆₀+PostC.

Grupo	Basal			10 min Reperfusion (IR ₁₀)			60 min Reperfusion (IR ₆₀)		
	HR (BPM)	LVP (mmHg)	LVDP (mmHg)	HR (BPM)	LVP (mmHg)	LVDP (mmHg)	HR (BPM)	LVP (mmHg)	LVDP (mmHg)
Sham	364±53	107±23	103±20	350±50	107±42	96±43	318±61	117±25	113±26
IR	373±41	106±15	100±18	292±67	42±10	31±14	48±26	33±9	26±3
IR+PostC	351±55	107±16	102±20	320±47	95±15*	92±17*	281±21*	98±19*	78±12*
IR+PostC+Q ₃₄	375±50	102±11	114±21	321±90	80±12*	87±16*	283±94*	69±12*	81±18*
IR+PostC+Q ₇₀	334±19	96±3	91±11	280±26	76±39	85±30*	272±34*	57±32**	62±32*

Figura 10. La inhibición de PKC en el PostC, altera la función eléctrica del corazón tras la reperfusión. Imágenes de electrocardiogramas muestran el efecto de la inhibición de la vía de PKC en los corazones con PostC. Q₃₄: queleritrina 34mg/Kg; Q₇₀: queleritrina 70mg/Kg.



son reguladas a nivel transcripcional por Nrf2. La figura 12A muestra la disminución significativa del contenido de proteína de GST, Cu/Zn-SOD y γ -GCS por efecto de la inhibición de PKC/Nrf2 en el PostC (IR₆₀+PostC+Q) en comparación con el grupo IR₆₀+PostC ($P < 0.05$). También medimos la actividad de cada una de estas enzimas. Encontramos que la disminución del nivel de proteína, correlaciona con una disminución importante en su actividad. La

actividad de GST disminuye dramáticamente en comparación al grupo IR₆₀+PostC (Figura 12B; P<0.05) prácticamente a los niveles basales del grupo sham (S₆₀). La actividad de la Cu/Zn-SOD también se vio disminuida en el grupo IR₆₀+PostC+Q en comparación al IR₆₀+PostC (Figura 12C; P<0.05) y de igual manera la GST disminuye a los niveles basales del S₆₀. En el caso de la γ -GCS (la enzima limitante en la síntesis de GSH) evaluamos indirectamente su actividad al cuantificar el GSH intracelular, que es el principal antioxidante de bajo peso molecular en la célula. La actividad de esta enzima fue significativamente menor en IR₆₀+PostC+Q que en el grupo IR₆₀+PostC (Figura 12C; P<0.05). Estos resultados indican que PKC activa la señalización de Nrf2 en el PostC, manteniendo un incremento de la maquinaria antioxidante previniendo así del daño por reperfusión.

9.8 Efecto de la inhibición de PI3K sobre la función del corazón en el PostC.

A continuación, analizamos la relación entre la activación de PI3K por el PostC (Figura 8A) con la posible activación del factor Nrf2, para lo cual realizamos el tratamiento con W, inhibidor de PI3K. La inhibición de PI3K en el PostC afectó la recuperación de la LVP durante la reperfusión (IR₆₀+PostC+W) en comparación con el grupo IR₆₀+PostC (Figura 13A; P<0.05). La HR no se alteró por la inhibición de PI3K en el grupo IR₆₀+PostC+W en relación al IR₆₀+PostC (Figura 13B).

9.9 La inhibición de PI3K en el PostC no disminuyó la activación del factor Nrf2

A pesar de que los resultados obtenidos indican que la activación de PI3K por el PostC es importante en la cardioprotección contra el daño por reperfusión, la inhibición de PI3K con W, no disminuyó significativamente la fosforilación de Nrf2 ni en Ser40 ni en Thr (IR₁₀+PostC+W) respecto al IR₁₀+PostC (Figura 14A). Aunque esperabamos que la actividad transcripcional de Nrf2 se mantuviera o

Figura 11. Papel de PKC en la fosforilación y activación de Nrf2 en el PostC. (A) La inhibición de PKC afecta la fosforilación de Nrf2 en Ser40 determinada por WB, previa inmunoprecipitación (IP). Las imágenes representan al menos 3 experimentos independientes (Q = queleritina; 15, 34 y 70 mg/Kg); $P < 0.05$ vs. IR₁₀+PostC. (B) La inhibición de PKC disminuye la acumulación nuclear de Nrf2; se muestra el contenido de Nrf2 (WB) en los extractos nucleares después de 60 min de reperusión, se usó histona H1.0 como control de carga. Los resultados son de al menos 4 experimentos independientes. # $P < 0.05$ vs. IR₆₀; ** $P < 0.05$ vs. IR₆₀+PostC. (C) La afinidad de Nrf2 por su secuencia ARE disminuye por efecto de la inhibición de PKC. El primer carril muestra únicamente la migración del B-ARE libre, los carriles siguientes (2-5) muestran el retardo de los grupos experimentales. El carril 6 (C) muestra el ensayo de competencia, desarrollado en presencia de U-ARE (ARE-no marcado). Finalmente el carril 7 (SS) muestra el ensayo de super-retardo (SS), el cual fue incubado en presencia del anticuerpo contra Nrf2 (Anti-Nrf2) seguido de la adición de B-ARE. La imagen de EMSA es representativa de al menos 6 experimentos diferentes.

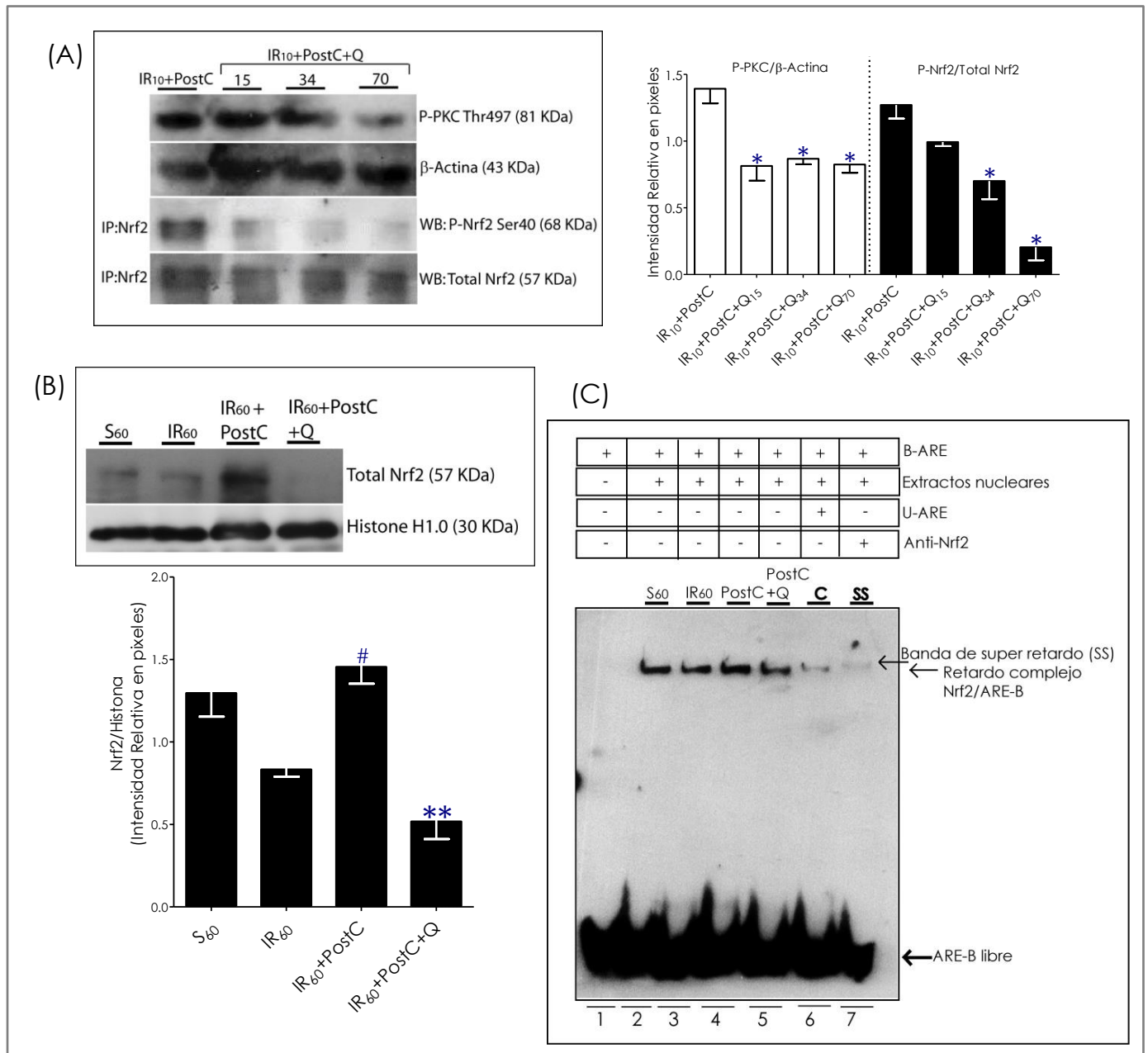
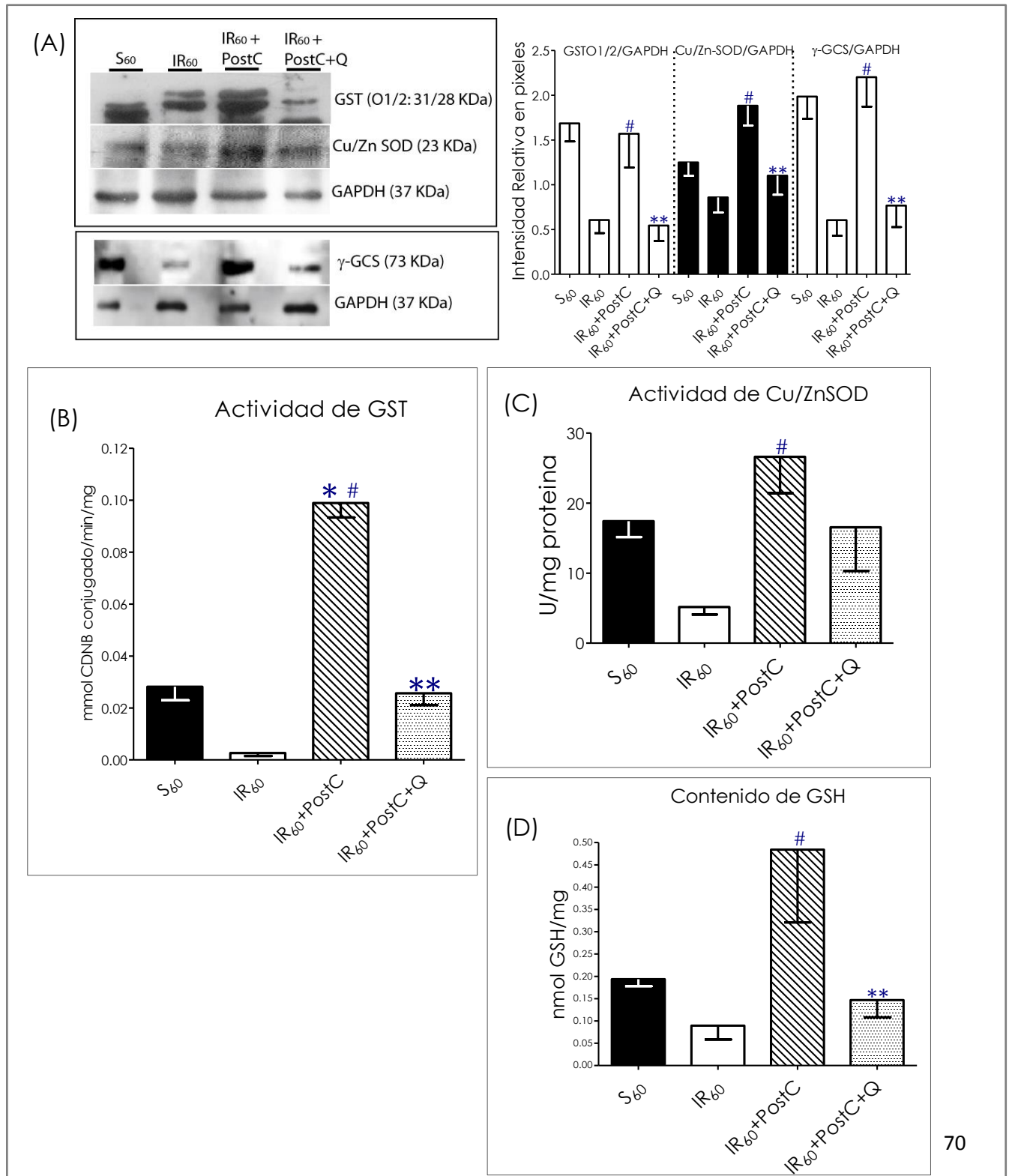


Figura 12. La vía PKC/Nrf2 en el PostC, es importante en el mantenimiento del sistema antioxidante durante la reperfusión. (A) Disminución del contenido de GST, Cu/Zn SOD y γ -GCS, en corazones sujetos a 60 minutos de reperfusión. Q = queleritrina 70 mg/Kg; #P<0.05 vs. IR₆₀; **P<0.05 vs. IR₆₀+PostC. Los datos representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes (B) Actividad de GST. (C) Actividad de Cu/Zn-SOD y (D) Contenido de GSH en IR₆₀+PostC+Q. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm SEM. *P<0.05 vs. S₆₀; #P<0.05 vs. IR₆₀; **P<0.05 vs. IR₆₀+PostC.



disminuyera discretamente, encontramos un incremento en la capacidad de unión del Nrf2 por la secuencia ARE (*Figura 14B*). La intensidad de la banda correspondiente al retardo por el complejo Nrf2/ARE formado (IR₆₀+PostC+W) es mayor a la del grupo IR₆₀+PostC, lo que sugiere que la inhibición de PI3K activa una respuesta compensatoria de otras cinasas que podrían incrementar o mantener la actividad del factor de transcripción Nrf2 durante el PostC.

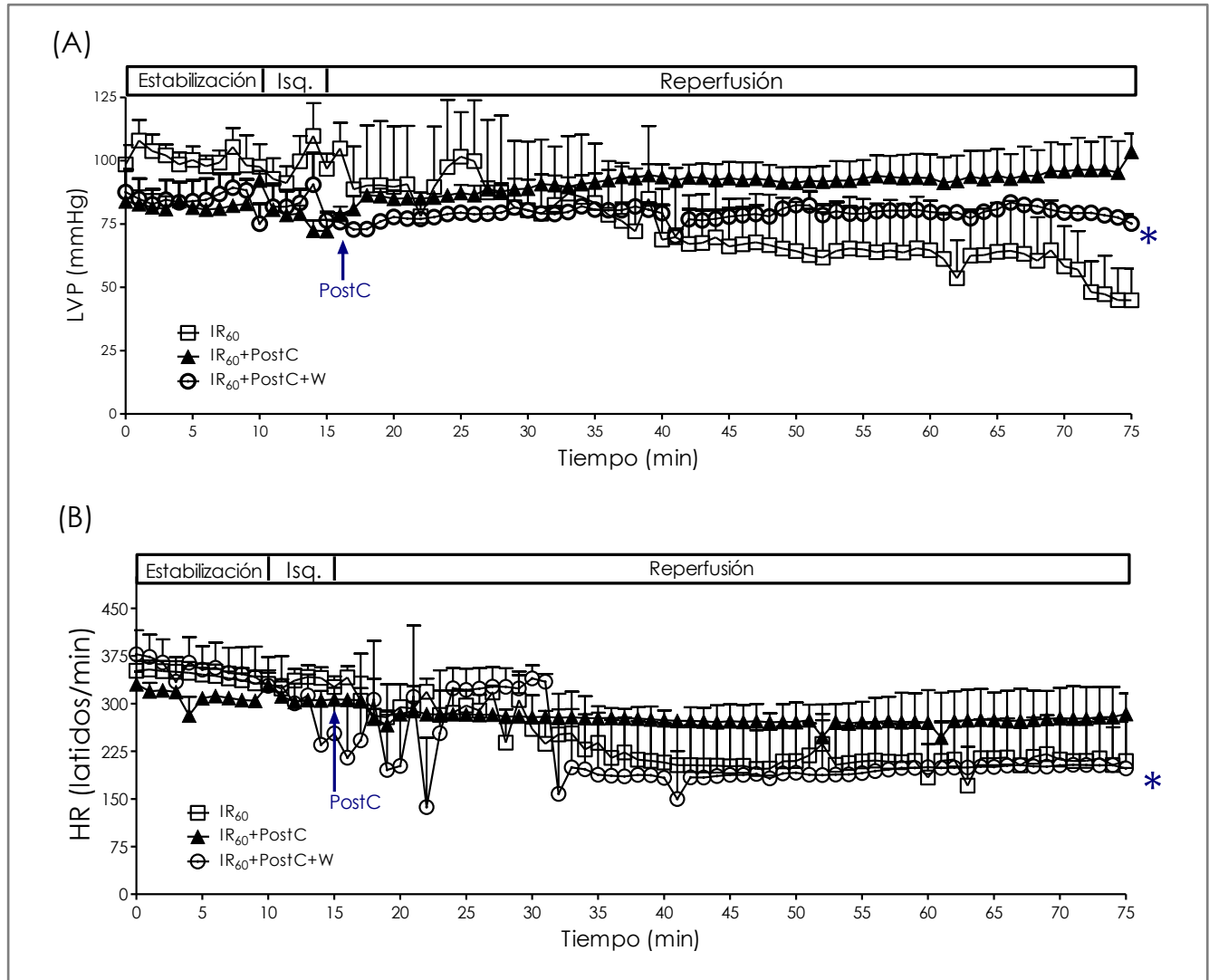
9.10 La inhibición de PI3K causa un incremento en la actividad de PKC en el PostC

Para poder dilucidar si la inhibición de PI3K, se refleja en cambios en la actividad de PKC, evaluamos la actividad de esta cinasa en el grupo (IR₁₀+PostC+W). Encontramos que el tratamiento con W, incrementa la actividad de PKC en comparación al IR₁₀+PostC (*Figura 15*; $P<0.05$). Al parecer el incremento en la activación de Nrf2 se relaciona con el aumento en la activación de PKC, probablemente como parte de un mecanismo compensatorio de las cinasas activadoras durante el PostC, aunque no descartamos la participación de otras moléculas que puedan tener como blanco a Nrf2 en estas condiciones.

9.11 El PostC mantiene a largo plazo el estado redox en el miocardio reperfundido

También evaluamos cómo se mantiene el estado redox en los diferentes grupos experimentales, con la finalidad de establecer la importancia de las ERO como probables activadores de la respuesta endógena de protección en corazones con PostC. Encontramos que la aplicación del PostC previene el incremento del estado oxidante en el grupo IR₁₀+PostC y PostC (grupo PostC *sin reperfusión*) comparado al grupo IR₁₀. Como se muestra en la *figura 16* ($P<0.05$), los niveles de ERO en los grupos IR₁₀+PostC y PostC son muy similares a los niveles basales (S₁₀; *Figura 16*).

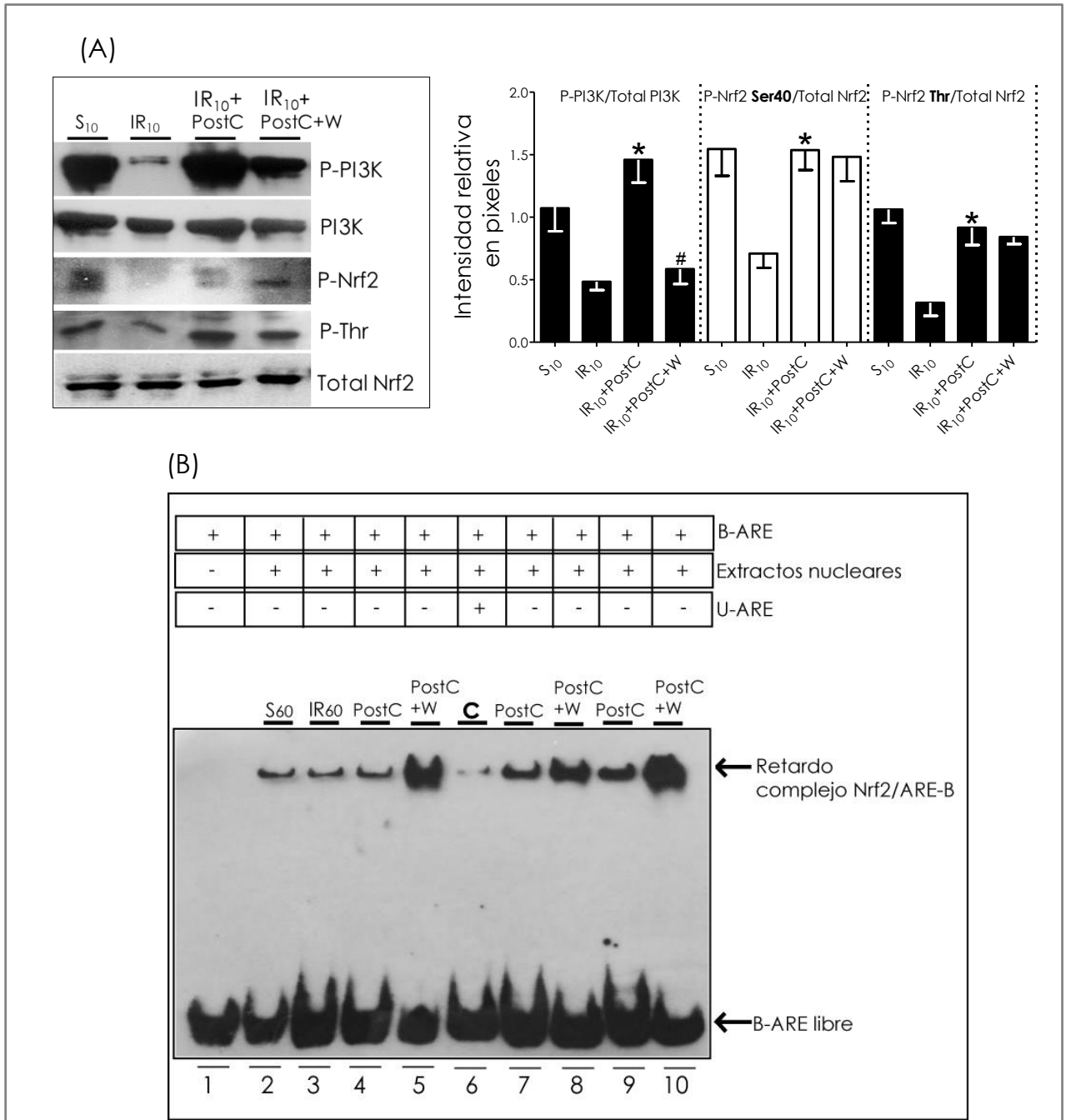
Figura 13. Efecto de la inhibición de PI3K sobre la función del corazón en el PostC. El tratamiento con 50 nM del inhibidor de PI3K, wortmanina (W) (una inyección directa en el ventrículo izquierdo al minuto 5 de la estabilización): **(A)** afecta la presión del ventrículo izquierdo (LVP) y **(B)** no tiene efecto sobre la frecuencia cardíaca (HR) durante la reperfusión. * $P < 0.05$ vs. $IR_{60} + PostC$; $n = 6$ experimentos independientes. *Isq.* = isquemia.



9.12 La cardioprotección desencadenada por la aplicación del PostC es dependiente de la señalización redox

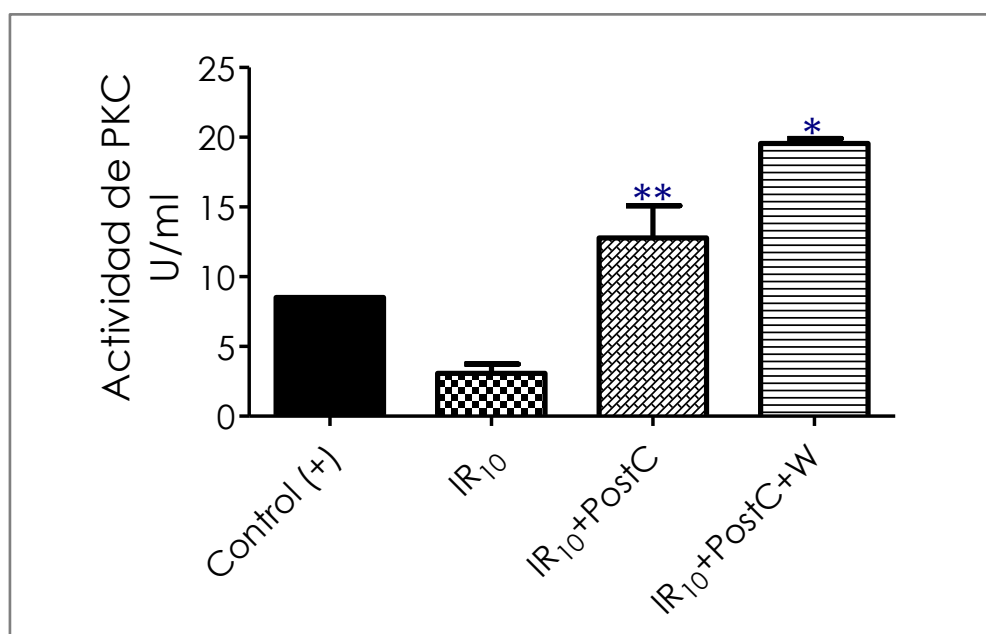
Para confirmar la participación de las ERO en la señalización de protección, realizamos un tratamiento con asc, buscando neutralizar a las ERO que podrían activar la señalización en el PostC. Al evaluar la función cardíaca en el grupo $IR_{60} + PostC + asc$, encontramos que la LVP disminuye de manera significativa a lo

Figura 14. La inhibición de PI3K no disminuyó la activación de Nrf2 en el PostC. (A) La inhibición de PI3K con wortmanina (W) en el PostC, no disminuyó la fosforilación de Nrf2 en Ser40 ni en Thr.*P< vs. IR₁₀. Los resultados son el promedio de al menos 5 experimentos independientes. **(B)** La afinidad de Nrf2 por su secuencia blanco se incrementó por efecto de la inhibición de PI3K en el PostC (PostC+W; carriles: 5, 8 y 10) en comparación al grupo IR₆₀+PostC (PostC; carriles: 4, 7 y 9). El carril 1 muestra la migración del B-ARE (ARE-biotinilado libre); el carril 6 (C) muestra el ensayo de competencia. Los carriles 2 y 3 muestran el retardo del complejo Nrf2/ARE de los grupos controles S₆₀ e IR₆₀. El EMSA es una imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.



largo de la reperusión en comparación al grupo IR₆₀+PostC (Figura 17A; P<0.05). Además también podemos observar una disminución de la HR en IR₆₀+PostC+asc respecto al IR₆₀+PostC (Figura 17B; P<0.05). Tanto la LVP como la HR en el grupo IR₆₀+PostC+asc son similares a los valores obtenidos para el grupo IR₆₀ (Figura 17A y B). Estos resultados establecen la importancia de las ERO en el PostC como moléculas señalizadoras en los mecanismos de cardioprotección.

Figura 15. La Inhibición de PI3K incrementa la activación de PKC en el PostC. La gráfica muestra los valores determinados para la actividad de PKC, reportada en U/ml. **P<0.05 vs. IR₁₀; *P<0.05 vs. IR₁₀+PostC+W.



9.13 La disminución del H₂O₂ inhibe la activación de PKC y Erk1/2 por el PostC, no así la activación de PI3K

Ya que diversos estudios han propuesto al H₂O₂ como potencial molécula señalizadora, por su tiempo de vida media y por su capacidad de difusión, determinamos si en efecto, el asc disminuye la concentración de estas ERO en el grupo (IR₁₀+PostC+asc). Encontramos que la cantidad de H₂O₂ en estos corazones fue significativamente menor que en el IR₁₀+PostC (Figura 18A;

P<0.05). Para poder establecer una relación entre la señalización-redox mediada por H₂O₂ y la activación de las cinasas *RISK*, evaluamos en el grupo IR₁₀+PostC+asc la activación de PKC, Erk1/2 y PI3K. Encontramos que la disminución de H₂O₂ correlaciona con un decremento tanto en la actividad de PKC (Figura 18B y 18C) como en la fosforilación de Erk1/2 (Figura 18D) en el grupo IR₁₀+PostC+asc respecto al grupo IR₁₀+PostC. Por otro lado, evaluamos el efecto sobre PI3K en estas condiciones y pudimos observar que no disminuyó su actividad en el grupo IR₁₀+PostC+asc respecto al IR₁₀+PostC (Figura 18E; P<0.05). Estos resultados establecen que la activación de PKC y Erk1/2 tras la aplicación del PostC es dependiente de la señalización de las ERO, específicamente de H₂O₂, sin embargo la activación de PI3K por el PostC, no es dependiente de la señalización redox.

Figura 16. Estado redox en el miocardio post-acondicionado. Estado redox en el miocardio en el grupo Sham, IR₁₀ e IR₁₀+PostC. Adicionalmente se evaluó el estado redox en corazones sometidos únicamente al PostC, sin reperusión. *P<0.05 vs. S₁₀; #P<0.05 vs. IR₁₀; n ≥ 4 experimentos independientes.

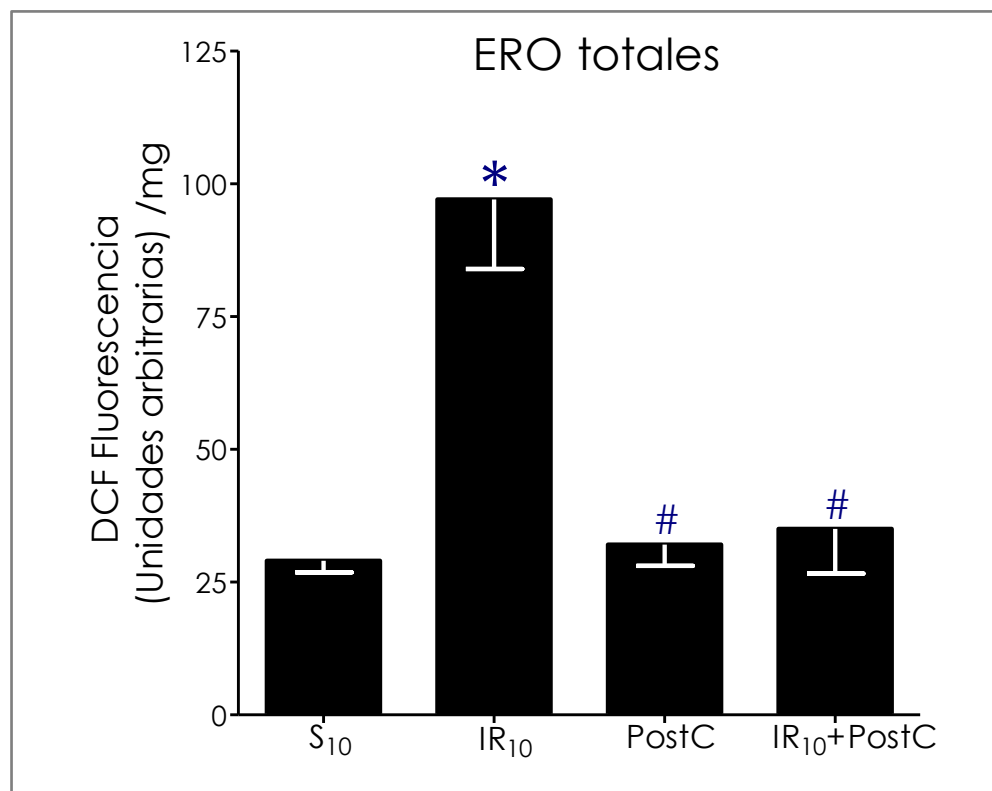
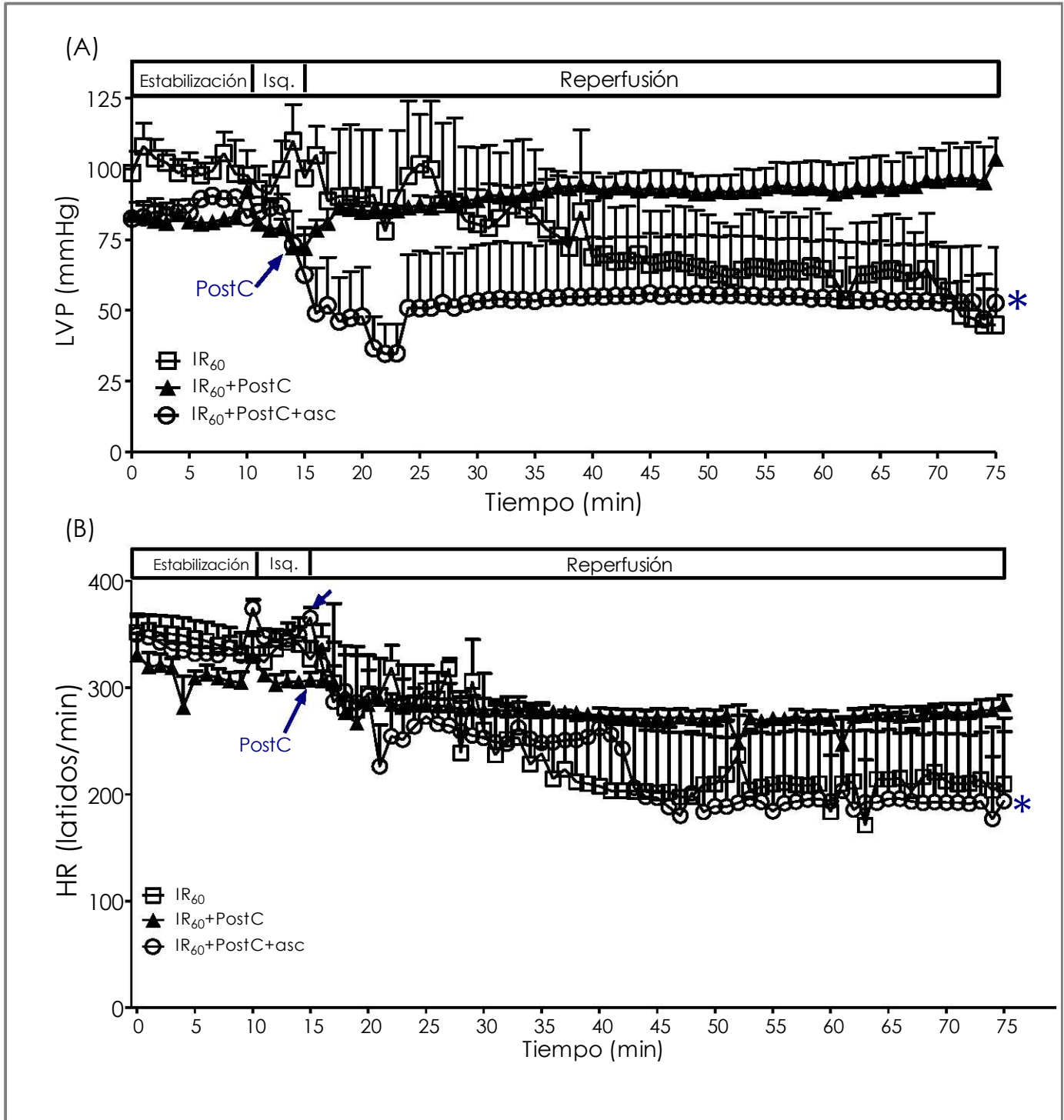


Figura 17. La cardioprotección asociada al PostC es dependiente de la señalización redox. **(A)** El tratamiento con asc en el PostC afecta la presión del ventrículo izquierdo (LVP) y **(B)** la frecuencia cardíaca (HR) durante la reperfusión. * $P < 0.05$ vs. $IR_{60} + PostC$; $n = 6$ experimentos independientes.



9.14 *La inhibición de la señalización redox en el PostC afecta la activación del factor de transcripción Nrf2*

Para saber si la pérdida de la señalización redox que involucra a PKC y Erk1/2 en el PostC podría afectar la activación transcripcional de Nrf2, realizamos ensayos de EMSA. Podemos observar en el grupo IR₆₀+PostC+asc (*Figura 19*; carriles 5 y 9) una disminución en la intensidad de la banda de retardo al compararse con el grupo IR₆₀+PostC (*Figura 19*; carriles 4 y 8). Estos resultados sostienen la hipótesis de que la señalización redox, que activa tanto a PKC como a Erk1/2, favorece la translocación de Nrf2 al núcleo en donde éste se une a su secuencia blanco ARE.

9.15 *La activación del factor de transcripción Nrf2 por la aplicación del PostC no podría ser por medio de Erk1/2*

Aun cuando podemos establecer que la señalización redox, activa a Erk1/2 y a PKC y que ésta última fosforila a Nrf2 activando la respuesta antioxidante, queda por comprobar si Erk1/2 podría tener como blanco a Nrf2 en los mecanismos de protección activados por el PostC. Tomando en cuenta que Erk1/2 es una serin-treonin cinasa que requiere la siguiente secuencia blanco Pro-Nnn-Ser/Thr-Nnn-Pro (Nnn = cualquier aminoácido), es decir que fosforila sólo Ser o Thr flanqueadas por Pro, buscamos los posibles sitios en donde Nrf2 puede ser fosforilado por Erk1/2. Encontramos únicamente 2 sitios probables: la Ser425 y la Ser579 (*Figura 20*). Este análisis indica que es muy poco probable que Nrf2 sea blanco de Erk1/2, pues la fosforilación en Ser40 parece ser crucial para su activación transcripcional, sin embargo se necesitan experimentos que corroboren esta probabilidad.

Figura 18. La señalización de las RISK: PKC y Erk1/2 es sensible al estado redox, no así la activación de PI3K en el PostC. **(A)** Efecto del asc en la concentración de H₂O₂. **(B)** Actividad relativa de PKC, se muestra el incremento en del péptido fosforilado por PKC que migra al polo (+), **(C)** ensayo cuantitativo de la actividad de PKC. **(D)** WB de la fosforilación de Erk1/2. **(E)** WB de la fosforilación de PI3K. *P<0.05 vs. IR₁₀+PostC; **P<0.05 vs. IR₁₀.

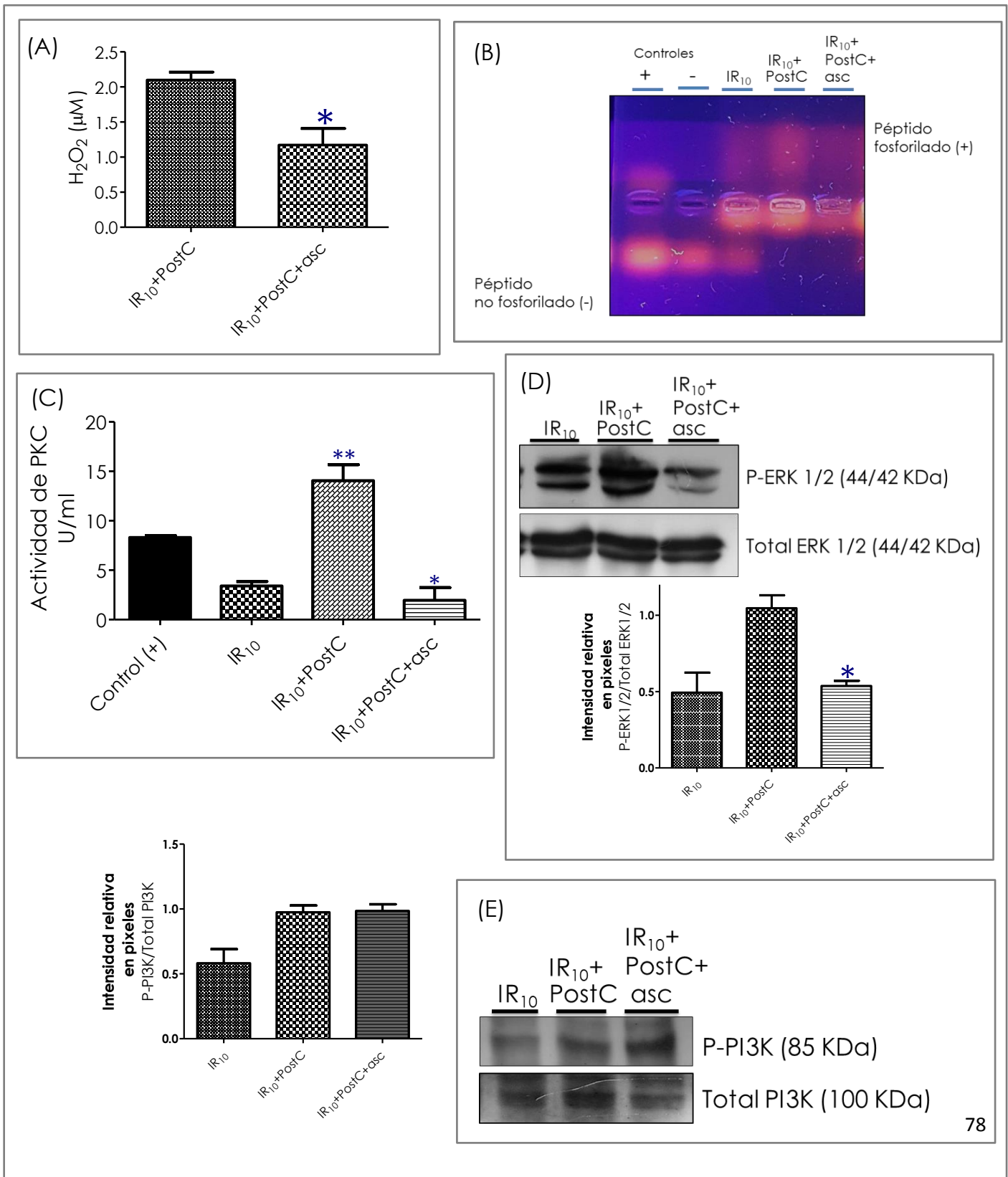


Figura 19. La inhibición de la señalización redox afecta la activación de Nrf2 en el PostC. Efecto del ácido ascórbico sobre la afinidad de Nrf2 por su secuencia blanco. (asc = IR₆₀+PostC+asc; carriles: 5 y 9); grupo IR₆₀+PostC (PC; carriles: 4 y 8). El carril 1 muestra la migración del B-ARE (ARE-biotinilado libre); el carril 10 muestra el ensayo de competencia. El EMSA es una imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.

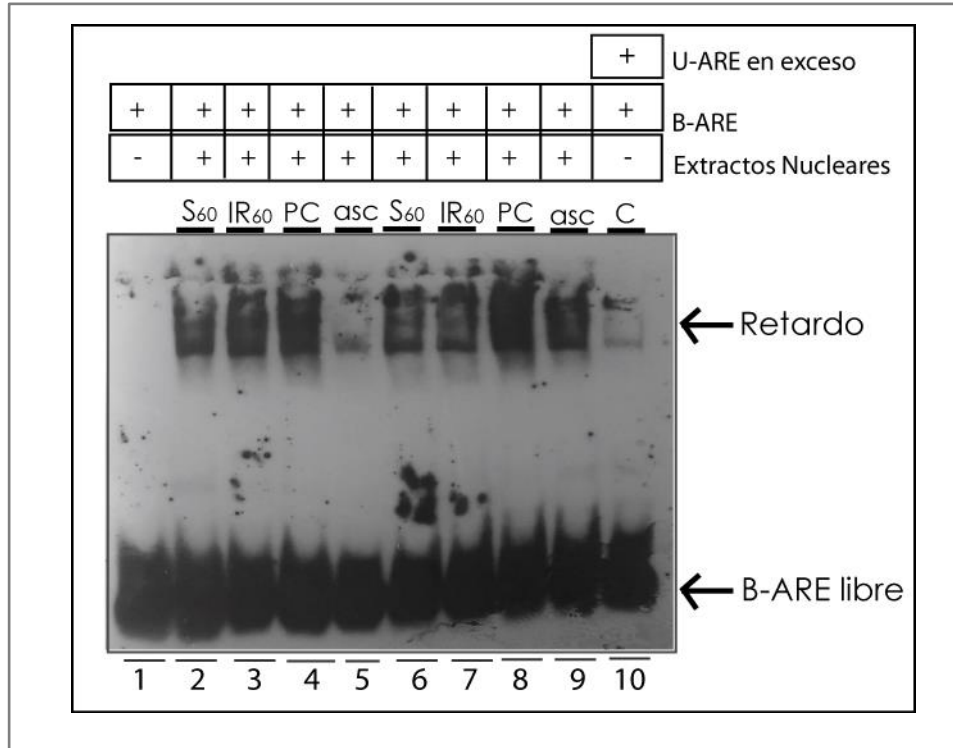
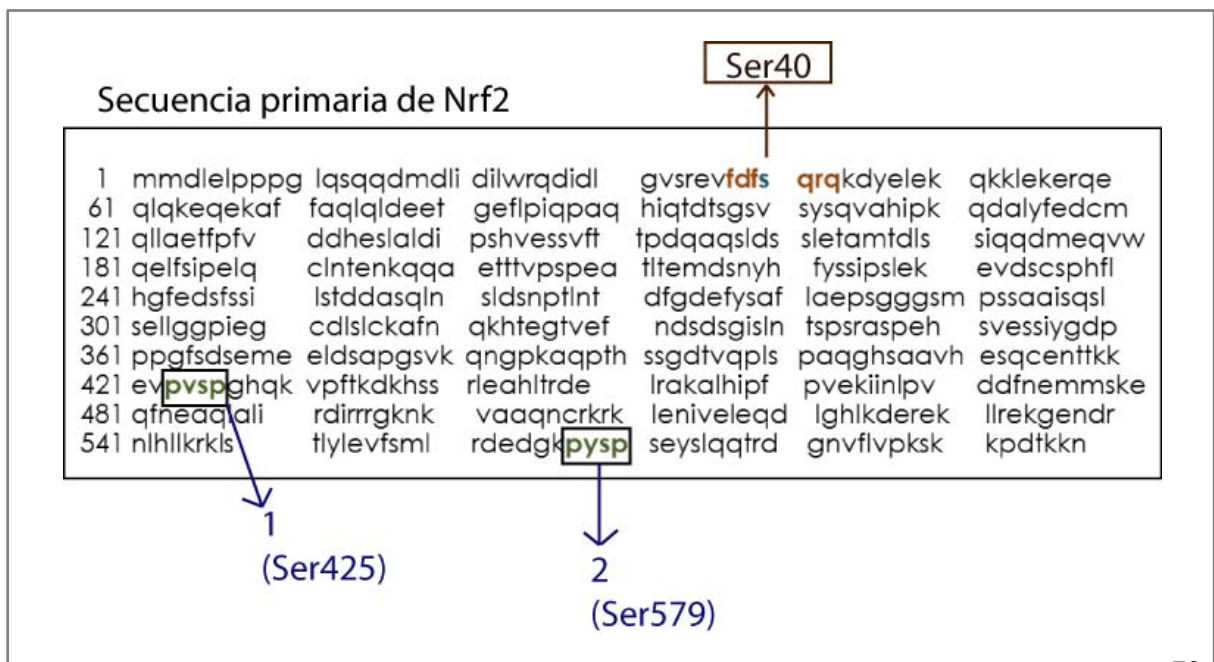


Figura 20. Análisis de la secuencia primaria de Nrf2. El análisis de la secuencia primaria de la proteína Nrf2 muestra que sólo existen 2 posibles sitios de fosforilación por Erk1/2, (1) en Ser425 y en (2) Ser579.



10. Discusión

Los resultados obtenidos en este proyecto añaden nuevos elementos de regulación entre la *señalización* activada por el PostC de forma rápida y *efectores* que pueden mantener la cardioprotección a largo plazo. Utilizando un modelo de reperfusión *in vivo*, confirmamos que el PostC activa una respuesta inmediata de protección endógena en el miocardio reperfundido, que a su vez enciende otros mecanismos de protección a largo plazo. Estos hechos fueron evidentes tanto al inicio de la reperfusión, donde la aplicación del PostC previno la generación de arritmias, así como al final de 60 min de reperfusión, en donde observamos que el PostC previno la disminución de los parámetros hemodinámicos: LVP, LVDP y el índice de contractilidad (dP/dt_{max}), además de que evitó el aumento del tamaño del infarto en la reperfusión.

Aunque la respuesta inmediata mediada por la señalización de cinasas se ha documentado ampliamente, poco se ha estudiado sobre el efecto del PostC en la inducción de la transcripción de genes. Particularmente, el papel del factor de transcripción Nrf2 en la cardioprotección desencadenada por estrategias acondicionadoras, no había sido descrito a pesar de que se ha reportado la disminución del estrés oxidante a consecuencia de la aplicación del PostC (Serviddio *et al.*, 2005; Arreguín *et al.*, 2012). El factor Nrf2 es indispensable para regular el sistema antioxidante endógeno. En este sentido, encontramos que el aumento en la fosforilación de Nrf2 por el PostC ocurrió al mismo tiempo que la activación de cinasas, mientras que el incremento en su actividad transcripcional se observó a tiempos más largos de reperfusión. Tanto su acumulación nuclear como el incremento en su interacción con la secuencia ARE, se relacionó con el aumento de la expresión y actividad de GST, Cu/Zn-SOD y γ -GCS (enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2). Estos resultados demuestran que la aplicación del PostC involucra la activación del sistema antioxidante a través de la activación de Nrf2, proporcionando

cardioprotección a largo plazo. Al respecto y durante la realización de este proyecto, se publicó un trabajo en el que el efecto protector del precondicionamiento cardiaco, se atribuyó a la activación de Nrf2 y al consecuente aumento en la expresión a nivel de mensajero de la proteína antioxidante HO-1, aunque no se describió el mecanismo de activación del Nrf2 (Zhou *et al.*, 2014). Dicho reporte, junto con el que resultó de esta tesis (Buelna-Chontal *et al.*, 2014) son los únicos que han explorado la activación de Nrf2 como regulador de la respuesta cardioprotectora en maniobras acondicionadoras. Sin embargo, existe evidencia de la participación de otros factores de transcripción, durante los mecanismos que activa el PostC. Se ha explorado el papel de la activación inducible del factor NF- κ B (p65), que promueve la síntesis de moléculas pro-inflamatorias en respuesta al estrés oxidante o a la isquemia. El grupo de Ke y colaboradores (2011) describió que el PostC farmacológico con adenosina en un modelo *in vivo*, mejoró la función cardiaca disminuyendo la inflamación. Este efecto fue atribuido a la reducción en la acumulación de NF- κ B (p65) en el núcleo, con esto evitando la expresión de TNF- α y citocinas pro-inflamatorias. Además, otro reporte describió que la disminución de la respuesta inflamatoria en el PostC, es debido a la inhibición del factor de transcripción EGR-1 (regulador de la respuesta temprana al crecimiento-1), reduciendo tanto su propia expresión a nivel del mRNA, así como también la expresión de TNF- α y de IL-6 (interleucina-6) (Wang *et al.*, 2014). En otro reporte basado en estudios de proteómica, se describió que el factor de transcripción Zac-1, una proteína que contiene "dedos de zinc" y que modula la apoptosis, se regula a la baja tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteína en ratones sometidos al PreC y al PostC, en asociación con la disminución del tamaño del infarto y la apoptosis en el miocardio reperfundido (Vincent *et al.*, 2012).

En cuanto al mecanismo de activación de Nrf2, existe evidencia de que puede ocurrir por acción de cinasas citosólicas (Zipper *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002;

Li & Kong, 2009). En este sentido encontramos que la señalización de cardioprotección activada por el PostC involucra la activación de las cinasas *RISK*: PKC ϵ , PI3K y Erk1/2. Aunque se sabe que la activación de estas cinasas es indispensable para la protección por el PostC (Zatta *et al.*, 2006; Bopassa *et al.*, 2006; Darling *et al.*, 2005), mucho se desconoce de sus blancos y los mecanismos que operan río abajo de su activación. En este contexto, nuestros resultados demuestran una relación temporal entre la activación de PKC ϵ , PI3K y Erk1/2 con el aumento en la fosforilación del factor de transcripción Nrf2 (P-Ser40, P-treoninas y P-tirosinas). Al estudiar el papel de las *RISK* en la activación de Nrf2 por la aplicación del PostC, encontramos que la inhibición de PKC disminuye la fosforilación de Nrf2 (en Ser40) y reduce su actividad transcripcional, inhibiendo su acumulación nuclear y disminuyendo su unión a la secuencia ARE. Además, demostramos que cascada abajo se reduce la expresión y actividad de GST, Cu/Zn-SOD y γ -GCS. Ya que en estas condiciones se perdió la cardioprotección, concluimos que al menos en parte, esto se debe a la disminución en la activación del sistema antioxidante modulado por Nrf2 en la reperfusión. Estos resultados nos llevan a sugerir que la vía **PKC/Nrf2 contribuye a la segunda ventana de protección desencadenada por el PostC**, la cual involucra la síntesis *de novo* de proteínas antioxidantes durante la reperfusión, como parte de los mecanismos innatos que se encienden en el corazón para protegerse a sí mismo del daño por reperfusión.

Respecto a la posibilidad de que Nrf2 pueda ser blanco de PI3K en el PostC, encontramos que la inhibición de PI3K no disminuyó la fosforilación de Nrf2. Nuestros resultados, contradicen lo reportado en células PC12 estimuladas con carnosol, en donde la vía PI3K/Akt se relacionó con la activación de Nrf2 (Martin *et al.*, 2004). No sabemos si esta diferencia es dependiente del tipo celular, lo que podemos sugerir es que PI3K tras fosforilar al fosfatidil-inositol 4-5 bifosfato, para generar fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato activa a Akt y a otros efectores.

De manera interesante encontramos que la inhibición de la vía PI3K/Akt, incrementó la capacidad de unión de Nrf2 por la secuencia ARE. Nuestra hipótesis es que la inhibición de PI3K, activa una respuesta compensatoria a nivel de otras cinasas, lo que se traduce en el aumento de la actividad transcripcional de Nrf2. Dado que demostramos que Nrf2 es blanco de PKC, decidimos explorar si esta cinasa aumentaba su actividad como parte de la respuesta compensatoria propuesta, ante la inhibición de PI3K. En esta condición, encontramos un incremento significativo en la actividad de PKC, lo que explicaría el aumento en la actividad transcripcional de Nrf2 en el PostC.

Aunque observamos que Nrf2 no es blanco de PI3K, al menos de forma directa, su participación en la cardioprotección no puede descartarse. En este trabajo se determinó que la inhibición de PI3K disminuyó la LVP en la reperfusión, lo que corresponde con estudios en donde la activación de PI3K se ha asociado con la inhibición de la apertura del mPTP, previniendo la disfunción mitocondrial en la reperfusión (Abdallah *et al.*, 2006). Además, diversos estudios demuestran que PI3K puede actuar directamente sobre la eNOS (Goodman *et al.*, 2008; Bopassa *et al.*, 2006) y también se le ha relacionado con la activación de PKC y con los mitoK_{ATP} en la membrana externa de la mitocondria (Costa *et al.*, 2005). De acuerdo a nuestros resultados y de manera interesante, PKC puede ser activada independientemente de PI3K.

Por otro lado, como ya es conocido, el daño por reperfusión involucra al estrés oxidante y el daño que a su vez puede generar éste, lo que es efectivamente prevenido por el PostC en la reperfusión. Nuestros resultados demuestran que el PostC previene el incremento de las ERO en los primeros minutos de la reperfusión manteniendo el equilibrio redox en el miocardio. En este sentido, no sólo se previene el estrés oxidante, sino que además, de acuerdo a los hallazgos del grupo de Penna y colaboradores (2006), se demuestra que durante la aplicación del PostC y en los primeros minutos de reperfusión, la baja

concentración de ERO es esencial para encender la protección endógena del PostC en el miocardio. Ellos aplicaron el antioxidante NAC durante la maniobra y encontraron que se perdió el efecto protector del PostC, evaluado por la disminución del tamaño del infarto. Además, la aplicación del mismo antioxidante una vez iniciada la reperfusión, no tuvo ningún efecto sobre la cardioprotección, evidenciando el papel de las ERO como moléculas de señalización durante el PostC. Otro reporte demostró que el PostC no disminuye el tamaño del infarto, si se aplica en presencia de una baja concentración de O_2 en el medio (Cohen *et al.*, 2008), lo que sugiere que se requiere de una concentración crítica de O_2 para activar la señalización redox (la cual no se alcanza cuando se combina el PostC en condiciones de hipoxia). Al respecto, nuestros resultados apoyan la importancia de la participación de las ERO y particularmente del H_2O_2 en la señalización de protección activada por el PostC. Encontramos que tras abatir la concentración de H_2O_2 con el antioxidante asc la función cardíaca disminuye. El H_2O_2 se ha propuesto como molécula señalizadora por su capacidad limitada de difusión y porque su transporte es facilitado por algunas isoformas de aquaporinas (Bienert *et al.*, 2007). El H_2O_2 puede transmitir una señal redox a través de diferentes mecanismos que involucran la oxidación reversible de tioles presentes en las proteínas involucradas en la señalización (Winterbourn, 2013). Además se ha evidenciado que el H_2O_2 tiene el potencial de ser altamente selectivo en la oxidación de tioles (Winterbourn, 2015), lo cual es esencial en la señalización redox.

Tomando en cuenta que la señalización redox impacta sobre la fosforilación de cinasas y otras moléculas (Santos *et al.*, 2011) medimos el efecto de la administración de asc sobre la activación de las cinasas RISK: PKC y Erk1/2. Encontramos que sólo las actividades de PKC y Erk1/2 disminuyeron, lo que indica que el H_2O_2 participa en la activación de estas cinasas y no en la activación de PI3K. Ya que también Nrf2 disminuyó su actividad transcripcional

en estas condiciones, concluimos que la señalización redox activa a la vía PKC/Nrf2.

Quedaba por evaluar si Nrf2 es blanco de Erk1/2, así que realizamos un análisis de la secuencia primaria del factor. La cinasa Erk1/2 es una serin-treonin cinasa, cuya secuencia a fosforilar es Pro-Nnn-Ser/Thr-Nnn-Pro (Nnn es cualquier aminoácido; González *et al.*, 1991). El análisis *in silico* mostró que en la secuencia primaria de Nrf2 sólo existen 2 sitios con estas características: la Ser425 y la Ser579, lo que indica una **baja probabilidad para que Nrf2 sea blanco de Erk1/2**, pues aunque se ha propuesto que Nrf2 es susceptible de ser fosforilado en múltiples sitios, sólo la fosforilación en Ser40 es crucial para su activación (Huang *et al.*, 2002; Bloom & Jaiswal, 2003). Nuestros resultados apoyan esta aseveración, ya que PKC fosforila a Nrf2 en este aminoácido durante el PostC.

11. Consideraciones adicionales:

El estudio en modelos experimentales ha permitido avanzar en el entendimiento del mecanismo endógeno de cardioprotección desencadenado por el PostC, sin embargo falta entender un panorama más amplio de los mecanismos involucrados, para así implementar estrategias que ayuden a garantizar la activación de las moléculas y vías esenciales en la cardioprotección. Esto permitiría que la aplicación del PostC tuviera un efecto benéfico en los pacientes independientemente de la presencia de las diferentes co-morbilidades y co-medicaciones. En este respecto, el factor Nrf2 ha tomado gran relevancia en diversas patologías convirtiéndose en candidato para el desarrollo de estrategias terapéuticas. En particular es importante mencionar que el PostC no previene el daño por reperfusión en animales con hiperlipidemia, ya que la vía de PKC no puede activarse (Csonka *et al.*, 2014). Lo mismo ocurre con la vía RISK en animales diabéticos (Przyklenk *et al.*, 2011; Oosterlinck *et al.*, 2013). Esta información nos lleva a proponer que en dichas condiciones, se podrían utilizar activadores de Nrf2 de origen natural como la curcumina (Jiménez-Osorio *et al.*, 2015), epigallocatequina (Wang *et al.*, 2015), sulforafano (Zhao *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2008), resveratrol (Ungvari *et al.*, 2010) y/o ácido lipoico (Suh *et al.*, 2004) como co-adyuvantes a la terapia de PostC.

12. Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que en la cardioprotección mediada por el PostC, es indispensable la concatenación de múltiples respuestas a corto, mediano y largo plazo. La señalización redox se activa durante el propio PostC, seguida de la activación de cinasas al inicio de la reperfusión, constituyendo la *primer ventana de oportunidad* para salvar al miocardio. Una vez que se ha activado PKC mediante la señalización redox, activa a su vez a Nrf2 para mantener activo al sistema antioxidante endógeno durante la reperfusión prolongada, asegurando así la cardioprotección a largo plazo en la *segunda ventana de protección*. En la figura 21 se resumen las conclusiones de este trabajo.

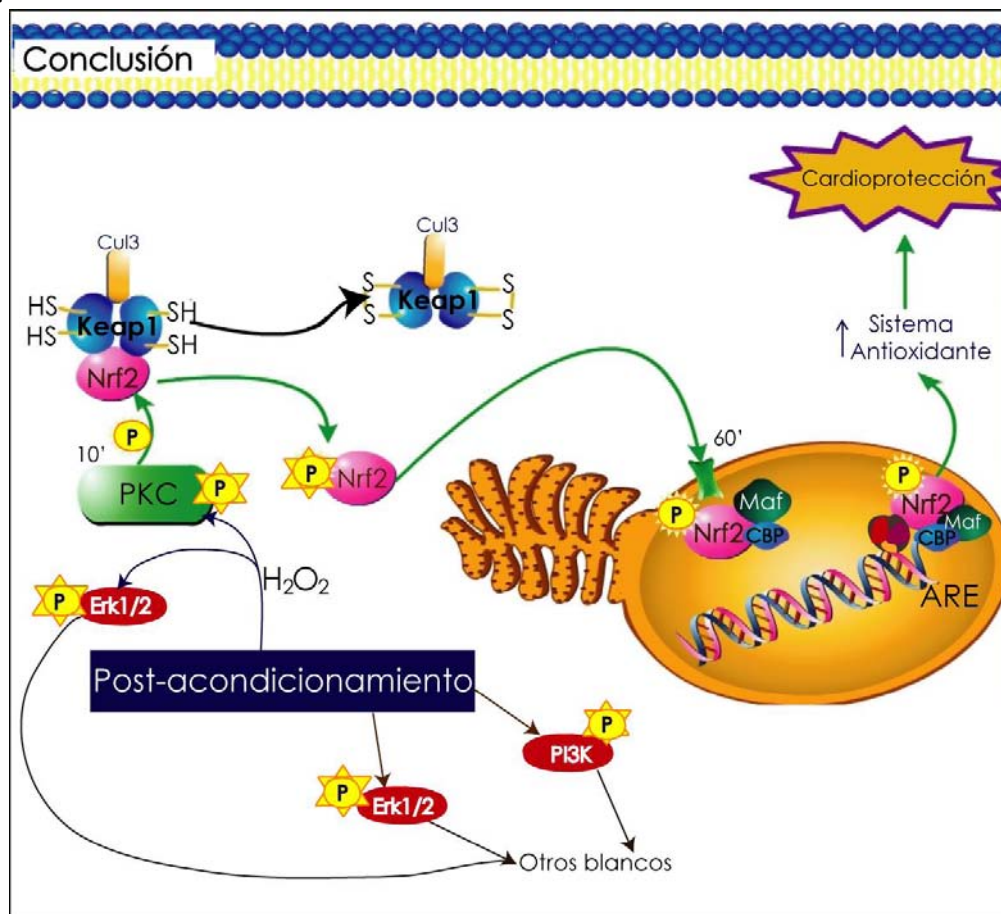


Figura 21. La activación de PKC/Nrf2 dependiente de la señalización redox mediada por el H₂O₂ en el PostC, activa al sistema antioxidante protegiendo al miocardio reperfundido. La activación de PI3K y Erk1/2 por el PostC tiene otros blancos que no incluyen al Nrf2.

13. Perspectivas

Este proyecto nos ha permitido evidenciar la importancia de la señalización redox en el PostC a través de la activación de Erk1/2 y PKC. Además hemos demostrado que Nrf2 es blanco de PKC y que su activación mantiene la cardioprotección a largo plazo.

La siguiente pregunta es dilucidar el mecanismo por el cual, tanto Erk1/2 como PKC pueden ser activadas por las ERO, en particular cuál es el papel del H₂O₂. Por otro lado, ya que se sabe que Nrf2 y NF-κB comparten co-activadores nucleares (Buelna-Chontal & Zazueta, 2013), estudiaremos cómo se regula el PostC.

14. Referencias

Abdallah, Y.; Gkatzoflia, A.; Gligorievski, D.; Kasseckert, S.; Euler, G.; Schlüter, K.-D. D.; Schäfer, M.; Piper, H.-M. M.; Schäfer, C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc. Res.* 70: 346–353; 2006.

Alam, J.; Stewart, D.; Touchard, C.; Boinapally, S.; Choi, A.M.; Cook, J.L. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* 274(37):26071-26078. 1999.

Aldakkak, M.; Stowe, D. F.; Heisner, J. S.; Spence, M.; Camara, A. K. Enhanced Na⁺/H⁺ exchange during ischemia and reperfusion impairs mitochondrial bioenergetics and myocardial function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 52: 236–244; 2008.

Andreadou, I.; Iliodromitis, E.; Farmakis, D.; Kremastinos, D. To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited. *Expert Opin. Ther. Targets* 13: 945956; 2009.

Aon, M. A.; Bhatt, N.; Cortassa, S. C. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front Physiol* 5: 282; 2014.

Arreguín, F.; García, N.; Hernández-Reséndiz, S.; Buelna-Chontal, M.; Correa, F.; Olín-Sandoval, V.; Medina-Campos, O. N.; Pedraza-Chaverrí, J.; Zazueta, C. Attenuation of

oxidant damage in the postconditioned heart involves non-enzymatic response and partial catalytic protection. *Exp. Physiol.* 97: 1119–1130; 2012.

Arroyo, C.M.; Kramer, J.H.; Dickens, B.F.; Weglicki, W.B. Identification of free radicals in myocardial ischemia / reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett.* 221:101–104. 1987.

Avkiran, M.; Cook, A.; Cuello, F. Targeting Na⁺/H⁺ exchanger regulation for cardiac protection: a RSK approach? *Curr. Op. Pharmacol.* 8: 133–140; 2008.

Baird, L.; Dinkova-Kostova, A. T. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85: 241–272; 2011.

Basso, C.; Rizzo, S.; Thiene, G. The metamorphosis of myocardial infarction following coronary recanalization. *Cardiovasc. Pathol.* 19: 22–28; 2010.

Basso, C.; Rizzo, S.; Thiene, G. The metamorphosis of myocardial infarction following coronary recanalization. *Cardiovasc. Pathol.* 19: 22–28; 2010.

Becker, L. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular research* 61: 461–470; 2004.

Bellezza, I.; Mierla, A. L.; Minelli, A. Nrf2 and NF-κB and Their Concerted Modulation in Cancer Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)* 2: 483–497; 2010.

Betteridge, D.J. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49(2 Suppl 1):3-8.2000.

Bienert, G. P.; Møller, A. L.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Møller, I. M.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282: 1183–1192; 2007.

Bloom, D.; Jaiswal, A. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from IκNrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278: 44675–44682; 2003.

Boengler, K.; Hilfiker-Kleiner, D.; Heusch, G.; Schulz, R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic research in cardiology* 105: 771–785; 2010.

Bolli, R.; Jeroudi, M. O.; Patel, B. S.; DuBose, C. M.; Lai, E. K.; Roberts, R.; McCay, P. B. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4695–4699; 1989.

Bopassa, J.-C. C.; Ferrera, R.; Gateau-Roesch, O.; Couture-Lepetit, E.; Ovize, M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* 69: 178–185; 2006.

Bryan, H.; Olayanju, A.; Goldring, C.; Park. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology* 85: 705–717; 2013.

Buelna-Chontal, M.; Correa, F.; Hernández-Reséndiz, S.; Zazueta, C.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of α -mangostin on cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidative stress. *J Med Food* 14: 1370–1374; 2011.

Buelna-Chontal, M.; Guevara-Chávez, J.-G. G.; Silva-Palacios, A.; Medina-Campos, O.-N. N.; Pedraza-Chaverri, J.; Zazueta, C. Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* 74: 145–156; 2014.

Buelna-Chontal, M.; Zazueta, C. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: a double end sword? *Cell. Signal.* 25: 2548–2557; 2013.

Buja, L. M. The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria. *Tex Heart Inst J* 40: 221–228; 2013.

Burke, A. P.; Virmani, R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med. Clin. North Am.* 91: 553–72; ix; 2007.

Cantley, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 95:230-232; 2002.

Chanas, S.A.; Jiang, Q.; McMahon, M.; McWalter, G.K.; McLellan, L.I.; Elcombe, C.R.; Henderson, C.J.; Wolf, C.R.; Moffat, G.J.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J.D. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.* 365(Pt 2):405-416.2002.

Chorley, B. N.; Campbell, M. R.; Wang, X.; Karaca, M.; Sambandan, D.; Bangura, F.; Xue, P.; Pi, J.; Kleeberger, S. R.; Bell, D. A. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.*40: 7416–7429; 2012.

Churchill, E.; Szweda, L. Translocation of δ PKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 439: 194199; 2005.

Cohen, M. V.; Yang, X.-M. M.; Downey, J. M. Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res. Cardiol.* 103: 464–471; 2008.

Cohen, M.; Yang, X.-M.; Downey, J. The pH Hypothesis of Postconditioning Staccato Reperfusion Reintroduces Oxygen and Perpetuates Myocardial Acidosis. *Circulation* highwire; 115: 1895–1903; 2007.

Correa, F.; Buelna-Chontal, M.; Chagoya, V.; García-Rivas, G; Vigueras, R.M.; Pedraza-Chaverri, J.; Zazueta, C. Post-conditioning activates the nitric oxide/ cGMP pathway in hearts with apical myocardial infarction conferring cardioprotection. *Eur J Pharmacol*;765:472-481;2015.

Correa, F.; Buelna-Chontal, M.; Hernández-Reséndiz, S.; R García-Niño, W.; J Roldán, F.; Soto, V.; Silva-Palacios, A.; Amador, A.; Pedraza-Chaverri, J.; Tapia, E.; Zazueta, C. Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radic. Biol. Med.* 61: 119–129; 2013.

Correa, F.; García, N.; Robles, C.; Martínez-Abundis, E.; Zazueta, C. Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40: 599–606; 2008.

Costa, A.; Garlid, K.; West, I.; Lincoln, T.; Downey, J.; Cohen, M.; Critz, S. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research* 97: 329–336; 2005.

Cross, T. G.; Scheel-Toellner, D.; Henriquez, N. V.; Deacon, E.; Salmon, M.; Lord, J. M. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256: 34–41; 2000.

Csonka, C.; Szucs, G.; Varga-Orvos, Z.; Bencsik, P.; Csont, T.; Zvara, A.; Puskás, L.; Ferdinandy, P. Ischemic postconditioning alters the gene expression pattern of the ischemic heart. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 239: 141–150; 2014.

Darling, C. E.; Jiang, R.; Maynard, M.; Whittaker, P.; Vinten-Johansen, J.; Przyklenk, K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289: H1618–26; 2005.

Das, S.; Wong, R.; Rajapakse, N.; Murphy, E.; Steenbergen, C. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ. Res.* 103: 983–991; 2008.

Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231–241; 1997.

Deng, C.; Sun, Z.; Tong, G.; Yi, W.; Ma, L.; Zhao, B.; Cheng, L.; Zhang, J.; Cao, F.; Yi, D. α -Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *PLoS ONE* 8: e58371; 2013.

Dhalla; Elmoselhi; Hata; Makino. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research* 47: 446–456; 2000.

Di Lisa, F.; Bernardi, P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovascular research* 70: 191–199; 2006.

Dikalov, S.; Griendling, K. K.; Harrison, D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 49: 717–727; 2007.

Dong, S.; Teng, Z.; Lu, F.-H. H.; Zhao, Y.-J. J.; Li, H.; Ren, H.; Chen, H.; Pan, Z.-W. W.; Lv, Y.-J. J.; Yang, B.-F. F.; Tian, Y.; Xu, C.-Q. Q.; Zhang, W.-H. H. 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: 195–206; 2010.

Drevinge, C.; Karlsson, L. O.; Ståhlman, M.; Larsson, T.; Perman Sundelin, J.; Grip, L.; Andersson, L.; Borén, J.; Levin, M. C. Cholesteryl esters accumulate in the heart in a porcine model of ischemia and reperfusion. *PLoS ONE* 8: e61942; 2013.

du Toit; Genis; Opie; Pollesello; Lochner. A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *British journal of pharmacology* 154: 41–50; 2008.

Eggler, A. L.; Small, E.; Hannink, M.; Mesecar, A. D. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.* 422: 171–180; 2009.

Eldar-Finkelman, H.; Seger, R.; Vandenheede, J. R.; Krebs, E. G. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 270: 987–990; 1995.

Ertracht, O.; Malka, A.; Atar, S.; Binah, O. The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia. *Pharmacol. Ther.* 142: 33–40; 2014.

Flaherty, J. T.; Pitt, B.; Gruber, J. W.; Heuser, R. R.; Rothbaum, D. A.; Burwell, L. R.; George, B. S.; Kereiakes, D. J.; Deitchman, D.; Gustafson, N. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients

undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 89: 1982–1991; 1994.

Frangogiannis, N. G. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* 97: 738–747; 2007.

Frangogiannis, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 11: 255–265; 2014.

Freude, B.; Masters, T. N.; Robicsek, F.; Fokin, A.; Kostin, S.; Zimmermann, R.; Ullmann, C.; Lorenz-Meyer, S.; Schaper, J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 197–208; 2000.

Garcia-Dorado, D.; Ruiz-Meana, M.; Inserte, J.; Rodriguez-Sinovas, A.; Piper, H. M. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 94: 168–180; 2012.

García-Niño, W. R.; Tapia, E.; Zazueta, C.; Zatarain-Barrón, Z. L.; Hernández-Pando, R.; Vega-García, C. C.; Pedraza-Chaverrí, J. Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decreased respiratory complex I activity, and membrane permeability transition pore opening. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 424692; 2013.

García-Rivas, G. de J.; Carvajal, K.; Correa, F.; Zazueta, C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 149: 829–837; 2006.

Gateau-Roesch, O.; Argaud, L.; Ovize, M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovascular research* 70: 264–273; 2006.

Givvimani, S.; Pushpakumar, S. B.; Metreveli, N.; Veeranki, S.; Kundu, S.; Tyagi, S. C. Role of mitochondrial fission and fusion in cardiomyocyte contractility. *Int. J. Cardiol.* 187: 325–333; 2015.

Gomez, L.; Li, B.; Mewton, N.; Sanchez, I.; Piot, C.; Elbaz, M.; Ovize, M. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc. Res.* 83: 226–233; 2009.

Gonzalez, F. A.; Raden, D. L.; Davis, R. J. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* 266: 22159–22163; 1991.

Goodman, M. D.; Koch, S. E.; Fuller-Bicer, G. A.; Butler, K. L. Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: H1649–56; 2008.

Gottlieb, S.; Moss, A.J.; McDermott ,M.; Eberly, S. Comparison of posthospital survival after acute myocardial infarction in women and men. *Am J Cardiol.* 74(7):727-730;1994.

Grech, E. D.; Ramsdale, D. R. Primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *Postgrad Med J* 72: 269–273; 1996.

Gross, E.; Gross, G. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res. highwire*;70: 212–221; 2006.

Grygier, M.; Araszkiwicz, A.; Lesiak, M.; Janus, M.; Kowal, J.; Skorupski, W.; Pyda, M.; Mitkowski, P.; Grajek, S. New method of intracoronary adenosine injection to prevent microvascular reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *The American journal of cardiology* 107: 1131–1135; 2011.

Guan, W.; Osanai, T.; Kamada, T.; Hanada, H.; Ishizaka, H.; Onodera, H.; Iwasa, A.; Fujita, N.; Kudo, S.; Ohkubo, T.; Okumura, K. Effect of Allopurinol Pretreatment on Free Radical Generation after Primary Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41: 699; 2003.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139; 1974.

Hagar, J. M.; Hale, S. L.; Kloner, R. A. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ. Res.* 68: 61–68; 1991.

Halestrap, A.; Richardson, A. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78: 129141; 2015.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14; 1984.

Harada, H.; Andersen, J. S.; Mann, M.; Terada, N.; Korsmeyer, S. J. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 9666–9670; 2001.

Hasan, S. T.; Zingg, J.-M. M.; Kwan, P.; Noble, T.; Smith, D.; Meydani, M. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis* 232: 40–51; 2014.

Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 35:339-41. 2003.

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

Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 123: 92–100; 2013.

Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* 61: 448–460; 2004.

Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 12: 217–234; 2007.

Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* 70: 240–253; 2006.

Hausenloy, D.J.; Lecour, S.; Yellon, D.M. Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survivor Activating Factor Enhancement Prosurvival Signaling Pathways in Ischemic Postconditioning: Two Sides of the Same Coin. *Antiox. Redox Signa.* 14(5):893-907; 2011.

Hernández-Reséndiz, S.; Roldán, F.-J. J.; Correa, F.; Martínez-Abundis, E.; Osorio-Valencia, G.; Ruíz-de-Jesús, O.; Alexánder-Rosas, E.; Viguera, R. M.; Franco, M.; Zazueta, C. Postconditioning protects against reperfusion injury in hypertensive dilated cardiomyopathy by activating MEK/ERK1/2 signaling. *J. Card. Fail.* 19: 135–146; 2013.

Hernández-Reséndiz, S.; Zazueta, C. PHO-ERK1/2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling. *Life Sci.* 108: 13–21; 2014.

Hirotsu, Y.; Katsuoka, F.; Funayama, R.; Nagashima, T.; Nishida, Y.; Nakayama, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 40: 10228–10239; 2012.

Hori, M.; Nishida, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 81: 457–464; 2009.

Huang, H.-C. C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 277: 42769–42774; 2002.

Iliodromitis, E. K.; Georgiadis, M.; Cohen, M. V.; Downey, J. M.; Bofilis, E.; Kremastinos, D. T. Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res. Cardiol.* 101: 502–507; 2006

Inserte, J.; Garcia-Dorado, D.; Agulló, L.; Paniagua, A.; Soler-Soler, J. Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* 45(2):351-359.2000.

Inserte, J.; Ruiz-Meana, M.; Rodríguez-Sinovas, A.; Barba, I.; Garcia-Dorado, D. Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection. *Antioxid. Redox Signal.* 14: 923–939; 2011.

Ishii; Itoh; Takahashi; Sato; Yanagawa; Katoh; Bannai; Yamamoto. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 275: 16023–16029; 2000.

Jang, I.-K.; Weissman, N.; Picard, M.; Zile, M.; Pettigrew, V.; Shen, S.; Tatsuno, J.; Hibberd, M.; Tzivoni, D.; Wackers, F.; Investigators, E. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of intravenous MCC-135 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction: Evaluation of MCC-135 for left ventricular salvage in acute myocardial infarction (EVOLVE). *American heart journal* 155: 113.e1–8; 2007.

Jaswal, J.; Keung, W.; Wang, W.; Ussher, J.; Lopaschuk, G. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation — A novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1813; 2011.

Jiménez-Osorio, A. S. S.; González-Reyes, S.; Pedraza-Chaverri, J. Natural Nrf2 activators in diabetes. *Clin. Chim. Acta* 448: 182–192; 2015.

Jin, M.; Kumar, A.; Kumar, S. Ethanol-mediated regulation of cytochrome P450 2A6 expression in monocytes: role of oxidative stress-mediated PKC/MEK/Nrf2 pathway. *PLoS ONE* 7: e35505; 2012.

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

Juhaszova, M.; Zorov, D. B.; Kim, S.-H. H.; Pepe, S.; Fu, Q.; Fishbein, K. W.; Ziman, B. D.; Wang, S.; Ytrehus, K.; Antos, C. L.; Olson, E. N.; Sollott, S. J. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 113: 1535–1549; 2004.

Kawasumi, H.; Satoh, N.; Kitada, Y. Caldaret, an Intracellular Ca²⁺ Handling Modulator, Limits Infarct Size of Reperfused Canine Heart. *Journal of Pharmacological Sciences* 103; 2007.

Ke, J.-J. J.; Yu, F.-X. X.; Rao, Y.; Wang, Y.-L. L. Adenosine postconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury though modulate production of TNF- α and prevents activation of transcription factor NF-kappaB. *Mol. Biol. Rep.* 38: 531–538; 2011.

Khan, A. R.; Binabdulhak, A. A.; Alastal, Y.; Khan, S.; Faricy-Beredo, B. M.; Luni, F. K.; Lee, W. M.; Khuder, S.; Tinkel, J. Cardioprotective role of ischemic postconditioning in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Am. Heart J.* 168: 512–521.e4; 2014.

Ki, S.; Cho, I.; Choi, D.; Kim, S. Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBPbeta TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression. *Mol. & Cellular. Biol.* 25:4150–4165. 2005.

Kin, H.; Wang, N.-P. P.; Mykytenko, J.; Reeves, J.; Deneve, J.; Jiang, R.; Zatta, A. J.; Guyton, R. A.; Vinten-Johansen, J.; Zhao, Z.-Q. Q. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock*29: 761–768; 2008.

Kin, H.; Zhao, Z.-Q.; Sun, H.-Y.; Wang, N.-P.; Corvera, J.; Halkos, M.; Kerendi, F.; Guyton, R.; Vinten-Johansen, J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 62: 74–85; 2004.

Kitakaze; Asakura; Kim; Shintani; Asanuma.... Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. ; 2007.

Kloner RA. Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. *Circulation Research.* 2013;113(4):451-63.

Kloner, R.; Rezkalla, S. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. *Cardiovascular research*70: 297–307; 2006.

Kolettis, T. M.; Vilaeti, A. D.; Tsalikakis, D. G.; Zoga, A.; Valenti, M.; Tzallas, A. T.; Papalois, A.; Iliodromitis, E. K. Effects of pre- and postconditioning on arrhythmogenesis in the in vivo rat model. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 18: 376–385; 2013.

Kowaltowski, A.; de Souza-Pinto, N.; Castilho, R.; Vercesi, A. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 47: 333–343; 2009.

Lacerda, L.; Somers, S.; Opie, L. H.; Lecour, S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc. Res.* 84: 201–208; 2009.

Lal, H.; Ahmad, F.; Woodgett, J.; Force, T. The GSK-3 family as therapeutic target for myocardial diseases. *Circ. Res.* 116: 138–149; 2015.

Lecour, S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47: 32–40; 2009.

Lee, J.; Hanson, J.; Chu, W.; Johnson, J. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 276(23):20011–20016. 2001a.

Lee, J.-M.; Moehlenkamp, J.; Hanson, J.; Johnson, J. Nrf2-Dependent Activation of the Antioxidant Responsive Element by tert-Butylhydroquinone Is Independent of Oxidative Stress in IMR-32 Human Neuroblastoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 280: 286–292; 2001b.

Lemoine, S.; Puddu, P. E.; Durand, C.; Lepage, O.; Babatasi, G.; Ivascau, C.; Massetti, M.; Gérard, J.-L. L.; Hanouz, J.L. L. Signaling pathways involved in postconditioning-induced cardioprotection of human myocardium, in vitro. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 235: 768–776; 2010.

Leonard, M.; Kieran, N.; Howell, K.; Burne, M.; Varadarajan, R.; Dhakshinamoorthy, S.; Porter, A.; O'Farrelly, C.; Rabb, H.; Taylor, C. Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20: 2624–2626; 2006.

Li, W.; Kong, A.-N. N. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Carcinog.* 48: 91–104; 2009.

Li, X.; Arslan, F.; Ren, Y.; Adav, S. S.; Poh, K. K.; Sorokin, V.; Lee, C. N.; de Kleijn, D.; Lim, S. K.; Sze, S. K. 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: 2331–2346; 2012.

Lin, K.T.; Xue, J.Y.; Sun, F.F.; Wong, P.Y. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 230:115–119. 1997.

Lincoff, A.; Roe, M.; Aylward, P.; Galla, J.; Rynkiewicz, A.; Guetta, V.; Zelizko, M.; Kleiman, N.; White, H.; McErlean, E.; Erlinge, D.; Laine, M.; Ferreira, J.; Goodman, S.; Mehta, S.;

Atar, D.; Suryapranata, H.; Jensen, S.; Forster, T.; Fernandez-Ortiz, A.; Schoors, D.; Radke, P.; Belli, G.; Brennan, D.; Bell, G.; Krucoff, M.; Investigators, P. Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial. *Eur. Heart J.* 35: 2516–2523; 2014.

Liu, G.-H. H.; Qu, J.; Shen, X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783: 713–727; 2008.

Liu, Z.-Z. Z.; Kong, J.-B. B.; Li, F.-Z. Z.; Ma, L.-L. L.; Liu, S.-Q. Q.; Wang, L.-X. X. Ischemic postconditioning decreases matrix metalloproteinase-2 expression during ischemia-reperfusion of myocardium in a rabbit model: A preliminary report. *Exp Clin. Cardiol.* 18: e99–e101; 2013.

Lønborg, J.; Holmvang, L.; Kelbæk, H.; Vejlstrop, N.; Jørgensen, E.; Helqvist, S.; Saunamäki, K.; Clemmensen, P.; Treiman, M.; Jensen, J.; Engstrøm, T. ST-Segment resolution and clinical outcome with ischemic postconditioning and comparison to magnetic resonance. *Amer. Heart J.* 160: 10851091; 2010.

Long, Q.; Yang, K.; Yang, Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 5: 19–32; 2015.

Malhotra, D.; Portales-Casamar, E.; Singh, A.; Srivastava, S.; Arenillas, D.; Happel, C.; Shyr, C.; Wakabayashi, N.; Kensler, T. W.; Wasserman, W. W.; Biswal, S. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 38: 5718–5734; 2010.

Manning, A. S.; Coltart, D. J.; Hearse, D. J. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ. Res.* 55: 545–548; 1984.

Martin, D.; Rojo, A.I.; Salinas, M.; Diaz, R.; Gallardo, G.; Alam, J.; De Galarreta, C.M.; Cuadrado A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 5;279(10):8919-29; 2004.

Mewton, N.; Croisille, P.; Gahide, G.; Rioufol, G.; Bonnefoy, E.; Sanchez, I.; Cung, T.; Sportouch, C.; Angoulvant, D.; Finet, G.; André-Fouët, X.; Derumeaux, G.; Piot, C.; Vernhet, H.; Revel, D.; Ovize, M. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 55: 1200–1205; 2010.

Moriguchi, A.; Otani, H.; Yoshioka, K.; Shimazu, T.; Fujita, M.; Okazaki, T.; Sato, D.; Kyoji, S.; Iwasaka, T. Inhibition of Contractile Activity During Postconditioning Enhances Cardioprotection by Restoring Sarcolemmal Dystrophin Through Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Circulation Journal* 74; 2010.

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

Niccoli, G.; Rigattieri, S.; Vita, M.; Valgimigli, M.; Corvo, P.; Fabbiochi, F.; Romagnoli, E.; Caterina, A.; Torre, G.; Schiavo, P.; Tarantino, F.; Ferrari, R.; Tomai, F.; Olivares, P.; Cosentino, N.; D'Amario, D.; Leone, A.; Porto, I.; Burzotta, F.; Trani, C.; Crea, F. Open-label, randomized, placebo-controlled evaluation of intracoronary adenosine or nitroprusside after thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention for the prevention of microvascular obstruction in acute myocardial infarction: the REOPEN-AMI study (Intracoronary Nitroprusside Versus Adenosine in Acute Myocardial Infarction). *JACC. Cardiovascular interventions* 6: 580–589; 2013.

Nishihara, M.; Miura, T.; Miki, T.; Tanno, M.; Yano, T.; Naitoh, K.; Ohori, K.; Hotta, H.; Terashima, Y.; Shimamoto, K. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43: 564–570; 2007.

Niture, S. K.; Khatri, R.; Jaiswal, A. K. Regulation of Nrf2—an update. *Free Radic. Biol. Med.* 66: 36–44; 2014.

Oldenburg, O.; Qin, Q.; Krieg, T.; Yang, X.-M. M.; Philipp, S.; Critz, S. D.; Cohen, M. V.; Downey, J. M. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H468–76; 2004.

Ong, S.-B. B.; Samangouei, P.; Kalkhoran, S. B.; Hausenloy, D. J. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78: 23–34; 2015.

Oosterlinck, W.; Dresselaers, T.; Geldhof, V.; Nevelsteen, I.; Janssens, S.; Himmelreich, U.; Herijgers, P. Diabetes mellitus and the metabolic syndrome do not abolish, but might reduce, the cardioprotective effect of ischemic postconditioning. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 145: 1595–1602; 2013.

Organización Mundial de la Salud (2014). *Las 10 Causas Principales de Defunción en el Mundo*. Fecha de Publicación de Mayo de 2014: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>

Ovize, M.; Baxter, G. F.; Di Lisa, F.; Ferdinandy, P.; Garcia-Dorado, D.; Hausenloy, D. J.; Heusch, G.; Vinten-Johansen, J.; Yellon, D. M.; Schulz, R. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* 87: 406–423; 2010.

Pagliari, P.; Penna, C. Cardiac Postconditioning. *Antioxidants & Redox Signaling.* , 14(5): 777-779; 2011.

Park, E.Y.; Rho, H.M. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol. Cell. Biochem.* 240(1-2):47-55. 2002.

Park, T.-S. S.; Yamashita, H.; Blaner, W. S.; Goldberg, I. J. Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins. *Curr. Opin. Lipidol.* 18: 277–282; 2007.

Parra, E.; Cruz, D.; García, G.; Zazueta, C.; Correa, F.; García, N.; Chávez, E. Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 269: 19–26; 2005.

Pavón, N.; Martínez-Abundis, E.; Hernández, L.; Gallardo-Pérez, J. C.; Alvarez-Delgado, C.; Cerbón, M.; Pérez-Torres, I.; Aranda, A.; Chávez, E. Sexual hormones: effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia-reperfusion in adult rats. Gender difference. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132: 135–146; 2012.

Pedraza-Chaverri, J.; Maldonado, P. D.; Medina-Campos, O. N.; Olivares-Corichi, I. M.; Granados-Silvestre, M. A.; Hernández-Pando, R.; Ibarra-Rubio, M. E. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 602–611; 2000.

Penna, C.; Mancardi, D.; Rastaldo, R.; Losano, G.; Pagliari, P. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc. Res.* 75: 168–177; 2007.

Penna, C.; Perrelli, M.-G. G.; Tullio, F.; Moro, F.; Parisella, M. L.; Merlino, A.; Pagliari, P. Post-ischemic early acidosis in cardiac postconditioning modifies the activity of antioxidant enzymes, reduces nitration, and favors protein S-nitrosylation. *Pflugers Arch.* 462: 219–233; 2011.

Penna, C.; Rastaldo, R.; Mancardi, D.; Raimondo, S.; Cappello, S.; Gattullo, D.; Losano, G.; Pagliari, P. 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: 180–189; 2006.

Perman, J. C.; Boström, P.; Lindbom, M.; Lidberg, U.; StÅhlman, M.; Hägg, D.; Lindskog, H.; Scharin Tång, M.; Omerovic, E.; Mattsson Hultén, L.; Jeppsson, A.; Petursson, P.; Herlitz, J.; Olivecrona, G.; Strickland, D. K.; Ekroos, K.; Olofsson, S.-O. O.; Borén, J. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 121: 2625–2640; 2011.

Przyklenk, K.; Maynard, M.; Greiner, D.L.; Whittaker, P. Cardioprotection with postconditioning: loss of efficacy in murine models of type-2 and type-1 diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14(5):781-90. 2011.

Quinlan, C. L.; Costa, A. D.; Costa, C. L.; Pierre, S. V.; Dos Santos, P.; Garlid, K. D. Conditioning the heart induces formation of signalosomes that interact with mitochondria to open mitoKATP channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: H953–H961; 2008.

Radi, R.; Beckman, J.S.; Bush, K.M.; Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 288:481–487. 1991.

Ramanathan, T.; Skinner, H. Coronary blood flow. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 5: 61–64; 2005. Buja LM, Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol.* 2008;17(6):349-74.

Rhee, S. G.; Chang, T.-S. S.; Jeong, W.; Kang, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol. Cells* 29: 539–549; 2010.

Rodríguez-Sinovas, A.; Abad, E.; Sánchez, J. A.; Fernández-Sanz, C.; Inserte, J.; Ruiz-Meana, M.; Albuquerque-Béjar, J. J.; García-Dorado, D. Microtubule stabilization with paclitaxel does not protect against infarction in isolated rat hearts. *Exp. Physiol.* 100: 23–34; 2015.

Santos, C. X.; Anilkumar, N.; Zhang, M.; Brewer, A. C.; Shah, A. M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 50: 777–793; 2011.

Schmidt, M.; Smerup, M.; Konstantinov, I.; Shimizu, M.; Li, J.; Cheung, M.; White, P.; Kristiansen, S.; Sorensen, K.; Dzavik, V.; Redington, A.; Kharbanda, R. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 292: H1883–H1890; 2006.

Schulman, D.; Latchman D.S.; Yellon, D.M. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H181-H1488; 2002.

Schwartz, L. M.; Lagranha, C. J. 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: H1011–8; 2006.

Serviddio, G.; Di Venosa, N.; Federici, A.; D'Agostino, D.; Rollo, T.; Prigigallo, F.; Altomare, E.; Fiore, T.; Vendemiale, G. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *FASEB J.* 19: 354–361; 2005.

Shah, A. M.; Spurgeon, H. A.; Sollott, S. J.; Talo, A.; Lakatta, E. G. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74: 970–978; 1994.

Shen, G.; Hebbbar, V.; Nair, S.; Xu, C.; Li, W.; Lin, W.; Keum, Y.-S. S.; Han, J.; Gallo, M. A.; Kong, A.-N. T. N. 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. *J. Biol. Chem.* 279: 23052–23060; 2004.

Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine.* 30;91(3C):31S-38S. 1991.

Skyschally, A.; Caster, P.; Iliodromitis, E.; Schulz, R.; Kremastinos, D.; Heusch, G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res. Cardiol.* 104: 469–483; 2009.

Somers, S. J.; Lacerda, L.; Opie, L.; Lecour, S. Age, genetic characteristics and number of cycles are critical factors to consider for successful protection of the murine heart with postconditioning. *Physiol Res* 60: 971–974; 2011.

Staat, P.; Rioufol, G.; Piot, C.; Cottin, Y.; Cung, T.; L'Huillier, I.; Aupetit, J.-F.; Bonnefoy, E.; Finet, G.; André-Fouët, X.; Ovize, M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 112: 2143–2148; 2005.

Stearns, S.E; Yellon, D.M. The protective effect of heat stress against reperfusion arrhythmias in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 25(12):1471-81. 1993.

Stone, G.; Martin, J.; de Boer, M.-J.; Margheri, M.; Bramucci, E.; Blankenship, J.; Metzger; Gibbons, R.; Lindsay, B.; Weiner, B.; Lansky, A.; Krucoff, M.; Fahy, M.; Boscardin; Investigators, A.-I. Effect of supersaturated oxygen delivery on infarct size after

percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular interventions* 2: 366–375; 2009.

Sun, Z.; Huang, Z.; Zhang, D. D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS ONE* 4: e6588; 2009.

Takaya, K.; Suzuki, T.; Motohashi, H.; Onodera, K.; Satomi, S.; Kensler, T. W.; Yamamoto, M. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* 53: 817–827; 2012.

Tebay, L. E.; Robertson, H.; Durant, S. T.; Vitale, S. R.; Penning, T. M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Hayes, J. D. 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 Radic. Biol. Med.* ; 2015.

Thimmulappa, R.; Mai, K.; Srisuma, S.; Kensler, T.; Yamamoto, M.; Biswal, S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer research* 62: 5196–5203; 2002.

Thuny, F.; Lairez, O.; Roubille, F.; Mewton, N.; Rioufol, G.; Sportouch, C.; Sanchez, I.; Bergerot, C.; Thibault, H.; Cung, T.; Finet, G.; Argaud, L.; Revel, D.; Derumeaux, G.; Bonnefoy-Cudraz, E.; Elbaz, M.; Piot, C.; Ovize, M.; Croisille, P. Post-conditioning reduces infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 59: 2175–2181; 2012.

Tsai, C.-Y. Y.; Wang, C.-C. C.; Lai, T.-Y. Y.; Tsu, H.-N. N.; Wang, C.-H. H.; Liang, H.-Y. Y.; Kuo, W.-W. W. Antioxidant effects of diallyl trisulfide on high glucose-induced apoptosis are mediated by the PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes. *Int. J. Cardiol.* 168: 1286–1297; 2013.

Tsang, A.; Hausenloy, D. J.; Mocanu, M. M.; Yellon, D. M. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ. Res.* 95: 230–232; 2004.

Tullio, F.; Angotti, C.; Perrelli, M.-G. G.; Penna, C.; Pagliaro, P. Redox balance and cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* 108: 392; 2013.

Ungvari, Z.; Bagi, Z.; Feher, A.; Recchia, F.A.; Sonntag, W.E.; Pearson, K.; de Cabo, R.; Csiszar, A. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299(1):H18-24. 2010.

Vincent, A.; Gahide, G.; Sportouch-Dukhan, C.; Covinhes, A.; Franck-Miclo, A.; Roubille, F.; Barrère, C.; Adda, J.; Dantec, C.; Redt-Clouet, C.; Piot, C.; Nargeot, J.; Barrère-Lemaire, S. Down-regulation of the transcription factor ZAC1 upon pre- and postconditioning protects against I/R injury in the mouse myocardium. *Cardiovasc. Res.* 94: 351–358; 2012.

Vinten-Johansen, J.; Shi, W. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 16: 260–266; 2011.

Wagner, C.; Kloeting, I.; Strasser, R. H.; Weinbrenner, C. Cardioprotection by postconditioning is lost in WOKW rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 52: 430–437; 2008.

Wagner, C.; Tillack, D.; Simonis, G.; Strasser, R.; Weinbrenner, C. Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* 339: 135–147; 2010.

Wang, D.; Wang, Y.; Wan, X.; Yang, C. S.; Zhang, J. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate triggered hepatotoxicity in mice: responses of major antioxidant enzymes and the Nrf2 rescue pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 283: 65–74; 2015.

Wang, N.P.; Pang, X.F.; Zhang, L.H.; Tootle, S.; Harmouche, S.; Zhao, Z.Q. Attenuation of inflammatory response and reduction in infarct size by postconditioning are associated with downregulation of early growth response 1 during reperfusion in rat heart. *Shock.* 41(4):346-354; 2014.

Winterbourn, C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic. Biol. Med.* 80:164-170. 2015.

Winterbourn, C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Meth. Enzymol.* 528: 3–25; 2013.

Winterbourn, C.; Hampton, M. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free radical biology & medicine* 45: 549–561; 2008.

Wu, N.; Zhang, X.; Jia, P.; Jia, D. Hypercholesterolemia abrogates the protective effect of ischemic postconditioning by induction of apoptosis and impairment of activation of reperfusion injury salvage kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 148–153; 2015.

Yang, X.-M. M.; Proctor, J. B.; Cui, L.; Krieg, T.; Downey, J. M.; Cohen, M. V. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44: 1103–1110; 2004.

Yang, X.-M.; Philipp, S.; Downey, J.; Cohen, M. 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 Research in Cardiology* 100: 57–63; 2005.

Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 342(8866):276-277; 1993.

Yellon, D. M.; Baxter, G. F. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc. Med.* 9: 245–249; 1999.

Yong, Q. C.; Lee, S. W.; Foo, C. S.; Neo, K. L.; Chen, X.; Bian, J.-S. S. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: H1330–H1340; 2008.

Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J.; Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619–628; 1996.

Zatta, A. J.; Kin, H.; Lee, G.; Wang, N.; Jiang, R.; Lust, R.; Reeves, J. G.; Mykytenko, J.; Guyton, R. A.; Zhao, Z.-Q. Q.; Vinten-Johansen, J. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc. Res.* 70: 315–324; 2006.

Zhang, X. Q.; Tang, R.; Li, L.; Szucsik, A.; Javan, H.; Saegusa, N.; Spitzer, K. W.; Selzman, C. H. Cardiomyocyte-specific p65 NF- κ B deletion protects the injured heart by preservation of calcium handling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305: H1089–97; 2013.

Zhao, Z.-Q. Q.; Corvera, J. S.; Halkos, M. E.; Kerendi, F.; Wang, N.-P. P.; Guyton, R. A.; Vinten-Johansen, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H579–88; 2003.

Zhao; Yang; Yang; Cheng; Zhao; Zhou; Xu; Wang. Effect of Ischaemic Postconditioning on Recovery of Left Ventricular Contractile Function after Acute Myocardial Infarction. *Journal of International Medical Research* 40; 2012.

Zheng, C.; Liu, S.; Geng, P.; Zhang, H.; Zhang, H.; Tang, A.; Xie, X. Efficacy of edaravone on coronary artery bypass patients with myocardial damage after ischemia and reperfusion: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med* 8: 2205–2211; 2015.

Zhou, C.; Li, H.; Yao, Y.; Li, L. Delayed remote ischemic preconditioning produces an additive cardioprotection to sevoflurane postconditioning through an enhanced heme

oxygenase 1 level partly via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 19(6):558-66. 2014.

Zhu, M.; Fahl, W. E. Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 212–219; 2001.

Zhu, M.; Feng, J.; Lucchinetti, E.; Fischer, G.; Xu, L.; Pedrazzini, T.; Schaub, M. C.; Zaugg, M. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc. Res.* 72: 152–162; 2006.

Zipper, L. M.; Mulcahy, R. T. Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278: 484–492; 2000.

15. Publicaciones Derivadas de este Proyecto

Anexo 1: Buelna-Chontal M, Guevara-Chávez JG, Silva-Palacios A, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J and Zazueta C. Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014(74);145-156.

Anexo 2: Buelna-Chontal M and Zazueta C. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: A double end sword?. *Cell Signaling*. 2013(25);2548-2557.

ANEXO 1



Original Contribution

Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts

Mabel Buelna-Chontal^a, José-Guadalupe Guevara-Chávez^a, Alejandro Silva-Palacios^a, Omar-Noel Medina-Campos^b, José Pedraza-Chaverri^b, Cecilia Zazueta^{a,*}^a Department of Cardiovascular Biomedicine, National Institute of Cardiology I. Ch., Mexico City 14080, DF, Mexico^b Biology Department, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2014

Received in revised form

19 June 2014

Accepted 24 June 2014

Available online 30 June 2014

Keywords:

Postconditioning

ROS

Nrf2

PKC

Cardioprotection

Free radicals

ABSTRACT

Postconditioning (PostC) activates endogenous protective mechanisms that contend against reperfusion injury. Nevertheless, although PostC efficiency in both experimental studies and clinical trials has been demonstrated, a complete picture of the interacting mechanisms, particularly the relationship between kinase signaling and redox maintenance, is still lacking. To unravel such association, in this work we focus on the participation of protein kinase C (PKC) and the transcription factor nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in the cardioprotective response elicited by PostC. PostC was performed in an in vivo rat model by applying three repetitive cycles of ischemia and reperfusion (10 s each), followed by evaluation of heart function and infarct size measurements. PKC activation and Nrf2 phosphorylation were evaluated after 10 min of reperfusion, whereas Nrf2 activity and the content and activities of Nrf2-regulated antioxidant proteins were evaluated after 60 min of reperfusion in PostC hearts. Maintenance of heart function and diminution in infarct size concurred with PKC activation and Nrf2 phosphorylation. PKC inhibition diminished Nrf2 phosphorylation and transcriptional activity in association with diminished levels and activities of Nrf2-regulated antioxidant proteins. In conclusion, this study proposes that the novel pathway PKC/Nrf2 participates in the long-term protective mechanisms induced by PostC application by maintaining the antioxidant defense system.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Oxidative stress is considered one of the main effectors of myocardial dysfunction in ischemia and reperfusion injury [1]. However, a paradigm in cardioprotection is that reactive oxygen species (ROS) may also exert beneficial effects depending on their amount, compartmentalization, and timing of generation [2–4]. Cardioprotective responses in preconditioning and postconditioning (PostC), which depend on ROS and kinase signaling, also include mechanisms that attenuate oxidative stress as part of an integrated response [5]. In this sense, a recent study showed increased levels of superoxide dismutase (SOD) in ischemic PostC [6], whereas hydrogen peroxide diminution and prevention of glutathione (GSH) oxidation have been associated with hypoxic

PostC [7]. Accordingly, we previously described a correlation between cardiac function recovery and oxidative stress reduction, increased Cu/Zn-SOD activity, and maintenance of the GSH:glutathione disulfide (GSSG) ratio [3].

It is widely known that the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) increases gene transcription of antioxidant enzymes under stress conditions. The transcriptional activity of Nrf2 depends on dissociation from its repressor, the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), which sequesters Nrf2 in the cytoplasm, orchestrating its ubiquitination and degradation. The mechanism by which Nrf2 is stabilized and translocated to the nucleus is controversial. On one hand, it has been proposed that chemopreventive agents and ROS react with specific thiol groups, inducing the dissociation of both proteins and leading ultimately to Nrf2 nuclear accumulation [8,9]. On the other, experimental evidence suggests that Nrf2 phosphorylation may release Nrf2 from Keap1 [10–15]. In this regard, results from our group showed that PKC activity increased in correlation with augmented Nrf2 phosphorylation and translocation to the nucleus in hearts from nephrectomized rats treated with curcumin [16]. Even more, while this work was in preparation, the partial involvement of PKC in Nrf2 activation and antioxidant gene expression was reported in an

Abbreviations: PostC, postconditioning; PKC, protein kinase C; Nrf2, nuclear factor E2-related factor 2; ROS, reactive oxygen species; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; γ -GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Q, chelerythrine; LAD, left anterior descending coronary artery; AAR, area at risk; GST, glutathione S-transferase; Cu/Zn-SOD, copper/zinc-superoxide dismutase; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; NBT, nitroblue tetrazolium; LVP, left-ventricular pressure; LVDP, left-ventricular developed pressure

* Corresponding author. Fax: +52 55 5573 0926.

E-mail address: azazueta@yahoo.com (C. Zazueta).

ischemic preconditioning model [17]. Therefore, as oxidative stress containment is paramount to protect against reperfusion damage and as, to our knowledge, the role of Nrf2-mediated antioxidant protein expression in PostC cardioprotection has not been described, the aim of this study was to evaluate the potential contribution of this factor to the PostC myocardium and the role of PKC in its activation.

Material and methods

Chemicals were of reagent or higher grade from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Antibodies, p-Thr mouse mAb 9416 and p-Tyr mouse mAb 9416 were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); Nrf2 (C-20) sc-722, Nrf2 (H-300) sc-13032, GST (FL-241) sc-98560, and Cu/Zn-SOD (FL-154) sc-11407 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); rabbit polyclonal to PKC (phospho-T497) ab59411, rabbit monoclonal (EP1809Y) to Nrf2 (phospho-S40) ab76026, γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) ab41463, histone H1.0 antibody ab11079, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody ab9485 from Abcam (Cambridge, MA, USA); and rabbit polyclonal anti-PKC ϵ (pS729) phospho-specific antibody unconjugated 44-977G from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

An enhanced chemiluminescence detection system was obtained from Merck Millipore Corp. (Bedford, MA, USA); horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Abcam. The PKC inhibitor chelerythrine (Q) was purchased from

Calbiochem (Billerica, MA, USA). The kits used for electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) were from Thermo Scientific (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and for nuclear protein extraction were from Chemicon International (Temecula, CA, USA). This investigation was performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the U.S. National Institutes of Health and approved by the Ethics Committee of the National Institute of Cardiology I. Ch. Experimental work followed the guidelines of the Norma Oficial Mexicana for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and for the disposal of biological residues (NOM-087-ECOL-1995).

Experimental protocols in an in vivo model

Wistar male rats weighing 400 g were injected with sodium pentobarbital (1 U/100 g ip) and heparin (1.7 U/kg ip), and complete lack of pain response was assessed by determining pedal withdrawal reflex. The rats were artificially ventilated through an inserted cannula into the trachea. After lateral thoracotomy, the heart was exposed and the left anterior descending coronary artery (LAD) was occluded with a 6-0 silk suture slip knot, then the knot was released for myocardium reperfusion [18]. Heart electric activity was frequently monitored by electrocardiogram with three electrodes connected to a Sievert program, whereas hemodynamic parameters were evaluated with a pressure-volume catheter (Mikro-Tip; Millar) introduced into the left ventricle and analyzed with PVAN Ultra software.

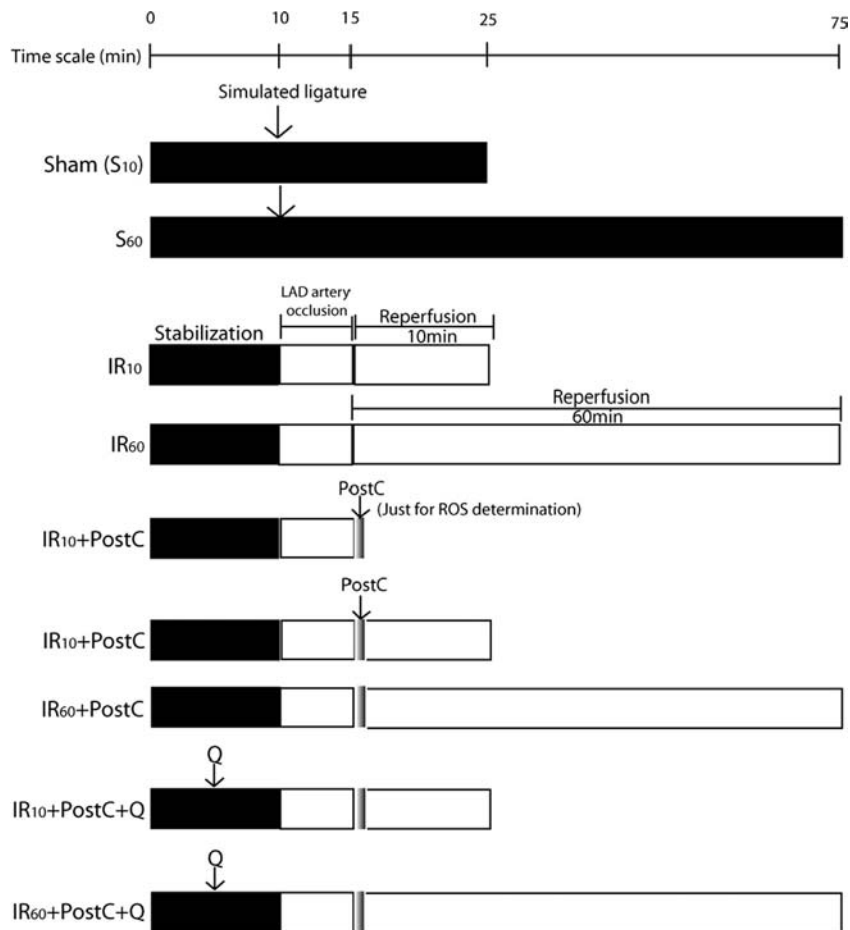


Fig. 1. Experimental protocols. Experimental groups were stabilized for 10 min (black bars). In the sham group, the arrow indicates simulated ligature. The white bar after stabilization indicates left anterior descending artery occlusion for 5 min, followed by 10 or 60 min of reperfusion. The groups IR₁₀ + PostC and IR₆₀ + PostC underwent PostC maneuver (three reperfusion/reocclusion cycles of 10 s each). The groups IR₁₀ + PostC + Q and IR₆₀ + PostC + Q were treated with chelerythrine (Q). The arrow indicates the time at which the inhibitor was administered.

All experimental groups were stabilized for 10 min. The ischemia–reperfusion group underwent 5 min of ischemia by LAD occlusion as previously described [19–22]. Occlusion induced immediate pallor of the left ventricle wall; then reflow was achieved by releasing the ligature for 10 or 60 min (IR₁₀; IR₆₀); reperfusion was confirmed by the color change in the ventricular surface from cyanosis to hyperemia and by the onset of ventricular

tachycardia; the PostC group underwent intermittent blood-flow reestablishment by three cycles of reperfusion/reocclusion (10 s each) after ischemia and before 10 or 60 min of reperfusion (IR₁₀ + PostC; IR₆₀ + PostC). A simulated procedure was performed in sham animals by placing the silk suture around the LAD without occlusion. The ischemia–reperfusion, PostC, and inhibitor administration protocols are outlined in Fig. 1.

Table 1
Postconditioned heart hemodynamics after 10 and 60 min of reperfusion.

Group	Baseline						Reperfusion (10 min)					
	HR (bpm)	LVDP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	dP/dt _{max} (mm Hg/s)	dP/dt _{min} (mm Hg/s)	LVP (mm Hg)	HR (bpm)	LVDP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	dP/dt _{max} (mm Hg/s)	dP/dt _{min} (mm Hg/s)	LVP (mm Hg)
S ₁₀	329 ± 75	109 ± 52	5.9 ± 5.1	6472 ± 2268	−3886 ± 1016	117 ± 23	350 ± 50	96 ± 43	3.8 ± 2.9	5665 ± 832	−4919 ± 843	107 ± 42
IR ₁₀	373 ± 41	100 ± 18	1.47 ± 0.5	6757 ± 1677	−4917 ± 945	106 ± 15	292 ± 67	31 ± 14	4.5 ± 0.9	1067 ± 150	−773 ± 233	42 ± 10
IR ₁₀ + PostC	351 ± 55	102 ± 20	5.2 ± 2.2	6338 ± 2476	−4842 ± 1881	107 ± 16	320 ± 47	92 ± 17*	7.1 ± 4.4	4482 ± 1930*	−4270 ± 1763*	95 ± 15*
Group	Baseline						Reperfusion (60 min)					
	HR (bpm)	LVDP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	dP/dt _{max} (mm Hg/s)	dP/dt _{min} (mm Hg/s)	LVP (mm Hg)	HR (bpm)	LVDP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	dP/dt _{max} (mm Hg/s)	dP/dt _{min} (mm Hg/s)	LVP (mm Hg)
S ₆₀	364 ± 53	103 ± 20	4.1 ± 2.7	6905 ± 2077	−4639 ± 1904	107 ± 23	318 ± 61	113 ± 26	8.1 ± 4.0	6509 ± 3035	−5341 ± 2431	117 ± 25
IR ₆₀	322 ± 75	105 ± 17	3.2 ± 1.6	6820 ± 2369	−4413 ± 2766	107 ± 16	48 ± 26	26 ± 3	2.2 ± 1.7	630 ± 309	−2378 ± 3442	33 ± 9
IR ₆₀ + PostC	349 ± 50	93 ± 10	4.8 ± 2.6	6005 ± 1339	−4043 ± 990	94 ± 4*	281 ± 21*	78 ± 12*	4.1 ± 1.9	4191 ± 1063*	−3421 ± 1420	98 ± 19*

HR, heart rate at the end of the reperfusion period; LVP, left-ventricular pressure; LVDP, left-ventricular developed pressure (systolic pressure − LVEDP); LVEDP, left-ventricular end diastolic pressure; dP/dt_{max}, peak rise in the first derivative of left-ventricular pressure; dP/dt_{min}, peak fall in the first derivative of left-ventricular pressure; S₁₀, sham.

* $P < 0.05$ vs IR.

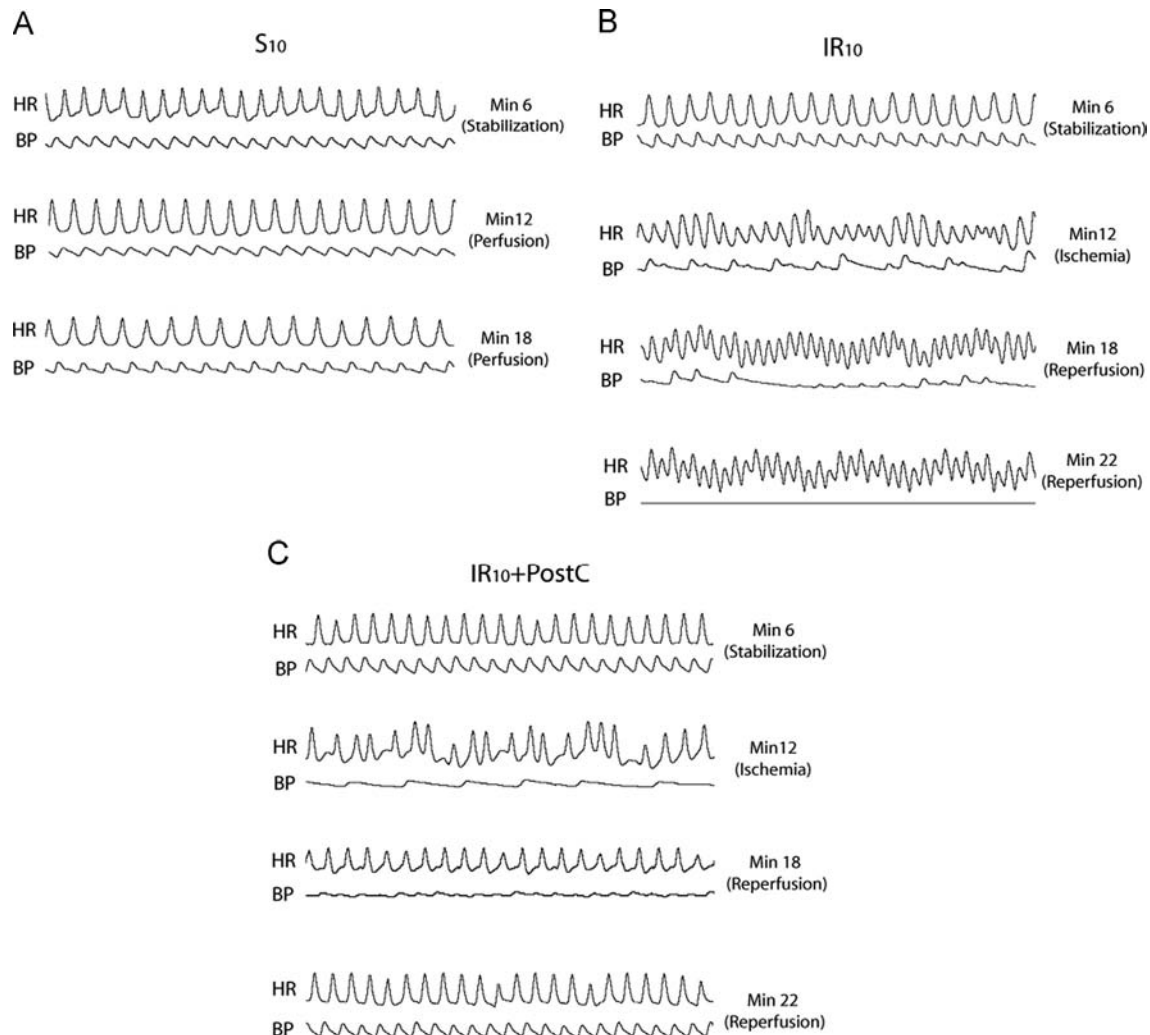


Fig. 2. Cardioprotection in PostC hearts. Electrocardiograms were registered at min 6, 12, and 18 and, in some cases, at min 22 of the entire protocol. It is indicated whether the time corresponds to the stabilization, ischemia, or reperfusion period. HR, heart rate; BP, blood pressure. $n = 6$.

PKC involvement in the activation of Nrf2 in PostC hearts

To evaluate the effect of PKC on Nrf2 activation, various amounts of the specific inhibitor Q were administered to rats during the stabilization period. The doses used in further experiments were 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Q administered iv at minute 5 of the stabilization period. At these doses, PKC was substantially inhibited in rats undergoing only the perfusion protocol (not shown). At the end of the experiments, the hearts were rapidly excised; the left ventricle was obtained and frozen immediately in liquid nitrogen. Later, left ventricles were powdered with a prechilled pestle in a frozen mortar and dissolved in ice-cold buffer containing Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, Igepal 0.5%, NaF 100 mM, pH 8.0, for further experiments.

Infarct size measurement

At the end of the protocols, the LAD was occluded again and 1 ml of 5% Evan's blue was injected into the left ventricle to determine the extent of noncolored risk area [23]. Next, the hearts were excised, frozen at -20°C for 30 min, and sliced into 2-mm transverse sections (six to nine slices). The slices were incubated in 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 20 min with constant agitation. Then, the slices were immersed in a preservative solution of phosphate-buffered saline plus 0.01% sodium azide to enhance the contrast between nonrisk area (blue), area at risk (pale color), and infarcted area (white) [24,25]. Finally the slices were photographed and the infarct size was calculated as a percentage of the area at risk (AAR) in the left ventricle, by using the software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Determination of total ROS

Homogenates from left ventricles in Dulbecco's phosphate-buffered saline containing a cocktail of protease inhibitors were used to measure ROS. The assay was performed by incubating the homogenates with 10 μM 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) for 15 min at 37°C in darkness and with constant agitation. Fluorescence increase was assessed using a Shimadzu RF 5000 spectrofluorophotometer at λ_{ex} 488 nm and λ_{em} 530 nm [26].

Western blot analysis

Total and phosphorylated PKC levels, PKC ϵ levels, as well as γ -GCS, glutathione S-transferase (GST), and Cu/Zn-SOD content were analyzed by immunoblotting with specific antibodies and detected with a chemiluminescence detection system. The ratio between phosphorylated protein and total protein was obtained in the same membrane in all experiments and then the data were compared among groups. Nonphosphorylated protein content was normalized using GAPDH or β -actin.

Nrf2 immunoprecipitation and evaluation of phosphorylation at Ser40 and Thr and Tyr residues

Left-ventricle homogenates (3 mg) were incubated with 4 μg of Nrf2 antibody (C-20) on a rotary mixer for 3 h at 4°C . Then, protein G-Sepharose beads (50 μl of slurry) were added and incubated overnight. Afterward, the samples were centrifuged at 1000 rpm for 30 s at 4°C . The beads were washed with Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, Igepal 0.5%, NaF 100 mM, pH 8.0, and centrifuged again. The supernatant was discarded and the beads

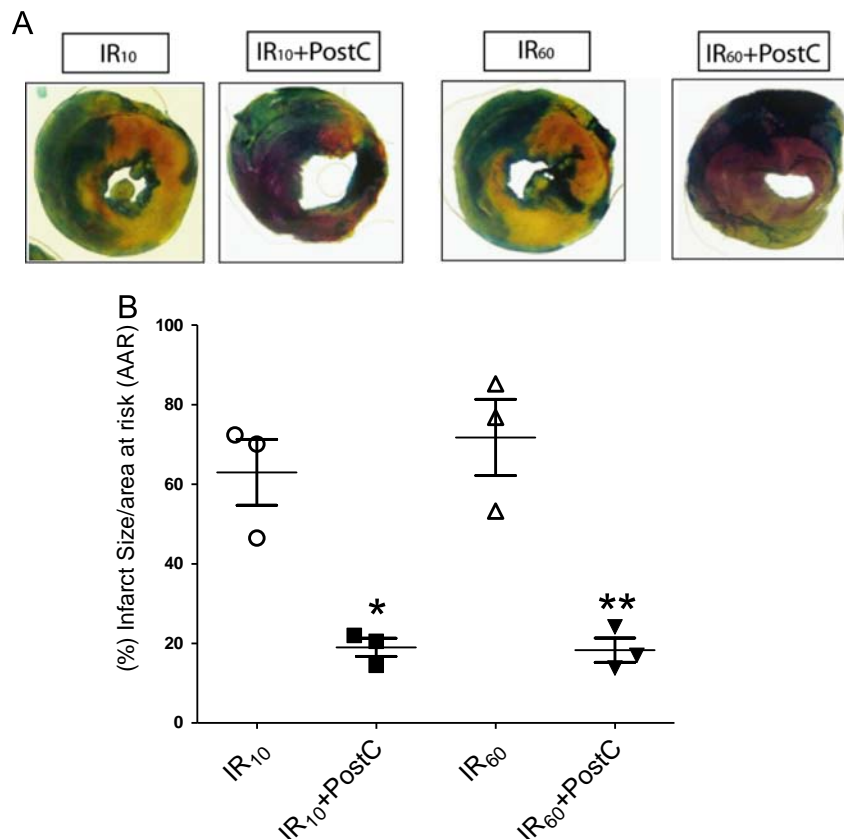


Fig. 3. Infarct size measurement. (A) Representative images of ventricular slices from IR and IR + PostC hearts after 10 and 60 min of reperfusion. Blue stain, viable area; pale stain, area at risk; red stain, noninfarcted area. (B) Infarct size was calculated as a percentage of area at risk of the left ventricle. Data represent the means of three independent experiments \pm SD. * $P < 0.05$ vs IR₁₀; ** $P < 0.05$ vs IR₆₀.

were incubated with $5 \times$ SDS sample buffer to determine Nrf2 phosphorylation at Ser40 and Thr and Tyr residues by immunodetection. The ratio between phosphorylated protein and total protein was obtained in the same membrane in all experiments and then the data were compared among groups.

Electrophoretic mobility-shift assay

Nuclear extracts were obtained according to the manufacturer's instructions using a Nuclear Extraction Kit (Chemicon 2900). Biotinylated oligonucleotide containing the antioxidant response element (ARE) sequence (GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTT) and manufactured by Accesolab S.A. de C.V. (Mexico City, DF, Mexico) was used as the DNA target. Binding reactions were carried out for 60 min at room temperature in the presence of 50 ng/ μ l poly(dI·dC), 0.05% Nonidet P-40, 2.5% glycerol, 10 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 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 achieved by incubating an excess of unlabeled ARE for 30 min before the addition of B-ARE. To identify Nrf2 in the protein–DNA complex, a supershift assay was performed as follows: 10 μ g of nuclear extracts was

incubated overnight with 2.5 μ g of Nrf2 antibody followed by the addition of B-ARE and a further 60 min incubation. Then, the samples were loaded onto native 5% polyacrylamide gel preelectrophoresed for 60 min in Tris–borate–EDTA (TBE) buffer. The complexes were separated at 100 V and transferred onto a positively charged nylon membrane in TBE at 380 mA for 30 min. Transferred DNA was cross-linked to the membrane and chemiluminescence detection was performed using stabilized streptavidin–horseradish peroxidase conjugate.

Glutathione S-transferase activity assay

A reaction mixture containing 0.05 M phosphate buffer (0.91 ml), pH 6.5, 0.1 M GSH (0.02 ml), 0.1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB; 0.05 ml), and left-ventricle homogenate (0.02 ml) was prepared according to Habig et al. [27]. Absorbance increase was measured in a Beckman DU-65 spectrophotometer (Soft-Pac kinetics module) at 340 nm. Reaction was monitored for 3 min and registered every 60 s. GST activity was calculated with an extinction molar coefficient of 9.6 mmol, and the results were expressed as activity

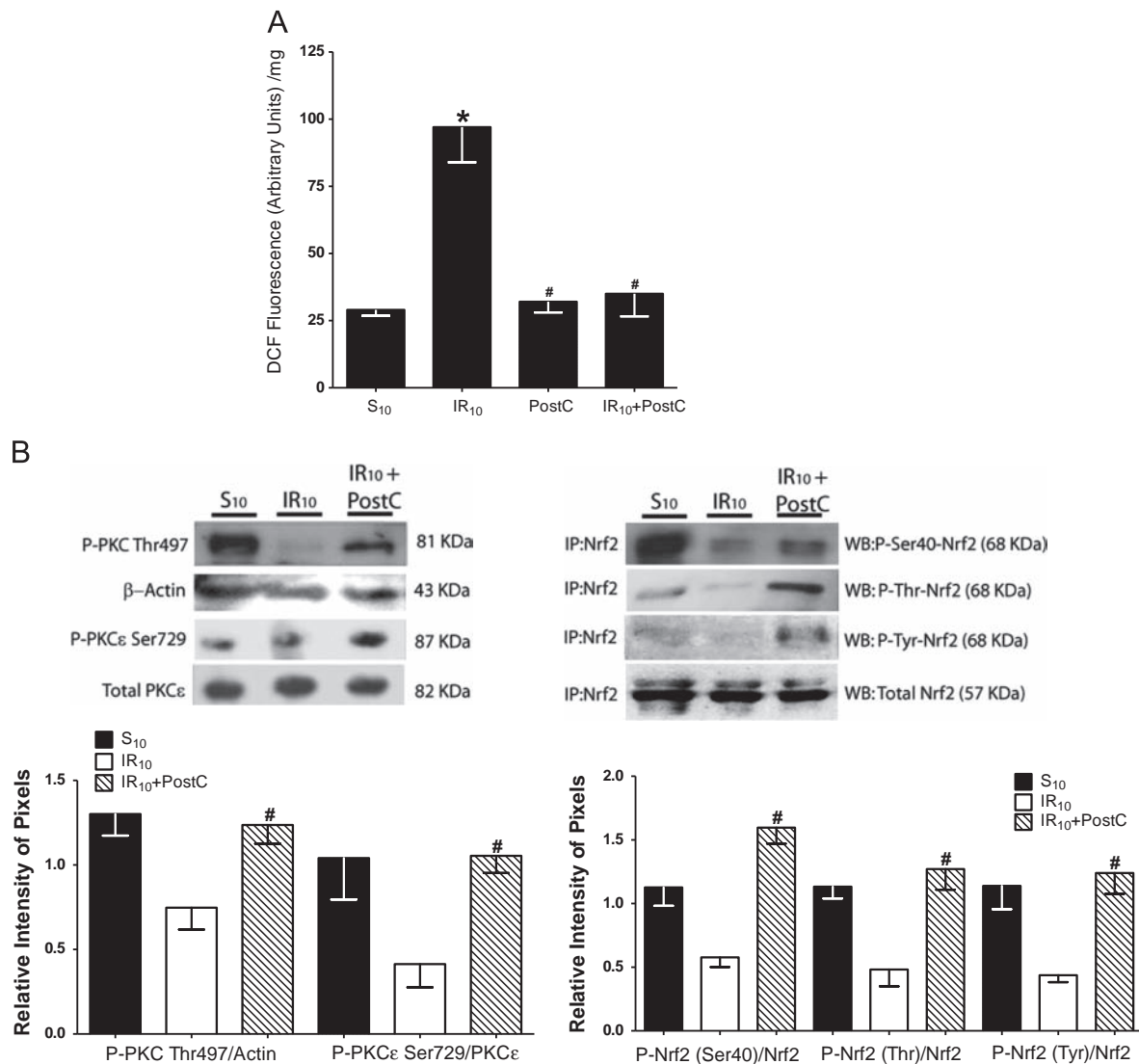


Fig. 4. ROS quantification and evaluation of PKC and Nrf2 phosphorylation. (A) Total ROS determination was performed in sham, IR₁₀, and IR₁₀ + PostC groups. Additionally, ROS measurement was evaluated in hearts subjected only to the PostC protocol. (B) PKC, PKC ϵ , and Nrf2 phosphorylation was determined after 10 min of reperfusion. Phosphorylation of Nrf2 was evaluated in Ser40, threonine, and tyrosine residues by Western blotting (WB) after immunoprecipitation (IP), as described under Material and methods. * $P < 0.05$ vs sham; # $P < 0.05$ vs IR₁₀; $n = \geq 4$ experiments.

units per protein milligram (1 GST unit conjugates 1 μ mol CDNB with GSH per minute at 25 °C, pH 6.5).

Copper/zinc-superoxide dismutase activity assay

SOD activity was determined by measuring its capacity to inhibit nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by superoxide anion, generated with the xanthine/xanthine oxidase system. The reaction mixture

contained 0.6 mM EDTA, 150 μ M NBT, 0.3 mM xanthine, 0.1% bovine serum albumin, and 400 mM sodium carbonate. Cardiac homogenates (1:50 dilution) and 30 μ l of xanthine oxidase (2.5 U/L) were added to 322 μ l of the reaction mixture and then the samples were incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with 132 μ l of 0.8 mM copper chloride and optical density was read at 560 nm. Total SOD activity was first evaluated, and then the assay was performed in the presence of 50 mM potassium cyanide to inhibit Cu/Zn-SOD to

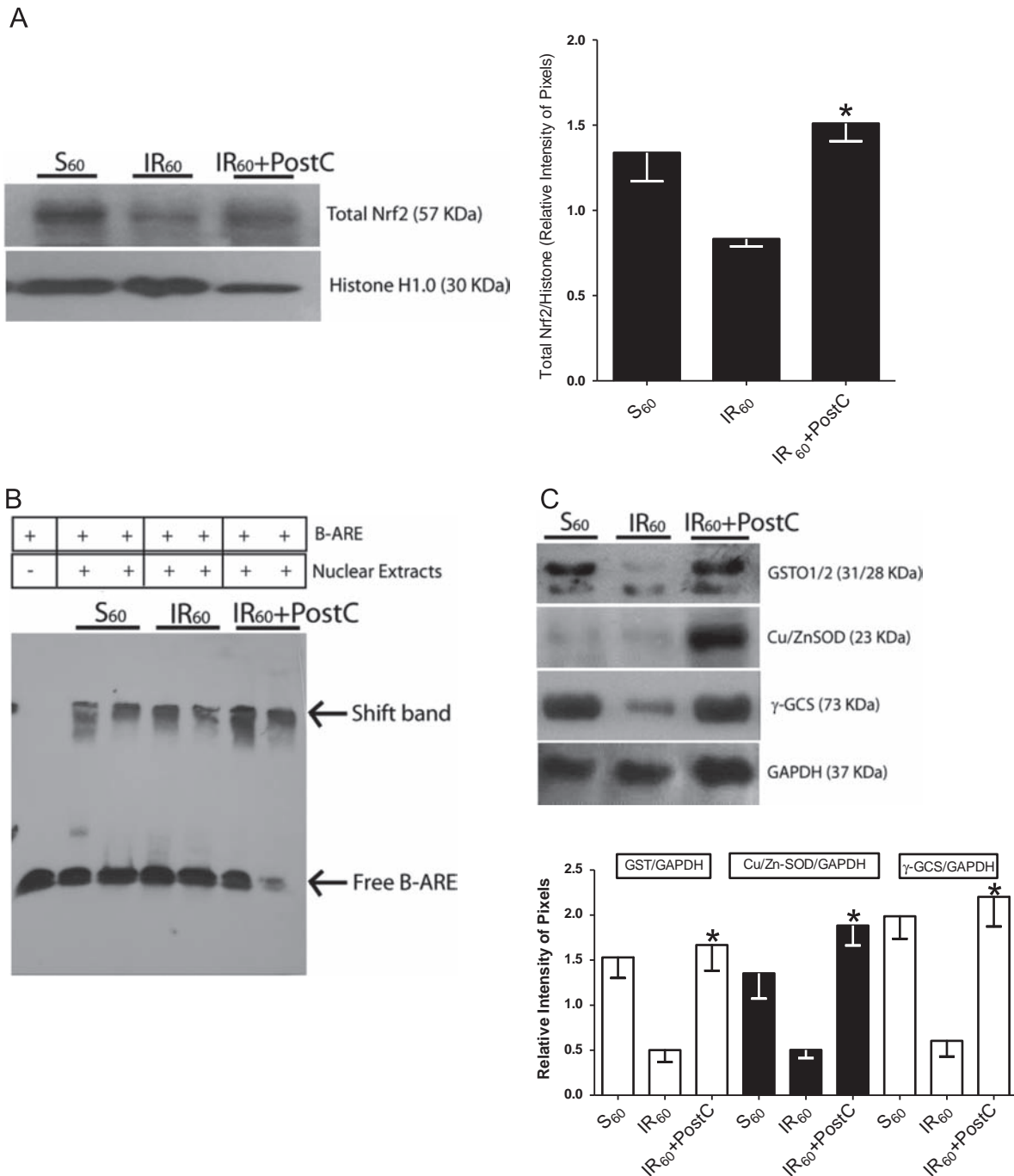


Fig. 5. Nrf2 transcriptional activity and antioxidant enzyme expression in PostC hearts. (A) Nuclear accumulation of Nrf2 in PostC hearts. Nrf2 content was evaluated in nuclear extracts of each experimental group after 60 min of reperfusion, using histone H1.0 as a loading marker. A representative blot is shown and bars represent the mean \pm SD of at least four different experiments. * $P < 0.05$ vs IR₆₀. (B) Nrf2 transcriptional activity was measured by electrophoretic mobility-shift assay at the end of reperfusion (60 min). B-ARE, biotinylated antioxidant response element consensus motif and Nrf2-specific complex formation under the distinct experimental conditions. The first lane shows free B-ARE migration in a nondenaturing gel of polyacrylamide, the following lanes show the shift band of the Nrf2/B-ARE complex formed in the experimental groups. The image is representative of five EMSAs. (C) GST, Cu/Zn-SOD, and γ -GCS protein content was determined after 60 min of reperfusion in heart homogenates; GAPDH was evaluated as a loading marker. * $P < 0.05$ vs IR₆₀; $n = \geq 4$ experiments.

obtain only Mn-SOD activity [28]. Results were expressed as SOD units per milligram protein.

Intracellular reduced glutathione determination

In a reaction catalyzed by GST, the compound monochlorobimane (mCB) forms a stable fluorescent adduct with GSH that can be assessed fluorimetrically. The reaction mix contained Krebs–Henseleit buffer, pH 7.4, 1 mM mCB, 1 U/ml GST, and left-ventricle homogenates. After 30 min of incubation at 37 °C, changes in fluorescence were measured at λ_{ex} 385 nm and λ_{em} 478 nm in a Synergy HT multimode microplate reader. Readings were performed every 15 min and the values obtained were compared with a GSH standard curve [29].

Data analysis

Data represent means \pm SD of the indicated number of experiments from each experimental protocol. Significance ($P < 0.05$) was determined by repeated-measures ANOVA and Bonferroni selected pairs post hoc test (GraphPad Prism version 5.00).

Results

Cardioprotective effect of PostC

Heart function was evaluated by electrocardiographic analysis. Sudden heart rate increase during the first minutes of reperfusion was observed in reperfused hearts (not shown), which accounts for arrhythmia development. Thereafter, heart rate values drastically diminished from minute 10 until the end of reperfusion (Table 1). Early (10 min) and long-term (60 min) reperfusion

concurrent with diminished left-ventricular pressure (LVP) and left-ventricular developed pressure (LVDP) values, along with decreased contractility (dp/dt_{max}) and augmented relaxation (dp/dt_{min}) rates. LVP, LVDP, and dp/dt_{max} were recovered in both IR₁₀ + PostC and IR₆₀ + PostC groups ($P < 0.05$), whereas heart rate was recovered only in the IR₆₀ + PostC group. PostC hearts reperfused for 10 min showed similar dp/dt_{min} values compared to the control group (Table 1). The electrocardiographic images show the incidence of arrhythmias during the first minutes of reperfusion in IR₁₀ animals, compared with the registers obtained in the IR₁₀ + PostC and sham groups (S₁₀) at equivalent times (Fig. 2). It can be observed that IR₁₀ + PostC hearts recovered sinus rhythm at minute 8 of reperfusion. PostC cardioprotection was also evident by evaluation of the infarct size. The area at risk of the left ventricle was similar in all groups; infarct size (relative to AAR) diminished to 19 ± 4 and $18 \pm 5\%$ in IR₁₀ + PostC and IR₆₀ + PostC compared with $63 \pm 14\%$ in IR₁₀ and $72 \pm 16\%$ in IR₆₀, respectively ($P < 0.05$, Fig. 3). PostC-conferred cardioprotection was independent of reperfusion time, indicating that survival signals are activated either during PostC or during the first minutes of reperfusion.

ROS content in PostC hearts

We evaluated ROS levels at the end of the conditioning maneuver in the IR₁₀ + PostC group by measuring DCFH oxidation to DCF. Fluorescence significantly increased in IR₁₀ vs S₁₀ rats (97 ± 23 vs 29 ± 4 arbitrary units (AU), $P < 0.05$) and was totally depressed in the IR₁₀ + PostC group (35 ± 14 AU). ROS values in hearts subjected only to PostC without reperfusion were identical to those measured in the IR₁₀ + PostC group (32 ± 7 ; Fig. 4A), indicating that the antioxidant machinery was fully activated at

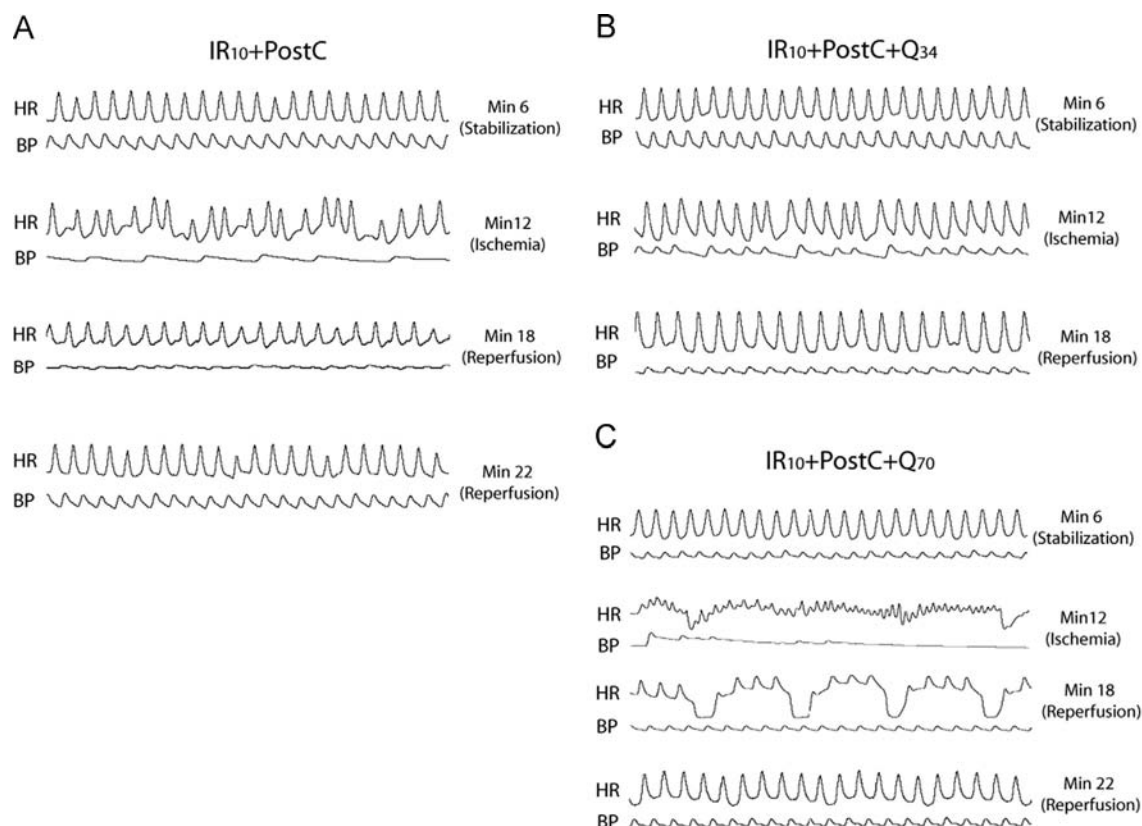


Fig. 6. PKC inhibition in cardiac function in PostC hearts. Electrocardiographic images showing the effect of PKC pathway inhibition in PostC hearts.

the onset of reperfusion and, furthermore, that ROS may act as signaling molecules for upstream kinase activation.

PKC phosphorylation concurs with Nrf2 activity in PostC hearts

Activation of Nrf2, responsible for both constitutive and inducible expression of ARE-regulated genes, was determined after 10 min of reperfusion. Nrf2 showed increased phosphorylation at Ser40 and Thr/Tyr residues in IR₁₀ + PostC compared with IR₁₀ hearts. Such phosphorylation concurred with significant activation of PKC and PKCε in PostC hearts, suggesting that Nrf2 may be a downstream target of kinase activation (Fig. 4B). To evaluate if Nrf2 phosphorylation induces its transcriptional activity, we determined Nrf2 nuclear accumulation after 60 min of reperfusion. We found a significant increase in Nrf2 levels in isolated nucleus in the IR₆₀ + PostC group in comparison with the IR₆₀ group (Fig. 5A). Additionally, we performed EMSAs to confirm Nrf2

transcriptional activation in PostC hearts. Nrf2 binding to ARE was augmented at 60 min of reperfusion in PostC hearts (IR₆₀ + PostC) compared with the signal obtained in IR₆₀ hearts and even in sham hearts (Fig. 5B). No differences were found among the groups at 10 min of reperfusion (not shown). Next, we measured the levels of three enzymes regulated by the Nrf2 pathway. GST, Cu/Zn-SOD, and γ-GCS content increased significantly in IR₆₀ + PostC compared with the IR₆₀ group (Fig. 5C). These results strongly suggest that the cardioprotective response elicited by PostC includes Nrf2 transcriptional activity.

Relevance of PKC signaling in the PostC-conferred cardioprotective effect

Once we established a correlative link between PKC and Nrf2 phosphorylation after PostC, we evaluated the effect of PKC inhibition on the cardioprotective response at 10 min of reperfusion and its

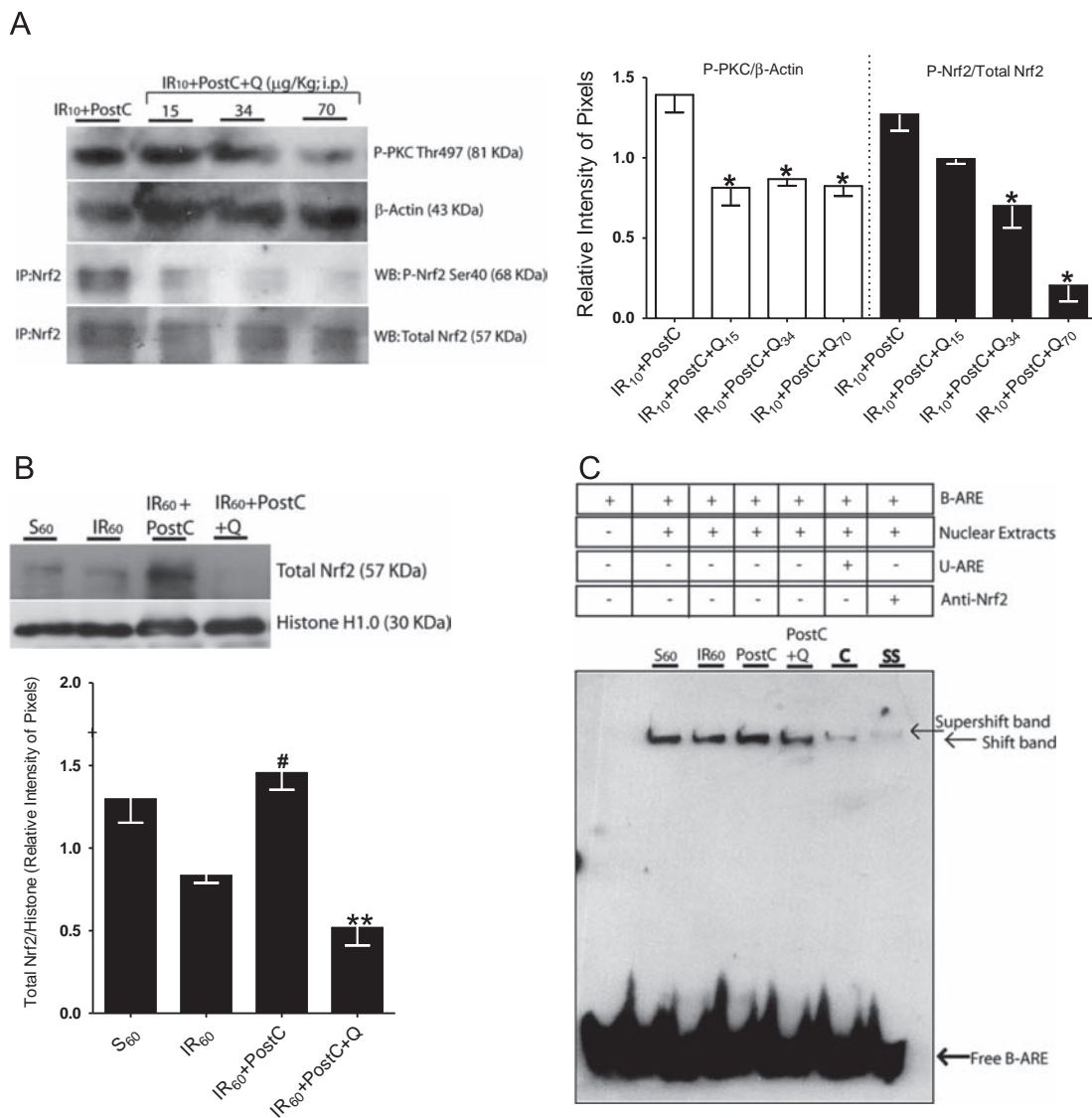


Fig. 7. Nrf2 transcriptional activity is modulated by PKC in PostC hearts. (A) Effect of PKC inhibition on Nrf2 phosphorylation at Ser40 after 10 min of reperfusion. Phosphorylation of Nrf2 was evaluated on Ser40 by Western blotting (WB) after immunoprecipitation (IP), as described under Material and methods. Representative results of at least three similar experiments are shown. **P* < 0.05 vs IR₁₀ + PostC. (B) Representative blot showing Nrf2 content in the nuclear extracts after 60 min of reperfusion; histone H1.0 was used as a loading marker. Bars indicate the mean ± SEM of at least four independent experiments. #*P* < 0.05 vs IR₆₀; ***P* < 0.05 vs IR₆₀ + PostC. (C) Electrophoretic mobility-shift assay in PostC hearts treated with Q at 60 min of reperfusion. The first lane shows free B-ARE migration and the next lanes (2–5) the mobility-shift band observed in the experimental groups. Lane 6 shows the competition assay performed in the presence of an excess of unlabeled-ARE (U-ARE). Finally, lane 7 shows the supershift assay (SS), which was performed by incubating the nuclear extract with Nrf2 antibody (anti-Nrf2) followed by the addition of B-ARE. The image is representative of at least four independent EMSAs.

Table 2
Effect of chelerythrine (Q) on PostC heart hemodynamics after 10 and 60 min of reperfusion.

Group	Baseline			10 min reperfusion (IR ₁₀)			60 min reperfusion (IR ₆₀)		
	HR (bpm)	LVP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)	HR (bpm)	LVP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)	HR (bpm)	LVP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)
IR	373 ± 41	106 ± 15	100 ± 18	292 ± 67	42 ± 10	31 ± 14	48 ± 26	33 ± 9	26 ± 3
IR + PostC	351 ± 55	107 ± 16	102 ± 20	320 ± 47	95 ± 15*	92 ± 17*	281 ± 21*	98 ± 19*	78 ± 12*
IR + PostC + Q ₃₄	375 ± 50	102 ± 11	114 ± 21	321 ± 90	80 ± 12*	87 ± 16*	283 ± 94*	69 ± 12*	81 ± 18*
IR + PostC + Q ₇₀	334 ± 19	96 ± 3	91 ± 11	280 ± 26	76 ± 39	85 ± 30*	272 ± 34*	57 ± 32**	62 ± 32*

HR, heart rate at the end of the reperfusion period; LVP, left-ventricular pressure; LVDP, left-ventricular developed pressure (systolic pressure – LVEDP); LVEDP, left-ventricular end diastolic pressure; Q₃₄, chelerythrine 34 µg/kg; Q₇₀, chelerythrine 70 µg/kg.

* $P < 0.05$ vs IR.

** $P < 0.05$ vs IR₆₀ + PostC.

impact on Nrf2 transcriptional activity. First we analyzed heart function in the presence of the PKC inhibitor Q, administered at various doses during the stabilization period. At the highest dose (70 µg/kg), LVP diminution was observed in the IR₆₀ + PostC + Q group (57 ± 32 vs 98 ± 19 mm Hg in IR₆₀ + PostC, $P < 0.05$; Table 2). The electrocardiographic registers in PostC hearts from animals treated with Q recovered rhythm and frequency after temporal instability, dependent on Q concentration. Blood pressure values were partially maintained at both concentrations (Fig. 6).

Role of PKC in phosphorylation and transcriptional activity of Nrf2 in PostC hearts

Next, we evaluated p-Nrf2 content in Q-treated hearts to elucidate the PKC contribution to Nrf2 activation after 10 min of reperfusion. Maximal PKC inhibition (70 µg/kg) correlated with a significant reduction in Nrf2 phosphorylation at Ser40 (Fig. 7A); therefore we used this concentration for subsequent experiments at longer reperfusion times. PKC inhibition correlated not only with diminution of Nrf2 phosphorylation at Ser40, but also with a significant abolition of Nrf2 nuclear accumulation (Fig. 7B) and with diminution of Nrf2 binding to the ARE consensus element (Fig. 7C). The competition assay demonstrated the specificity of Nrf2 binding to the ARE sequence and the supershift assay confirmed the presence of Nrf2 in the DNA–protein complex. These results indicate that Nrf2 phosphorylation and transcriptional activity are regulated by PKC in PostC hearts.

Role of PKC in the levels of Nrf2-regulated antioxidant proteins

Finally, we evaluated the effects of PKC inhibition on the content and activity of the Nrf2-encoded proteins GST, Cu/Zn-SOD, and γ-GCS in PostC hearts. PostC hearts treated with Q (IR₆₀ + PostC + Q) showed a diminution in GST, Cu/Zn-SOD, and γ-GCS content (Fig. 8A; $P < 0.05$ vs IR₆₀ + PostC). GST and Cu/Zn-SOD activities were determined by direct enzymatic assays, whereas GSH measurement was used to evaluate γ-GCS activity, as GSH is a rate-limiting reaction product catalyzed mainly by this enzyme. Changes in protein content were reflected in the activities of GST (Fig. 8B) and Cu/Zn-SOD (Fig. 8C), as well as in GSH levels (Fig. 8D). The enzyme activities were augmented in the IR₆₀ + PostC group and diminished drastically after Q treatment (IR₆₀ + PostC + Q). The above experiments indicate that PKC activates Nrf2 signaling, enhancing the antioxidant machinery, which may participate in the cardioprotective response activated by PostC.

Discussion

To date most experimental studies have focused in the development of protective strategies to decrease myocardial infarct size

in ischemic heart. Some myocardial infarct reducing agents have shown promising outcomes in experimental studies, but have failed in clinical trials, e.g., eniporide, an inhibitor of the Na⁺/H⁺ antiporter [30,31]; nicorandil, a potassium ATP channel opener [32,33]; and caldaret (MCC-135), an intracellular calcium modulator [34,35]. Conversely, cyclosporine [36,37], intravenous adenosine infusions [38,39], atrial natriuretic peptide [40], supersaturated oxygen therapy [41], and, specifically, the mechanical maneuver of PostC have been successfully applied in both experimental studies and clinical trials [42–44].

It is noteworthy that endogenous cardioprotection conferred by PostC has additional benefits in comparison with other strategies, because it involves the activation of heart innate mechanisms for its own protection. Several studies have concluded that acute cardioprotective mechanisms include autacoids that trigger signaling pathways, which include reperfusion injury salvage kinases [45] and PKC cascades [46]. It is also known that low ROS levels are required to promote the survival response, but that it is equally relevant to diminish ROS-derived stress [47]. Therefore, we hypothesized that precise and coordinated regulation of the antioxidant machinery may be sustained by PostC. Physiologically, normal ROS levels are maintained by the isoforms of SOD, which transform superoxide anion to hydrogen peroxide; by catalase and glutathione peroxidases, which reduce hydrogen peroxide to water; and by glutathione reductase, which converts GSSG back to GSH [3].

Nrf2 is a ubiquitous transcription factor that regulates transcription of several antioxidant proteins, including Mn-SOD, heme oxygenase-1, Cu/Zn-SOD, GST, and γ-GCS. There is increasing evidence that Nrf2-mediated gene expression confers protection against myocardial infarction and ischemia–reperfusion injury, but little is known about the activity of antioxidant enzymes and its regulation during PostC. In this sense, a recent report by Huang et al. [48] showed that the activation of the Nrf2–ARE pathway is responsible for the induction of antioxidative enzymes in a cellular model of hypoxic preconditioning. They showed increased Nrf2 nuclear translocation and higher interaction of Nrf2 with ARE sequences in the promoter regions of heme oxygenase-1 and Mn-SOD. In agreement with such results, we observed a significant increase in Nrf2 phosphorylation at Ser40, Thr, and Tyr residues after 10 min of reperfusion in PostC hearts (IR₁₀ + PostC) in comparison with IR₁₀ hearts. Also, we observed augmented Nrf2 binding to the ARE sequence, which correlated with increased expression and activity of Cu/Zn-SOD, GST, and γ-GCS in PostC at the longer reperfusion time (IR₆₀ + PostC), suggesting that newly synthesized antioxidant proteins may contribute to long-lasting protective effects in PostC hearts.

The mechanism by which Nrf2 is accumulated into the nucleus remains controversial. Whereas it is thought that the modification of critical cysteine residues in Keap1 promotes conformational changes, leading to Nrf2 release, it has also been reported that

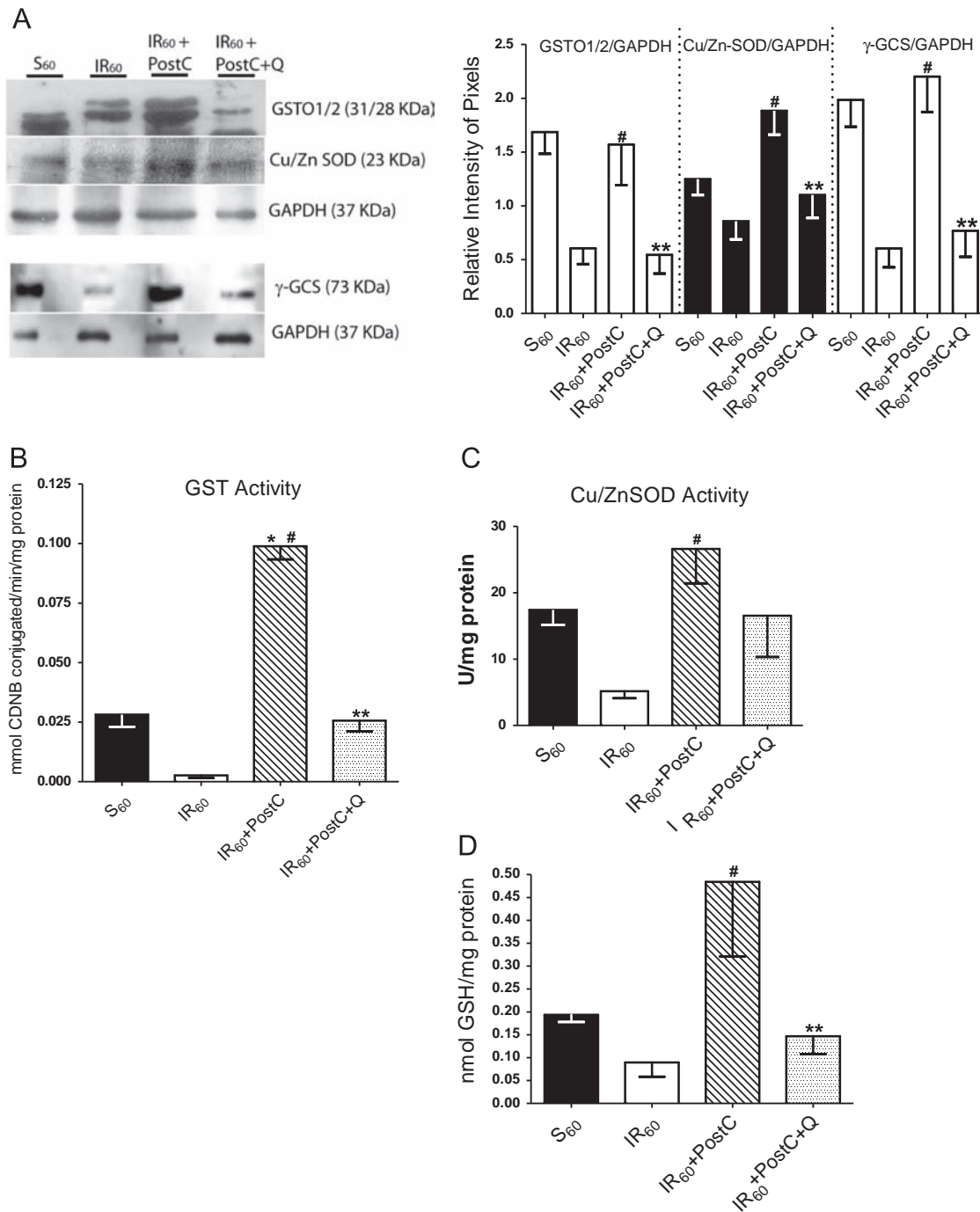


Fig. 8. Effect of PKC inhibition on the content and activity of enzymes regulated by Nrf2 pathway. (A) GST, Cu/Zn-SOD, and γ -GCS content in hearts subjected to 60 min of reperfusion. Data represent the mean \pm SEM of at least four independent experiments. # P < 0.05 vs IR₆₀; ** P < 0.05 vs IR₆₀ + PostC. (B) GST activity, (C) Cu/Zn-SOD activity, and (D) GSH content in PostC treated with Q. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. * P < 0.05 vs S₆₀; # P < 0.05 vs IR₆₀; ** P < 0.05 vs IR₆₀ + PostC.

Nrf2 phosphorylation at Ser40 is crucial for nuclear accumulation and transcriptional activity [49,50]. In this report we found a significant increase in both PKC and PKC ϵ phosphorylation in association with a significant increase in Nrf2 phosphorylation at Ser40, Thr, and Tyr residues in PostC hearts. Several reports indicate that PKC activation is related to redox signaling in PostC, whereas PKC ϵ has been mainly related to mitochondrial protection by means of preventing the opening of the mitochondrial permeability transition pore [51,52]. However, there is also evidence that Nrf2 phosphorylation may induce its release from Keap1, leading

to ARE-mediated antioxidant response. To get insight into this possibility, we inhibited PKC activity with Q (IR₆₀ + PostC + Q), which promoted a significant decrease in Nrf2 phosphorylation and transcriptional activity. Furthermore, Q treatment induced an important diminution in GST, Cu/Zn-SOD, and γ -GCS content and activity.

From the above-mentioned results it could be suggested that the PKC/Nrf2 pathway may contribute to the so-called second window or delayed protection in PostC, as it involves de novo synthesis of antioxidant proteins.

Conclusions

We conclude that PKC/Nrf2 pathway activation is critical for long-term maintenance of cardioprotection against reperfusion injury, through a significant increase in the antioxidant defense system.

Acknowledgments

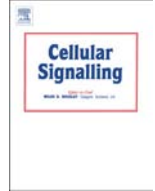
We thank Dr. Natalia Pavón for sharing her expertise knowledge in the ischemia–reperfusion in vivo model. This article is part of the doctoral thesis of Mabel Buelna Chontal in the Biomedical Sciences Doctoral Program, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico. Mabel Buelna-Chontal received a scholarship from the National Council of Science and Technology (CONACYT) and this work was partially supported by Grant 177527 to C.Z. from CONACYT, Mexico.

References

- [1] Ichihara, S. The pathological roles of environmental and redox stresses in cardiovascular diseases. *Environ. Health Prev. Med.* **18**:177–184; 2013.
- [2] Wang, Z. -H.; Chen, Y. -X.; Zhang, C. -M.; Wu, L.; Yu, Z.; Cai, X. -L.; Guan, Y.; Zhou, Z. -N.; Yang, H. -T. Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**:H1695–H1705; 2011.
- [3] Arreguín, F.; García, N.; Hernández-Reséndiz, S.; Buelna-Chontal, M.; Correa, F.; Olín-Sandoval, V.; Medina-Campos, O.; Pedraza-Chaverri, J.; Zazueta, C. Attenuation of oxidant damage in the postconditioned heart involves non-enzymatic response and partial catalytic protection. *Exp. Physiol.* **97**:1119–1130; 2012.
- [4] Penna, C.; Perrelli, M. -G.; Pagliaro, P. Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications. *Antioxid. Redox Signaling* **18**:556–599; 2013.
- [5] Kin, H.; Wang, N. P.; Mykytenko, J.; Reeves, J.; Deneve, J.; Jiang, R.; Zatta, A. J.; Guyton, R. A.; Vinten-Johansen, J.; Zhao, Z. Q. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock* **29**:761–768; 2008.
- [6] Penna, C.; Perrelli, M. G.; Tullio, F.; Moro, F.; Parisella, M. L.; Merlino, A.; Pagliaro, P. Post-ischemic early acidosis in cardiac postconditioning modifies the activity of antioxidant enzymes, reduces nitration, and favors protein S-nitrosylation. *Pflugers Arch.* **462**:219–233; 2011.
- [7] Serviddio, G.; Di Venosa, N.; Federici, A.; D'Agostino, D.; Rollo, T.; Prigigallo, F.; Altomare, E.; Fiore, T.; Vendemiale, G. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia–reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion. *FASEB J.* **19**:354–361; 2005.
- [8] Jaiswal, A. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:1199–1207; 2004.
- [9] He, X.; Ma, Q. NRF2 cysteine residues are critical for oxidant/electrophile-sensing, Kelch-like ECH-associated protein-1-dependent ubiquitination–proteasomal degradation, and transcription activation. *Mol. Pharmacol.* **76**:1265–1278; 2009.
- [10] Cullinan, S.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvaisis, E.; Kaufman, R.; Diehl, J. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **23**:7198–7209; 2003.
- [11] Bloom, D.; Jaiswal, A. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from Irf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**:44675–44682; 2003.
- [12] Martin, D.; Rojo, A.; Salinas, M.; Diaz, R.; Gallardo, G.; Alam, J.; De Galarreta, C.; Cuadrado, A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* **279**:8919–8929; 2004.
- [13] Choi, J.; Lee, J.; Lee, J.; Kim, S. -H.; Kim, J.; Kim, S. PG201 downregulates the production of nitrite by upregulating heme oxygenase-1 expression through the control of phosphatidylinositol 3-kinase and NF-E2-related factor 2. *Nitric Oxide* **33C**:42–55; 2013.
- [14] Tsai, C. -Y.; Wang, C. -C.; Lai, T. -Y.; Tsu, H. -N.; Wang, C. -H.; Liang, H. -Y.; Kuo, W. -W. Antioxidant effects of diallyltrisulfide on high glucose-induced apoptosis are mediated by the PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes. *Int. J. Cardiol.* **168**:1286–1297; 2013.
- [15] Nitire, S.; Jain, A.; Jaiswal, A. Antioxidant-induced modification of Irf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J. Cell Sci.* **122**:4452–4464; 2009.
- [16] Correa, F.; Buelna-Chontal, M.; Hernández-Reséndiz, S.; García-Niño, W. R.; J Roldán, F.; Soto, V.; Silva-Palacios, A.; Amador, A.; Pedraza-Chaverri, J.; Tapia, E.; Zazueta, C. Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radic. Biol. Med.* **61C**:119–129; 2013.
- [17] Zhang, X.; Xiao, Z.; Yao, J.; Zhao, G.; Fa, X.; Niu, J. Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart. *Mol. Cell. Biochem.* **372**:169–179; 2013.
- [18] Pavón, N.; Martínez-Abundis, E.; Hernández, L.; Gallardo-Pérez, J. C.; Alvarez-Delgado, C.; Cerbón, M.; Pérez-Torres, I.; Aranda, A.; Chávez, E. Sexual hormones: effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia–reperfusion in adult rats. Gender difference. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **132**:135–146; 2012.
- [19] Manning, A. S.; Coltart, D. J.; Hearse, D. J. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat: effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ. Res.* **55**:545–548; 1984.
- [20] Hagar, J. M.; Hale, S. L.; Kloner, R. A. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ. Res.* **68**:61–68; 1991.
- [21] Parra, E.; Cruz, D.; García, G.; Zazueta, C.; Correa, F.; García, N.; Chávez, E. Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **269**:19–26; 2005.
- [22] García-Rivas G de, J.; Carvajal, K.; Correa, F.; Zazueta, C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **149**:829–837; 2006.
- [23] Boengler, K.; Hilfiker-Kleiner, D.; Heusch, G.; Schulz, R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* **105**:771–785; 2010.
- [24] Ertracht, O.; Liani, E.; Bachner-Hinzenon, N.; Bar-Am, O.; Frolov, L.; Ovcharenko, E.; Awad, H.; Blum, S.; Barac, Y.; Amit, T.; Adam, D.; Youdim, M.; Binah, O. The cardioprotective efficacy of TVP1022 in a rat model of ischaemia/reperfusion. *Br. J. Pharmacol.* **163**:755–769; 2011.
- [25] Buelna-Chontal, M.; Correa, F.; Hernández-Reséndiz, S.; Zazueta, C.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of α -mangostin on cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidative stress. *J. Med. Food* **14**:1370–1374; 2011.
- [26] Rhee, S. G.; Chang, T. -S.; Jeong, W.; Kang, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol. Cells* **29**:539–549; 2010.
- [27] Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**:7130–7139; 1974.
- [28] Pedraza-Chaverri, J.; Maldonado, P. D.; Medina-Campos, O. N.; Olivares-Corichi, I. M.; Granados-Silvestre, M. A.; Hernández-Pando, R.; Ibarra-Rubio, M. E. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:602–611; 2000.
- [29] García-Niño, W. R.; Tapia, E.; Zazueta, C.; Zatarain-Barrón, Z. L.; Hernández-Pando, R.; Vega-García, C. C.; Pedraza-Chaverri, J. Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decreased respiratory complex I activity, and membrane permeability transition pore opening. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**:424692; 2013.
- [30] Aldakkak, M.; Stowe, D.; Heisner, J.; Spence, M.; Camara, A. Enhanced Na^+/H^+ exchange during ischemia and reperfusion impairs mitochondrial bioenergetics and myocardial function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **52**:236–244; 2008.
- [31] Avkiran, M.; Cook, A.; Cuello, F. Targeting Na^+/H^+ exchanger regulation for cardiac protection: a RSKy approach? *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**:133–140; 2008.
- [32] Lee, T. -M.; Lin, C. -C.; Lien, H. -Y.; Chen, C. -C. KATP channel agonists preserve connexin43 protein in infarcted rats by a protein kinase C-dependent pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **16**:776–788; 2012.
- [33] Kim, S. -J.; Kim, W.; Woo, J. -S.; Ha, S. -J.; Kang, W. -Y.; Hwang, S. -H.; Kang, D. -G.; Lee, S. -U.; Cho, S. -K.; Im, J. -S.; Kim, W. Effect of myocardial protection of intracoronary adenosine and nicorandil injection in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *Int. J. Cardiol.* **158**:88–92; 2012.
- [34] Kawasumi, H.; Satoh, N.; Kitada, Y. Caldaret, an intracellular Ca^{2+} handling modulator, limits infarct size of reperfused canine heart. *J. Pharmacol. Sci.* **103**:222–233; 2007.
- [35] Jang, I. -K.; Weissman, N.; Picard, M.; Zile, M.; Pettigrew, V.; Shen, S.; Tatsuno, J.; Hibberd, M.; Tzivoni, D.; Wackers, F. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of intravenous MCC-135 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction: evaluation of MCC-135 for left ventricular salvage in acute myocardial infarction (EVOLVE). *Am. Heart J.* **155**(113):e1–e8; 2008.
- [36] Newton, N.; Croisille, P.; Gahide, G.; Rioufol, G.; Bonnefoy, E.; Sanchez, I.; Cung, T.; Sportouch, C.; Angoulvant, D.; Finet, G.; André-Fouët, X.; Derumeaux, G.; Piot, C.; Vernhet, H.; Revel, D.; Ovize, M. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**:1200–1255; 2010.
- [37] Gomez, L.; Li, B.; Newton, N.; Sanchez, I.; Piot, C.; Elbaz, M.; Ovize, M. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc. Res.* **83**:226–233; 2009.
- [38] Niccoli, G.; Rigattieri, S.; De Vita, M.; Valgimigli, M.; Corvo, P.; Fabbicchi, F.; Romagnoli, E.; De Caterina, A.; La Torre, G.; Lo Schiavo, P.; Tarantino, F.; Ferrari, R.; Tomai, F.; Olivares, P.; Cosentino, N.; D'Amario, D.; Leone, A.; Porto, I.; Burzotta, F.; Trani, C.; Crea, F. Open-label, randomized, placebo-controlled evaluation of intracoronary adenosine or nitroprusside after thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention for

- the prevention of microvascular obstruction in acute myocardial infarction: the REOPEN-AMI study (Intracoronary Nitroprusside versus Adenosine in Acute Myocardial Infarction). *JACC Cardiovasc. Interventions* **6**:580–589; 2013.
- [39] Grygier, M.; Araszkiwicz, A.; Lesiak, M.; Janus, M.; Kowal, J.; Skorupski, W.; Pyda, M.; Mitkowski, P.; Grajek, S. New method of intracoronary adenosine injection to prevent microvascular reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* **107**:1131–1135; 2011.
- [40] Kitakaze, M.; Asakura, M.; Kim, J.; Shintani, Y.; Asanuma, H.; Hamasaki, T.; Seguchi, O.; Myoishi, M.; Minamino, T.; Ohara, T.; Nagai, Y.; Nanto, S.; Watanabe, K.; Fukuzawa, S.; Hirayama, A.; Nakamura, N.; Kimura, K.; Fujii, K.; Ishihara, M.; Saito, Y.; Tomoike, H.; Kitamura, S., J-WIND Investigators. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet* **370**:1483–1493; 2007.
- [41] Stone, G.; Martin, J.; de Boer, M. -J.; Margheri, M.; Bramucci, E.; Blankenship, J.; Metzger, D.; Gibbons, R.; Lindsay, B.; Weiner, B.; Lansky, A.; Krucoff, M.; Fahy, M.; Boscardin, W. Effect of supersaturated oxygen delivery on infarct size after percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. *Circ. Cardiovasc. Interventions* **2**:366–375; 2009.
- [42] Zhao, C. M.; Yang, X. J.; Yang, J. H.; Cheng, X. J.; Zhao, X.; Zhou, B. Y.; Xu, S. D.; Wang, H. F. Effect of ischaemic postconditioning on recovery of left ventricular contractile function after acute myocardial infarction. *J. Int. Med. Res.* **40**:1082–1088; 2012.
- [43] Thuny, F.; Lairez, O.; Roubille, F.; Mewton, N.; Rioufol, G.; Sportouch, C.; Sanchez, I.; Bergerot, C.; Thibault, C.; Cung, T.; Finet, G.; Argaud, L.; Revel, D.; Derumeaux, G.; Bonnefoy-Cudraz, E.; Elbaz, M.; Piot, C.; Ovize, M.; Croisille, P. Post-conditioning reduces infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**:2175–2181; 2012.
- [44] Staat, P.; Rioufol, G.; Piot, C.; Cottin, Y.; Cung, T.; L'Huillier, I.; Aupetit, J. -F.; Bonnefoy, E.; Finet, G.; André-Fouët, X.; Ovize, M. Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**:2143–2148; 2005.
- [45] Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* **70**:240–253; 2006.
- [46] Zatta, A. J.; Kin, H.; Lee, G.; Wang, N.; Jiang, R.; Lust, R.; Reeves, J. G.; Mykytenko, J.; Guyton, R. A.; Zhao, Z. Q.; Vinten-Johansen. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc. Res.* **70**:315–324; 2006.
- [47] Penna, C.; Mancardi, D.; Rastaldo, R.; Pagliaro, P. Cardioprotection: a radical view. Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**:781–793; 2009.
- [48] Huang, X. S.; Chen, H. P.; Yu, H. H.; Yan, Y. F.; Liao, Z. P.; Huang, Q. R. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for hypoxic preconditioning-mediated delayed cardioprotection. *Mol. Cell. Biochem.* **385**:33–41; 2014.
- [49] Niture, S. K.; Khatry, R.; Jaiswal, A. K. Regulation of Nrf2—an update. *Free Radic. Biol. Med.* **66**:36–44; 2014.
- [50] Bryan, H.; Olayanju, A.; Goldring, C.; Park, B. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* **85**:705–717; 2013.
- [51] Costa, A. D.; Garlid, K. D. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC epsilon, ROS, and MPT. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**:H874–H882; 2008.
- [52] Costa, A. D.; Garlid, K. D.; West, I. C.; Lincoln, T. M.; Downey, J. M.; Cohen, M. V.; Critz, S. D. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ. Res.* **97**:329–336; 2005.

ANEXO 2



Review

Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: A double end sword?

Mabel Buelna-Chontal, Cecilia Zazueta*

Cardiovascular Biomedicine Department, National Institute of Cardiology, I. Ch., 14080 Mexico, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2013

Accepted 23 August 2013

Available online 29 August 2013

Keywords:

Redox signaling

Redox-sensitive transcription factors

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

(Nrf2)

Nuclear factor κ B (NF- κ B)

ABSTRACT

Moderate concentrations of reactive oxygen species (ROS) are produced by diverse sources under physiological conditions. At such low levels, these molecules may act as upstream mediators of relevant signaling pathways; however an increase in their concentration with respect to the antioxidant system activity, changes their redox signaling function into a deleterious role. Thus, cell health depends, at least in part, on redox balance. This review includes global aspects of oxygen chemistry, ROS generation, antioxidant system, and redox signaling. It is also focused on the description of two relevant redox-sensitive transcription factors: nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), which may be a potential target to confer cell protection, and nuclear factor κ B (NF- κ B), which is involved in deleterious effects in the cell. Finally, recent findings on the interplay between both factors for the development of different pathologies are discussed.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2549
1.1. ROS generation and defense mechanisms in the cell	2549
1.1.1. The mitochondrial electron transport chain	2549
1.1.2. Xanthine oxidoreductase and xanthine oxidase	2549
1.1.3. Nitric oxide synthase	2549
1.1.4. Cytochrome P450s	2549
1.1.5. NOX enzymes	2550
2. Defense mechanism against ROS	2550
3. Contribution of redox imbalance in diseases	2550
4. Redox regulation in signal transduction (redox switching)	2550
4.1. The NF- κ B signaling pathway	2551
4.2. Nrf2/ARE signaling pathway	2551
5. Evidence of crosstalk between Nrf2 and NF- κ B under pathological conditions	2553
5.1. Inflammation	2553
5.2. Atherosclerosis	2554
5.3. Diabetes	2554
5.4. Liver injury	2554
5.5. Acute lung injury	2554
5.6. Kidney disease	2554
5.7. Brain injury	2554
5.8. Cancer	2554
6. Putative crosstalk mechanisms between Nrf2 and NF- κ B	2554
7. Concluding remarks	2555
Acknowledgments	2555
References	2555

* Corresponding author at: Cardiovascular Biomedicine Department, National Institute of Cardiology, Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, México 14080, D.F., México. Tel.: +52 55 5573 2911x1465.

E-mail address: azazuetam@yahoo.com (C. Zazueta).

1. Introduction

1.1. ROS generation and defense mechanisms in the cell

1.1.1. The mitochondrial electron transport chain

The generation of reactive oxygen species (ROS) is an unavoidable consequence of life in an aerobic environment. Mitochondrial energy metabolism is recognized as the most quantitatively important ROS source in most eukaryotic cell types, as the mitochondrial electron transport chain leaks electrons even under physiologic conditions [1]. Molecular oxygen (O_2), the final acceptor of electrons in the mitochondrial electron transport chain, accepts four electrons in a one-step reaction producing H_2O . However, it is also capable to accept one electron at a time, generating partially reduced molecules from O_2 (reactive oxygen species), which include superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Fig. 1).

Many steps in the respiratory chain involve single-electron reactions, favoring monovalent reduction of O_2 . The highly reducing intramitochondrial environment promotes electron leak mainly through the respiratory complexes I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) and III (ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase; cytochrome bc_1 complex) giving rise to ROS production [2,3]. Moreover, in different pathologies, ROS production through one-electron reduction reactions is enhanced by mitochondrial dysfunction [4]. Besides the electron transport chain in mitochondria, other enzymes such as xanthine oxidase, nitric oxide synthase, and cytochrome P450s produce reactive species as a metabolic byproduct, whereas nicotinamide–adenine–dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases produce ROS as primary function.

1.1.2. Xanthine oxidoreductase and xanthine oxidase

Xanthine oxidoreductase catalyzes the sequential hydroxylation of hypoxanthine to yield xanthine and uric acid. The metabolism of this enzyme exists in two forms that differ primarily in their substrate specificity. The dehydrogenase form, named xanthine dehydrogenase (XDH), produces uric acid using NAD^+ as an electron acceptor; the other form of the enzyme is xanthine oxidase (XO), which transfers electrons to O_2 yielding $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and uric acid [5–7].

It has been described that the enhancement of calcium (Ca^{2+}) influx into the cell, in ischemic tissue, leads to the activation of several enzymes, including a protease that cleaves a 15–20 kDa fragment of each XDH subunit, changing the metabolism of the enzyme to its oxidase form, which in turn transfers electrons to O_2 to produce ROS [8]. Accordingly, benefits after XO inhibition have been observed in different pathological conditions. Oxypurinol, a XO inhibitor, augmented endothelium-dependent vascular relaxation in hyperlipidemia by reducing $O_2^{\cdot-}$ production [9] and, after long-term treatment, improved the cardiac contractile force in post-ischemic heart failure in a mouse model [10]. In addition, clinical trials inhibiting XO have been developed recently, leading to improved mechanics and better clinical outcomes in patients with congestive heart failure. In the “La Plata study” for example, the inhibition of XO-dependent $O_2^{\cdot-}$ production was related to the

improvement of myocardial function and ejection fraction in patients with congestive heart failure [11].

1.1.3. Nitric oxide synthase

Nitric oxide (NO) was first described as the endothelium-derived relaxing factor [12,13]; since then, numerous reports have established its role as an ubiquitous key signaling molecule implicated in neurotransmission [14–16], vasodilation [17–19] and regulation of the cardiovascular, nervous and immune systems. NO regulates vascular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells [20]. It enhances the binding of iron regulatory protein to iron-response elements within regions of mRNAs, which are involved in iron metabolism [21–23], and also produces post-translational modifications of proteins such as ADP ribosylation [24,25,23].

NO is produced by three isoforms of NO synthase (NOS; EC 1.14.13.39), these are: endothelial NOS (eNOS also known as NOSIII), inducible NOS (iNOS also known as NOSII), and neuronal NOS (nNOS also known as NOSI). All isoforms metabolize L-arginine to citrulline using O_2 and reduced cofactors as NADPH, flavin adenine dinucleotide (FAD), and (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; all NOS bind calmodulin and contain heme as a prosthetic group [26,23].

eNOS and nNOS activities are regulated by Ca^{2+} via calmodulin interaction. On the contrary, because iNOS has calmodulin bound permanently, its function depends merely on its expression level [26]. iNOS generates large amounts of NO that have cytostatic effects on parasitic target cells, contributing to the pathophysiology of inflammatory diseases and septic shock [27]. In aging or diseases such as inflammation, hypertension, and atherosclerosis, increased $O_2^{\cdot-}$ reacts with NO yielding peroxynitrite ($ONOO^-$), a highly reactive and toxic molecule that induces tyrosine nitration, cysteine–thiol oxidation, lipid peroxidation, and oxidation of methionine sulfur-groups [27,28]. Targeting nitrosative stress may represent a therapeutic potential in pathologies like Alzheimer’s disease or cancer. In this sense, a recent report shows that epigallocatechin-3-gallate attenuated β -amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death in microglia cells [29]; whereas aspirin, at pharmacologically relevant concentrations, inhibited $ONOO^-$ -mediated DNA damage and $\cdot OH$ formation [30].

1.1.4. Cytochrome P450s

Cytochrome P450s (CYPs) are a family of heme-thiolate enzymes implicated in the metabolism of a large number of endogenous and exogenous compounds. Multiple CYPs have been characterized in mammalian species. Five CYPs (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4) are responsible for approximately 95% of CYP-mediated drug metabolism, catalyzing hydroxylation, epoxidation, and N-, S- and O-demethylation of drugs, leading to second-phase metabolism and excretion from the body [31,32]. CYPs transform xenobiotics into inert polar metabolites, or transform such molecules into reactive species capable of initiating DNA, protein, or lipid damage. The catalytic mechanism for CYPs involves reductive activation of O_2 in a process in which several steps

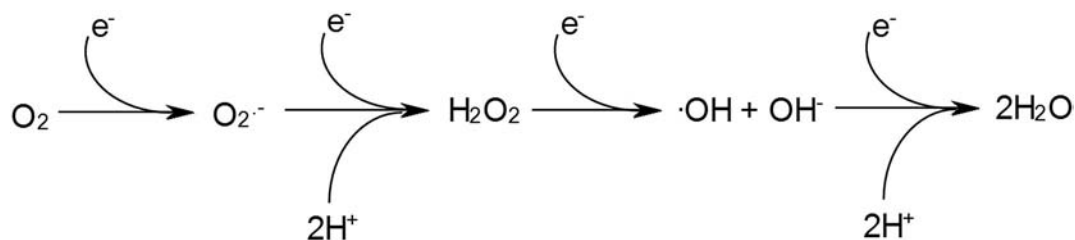


Fig. 1. ROS production by one-electron O_2 reduction in the mitochondrial electron transport chain.

are one-electron transfers. Besides, CYPs' active site may generate small amounts of O_2^- and H_2O_2 as by-products of the normal P450 catalytic core [33].

1.1.5. NOX enzymes

NAD(P)H oxidases (NOX) are a family of membrane-associated enzymes that generate ROS as their primary function and contribute to the physiological regulation of vascular function [34]. NOX catalyze one-electron reduction of O_2 using NADPH as an electron donor [35]. Originally, NOX were considered to be expressed only in phagocytic cells and thereby involved in host defense and innate immunity; however, from studies based on homologs of the catalytic subunit gp91phox, it is now evident that there is at least a functionally active family of NOX in non-phagocytic cells [36]. The expression of these enzymes in various tissues supports the notion that ROS generation, rather than being a singular trait of phagocytes, is a general characteristic of many and perhaps all cell tissues. The prototypical gp91phox-containing phagocytic NAD(P)H oxidase (NOX2) consists of five subunits, these are p47phox ('phox' stands for phagocytic oxidase), p67phox, p40phox, p22phox, and the catalytic subunit gp91phox [34]. NOX enzymes are divided into three groups, according to the presence of specific domains besides the gp91phox domain. NOX1, NOX3, and NOX4 are nearly identical in both structure and size to gp91phox, three of them contain the electron transfer centers that are necessary to transfer electrons from NAD(P)H to O_2 and yield O_2^- [37]. NOX5 is built on the basic structure of gp91phox, plus an amino-terminal calmodulin-like domain that contains four binding sites for Ca^{2+} . The third group, the dual oxidase (DUOX) enzymes, further extends the NOX5 structures, as it contains the Ca^{2+} binding domain and an amino-terminal peroxidase-homology domain. Thus, DUOX enzymes seem to be designed to both generate ROS and catalyze them through their own peroxidase domain [37].

2. Defense mechanism against ROS

In order to maintain redox balance in the cell, specialized antioxidant systems have been developed. Main antioxidant systems include superoxide dismutases (SOD), which are localized in different subcellular locations and catalyze the dismutation of O_2^- to produce H_2O_2 . Catalase reduces H_2O_2 to H_2O , whereas several thioredoxin isoforms, through cysteine thiol–disulfide exchange, reduce oxidized proteins. Glutathione peroxidases catalyze lipid hydroperoxide reduction to alcohols and reduce H_2O_2 to H_2O ; glutathione synthetase and γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) are responsible for the synthesis of the main cellular antioxidant, reduced glutathione (GSH). Besides GSH, other non-enzymatic antioxidants, some of them of dietary origin, scavenge lipid peroxy radicals inhibiting the chain reaction of lipid peroxidation. Ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoids, uric acid, and polyphenols have a participation in the antioxidant defense system as ROS scavengers [38]. Also, peroxiredoxins have a role in the control of cytokine-induced peroxide levels, affecting signal transduction.

We described so far, the main sources of ROS generation; it is clear that these reactive molecules are ubiquitously present in the cell and have important roles in both physiological and pathological processes. In the next part of this review, we will describe the meaning of redox balance maintenance in disease development and the role of key transcription factors: nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and nuclear factor κ B (NF- κ B) as elements responsible for the cellular antioxidant response in this context.

3. Contribution of redox imbalance in diseases

When ROS concentration increases (Fig. 1), either due to cellular ROS overproduction or because the antioxidant system is compromised, ROS can act indiscriminately by reacting and damaging biomolecules, including DNA, RNA, cholesterol, lipids, carbohydrates, proteins, and antioxidants [39], or by stimulating inflammatory processes, activating

growth factors, proteolytic enzymes, lipoxygenases, cyclooxygenases, oncogenes, and transcription factors [40], a scenario that includes aging and the development of a wide array of diseases such as cancer, diabetes, neurodegenerative disorders, and cardiovascular diseases [41–45].

Peroxidation of membrane lipids can be harmful due to alteration of the biological properties of the membrane, leading to inactivation of membrane-bound receptors or enzymes that, in turn, may impair normal cellular function. In this sense, reduction in Na^+/K^+ -ATPase activity correlates with the elevation of lipid peroxidation products in pre-hypertensive patients, suggesting that ROS underlies some of the pathophysiological aspects linked to this condition [46]. Intriguingly, increased lipid peroxidation is associated with high glucose levels, but not with hypertension in type-2 diabetic patients [47]. In addition, high levels of endogenous reactive aldehydes have been found in tissues and spinal fluid from patients and transgenic animals with neurodegenerative diseases [48,49]; besides, it has been proposed that increased ROS levels promote the onset of premature senescence and malignant transformation [50].

The efficiency of the antioxidant system to prevent oxidant-induced pathologies has been tested in various cell types and animal models. In a recent study, Maiellaro-Rafferty et al. [51] showed that catalase overexpression in mice prevents aneurysmal mechanical remodeling, by reducing local H_2O_2 production associated with early alterations of the aortic wall. Another study indicated that SOD-1 (CuZn-SOD) deficiency increases O_2^- production, accelerating loss of cone's function in a mouse model of retinitis pigmentosa. Surprisingly, SOD1 overexpression led to augmented oxidative stress, a situation that was prevented by co-expressing SOD1 with glutathione peroxidase-4 (Gpx-4), which indicates that effective contention against oxidative stress may include the expression of complementary detoxifying systems that eliminate harmful intermediate products in the same cellular compartment [52].

The opposite situation is illustrated by experiments in which the antioxidant response is downregulated. For example, SOD2 (MnSOD)–/– mice have a very short lifespan and develop dilated cardiomyopathy within 10 days after birth [53], whereas SOD1 downregulation is related with Alzheimer's disease progression in mice, causing cognitive impairment [54]. These are only a sample of multiple pathologies in which oxidative stress is the underlying cause; thus, a paramount task for the cell is to maintain its redox status in order to contend against ROS deleterious effects (Fig. 2).

4. Redox regulation in signal transduction (redox switching)

Redox signaling is complex and often involves multiple mechanistic responses. In this regard, it has been suggested that ROS localization in specific subcellular compartments leads to selective oxidative modifications (redox switching) of different molecules, regulating their function. For example, protein tyrosine phosphatases are inactivated by oxidation, which causes increased levels of phosphorylated substrates and overall activation of kinase pathways. ROS can modify redox-sensitive amino acids in many proteins, including phosphatases, kinases, ion channels, and transcription factors, e.g. apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1), protein kinase C (PKC), Nrf2, and others [55]. Cysteine and methionine residues are more susceptible to oxidation than other amino acids due to their high reactivity [39]. If cysteine is a catalytic residue in the active domain, its oxidation would affect directly the enzyme activity; but even if cysteine is not directly involved in the catalysis, the oxidation could allow changes in the local conformation and modify protein activity.

Cysteine oxidation can affect protein–protein interactions, protein degradation and induce post-translational modifications [56]. Cysteine can be oxidized to several products such as disulfide ($-S-S-$), sulfenate ($-SO^-$), sulfinate ($-SO_2^-$), sulfonate ($-SO_3^-$), or sulfonamide ($-SNR$). Disulfide conjugation with GSH produces glutathionylation, whereas

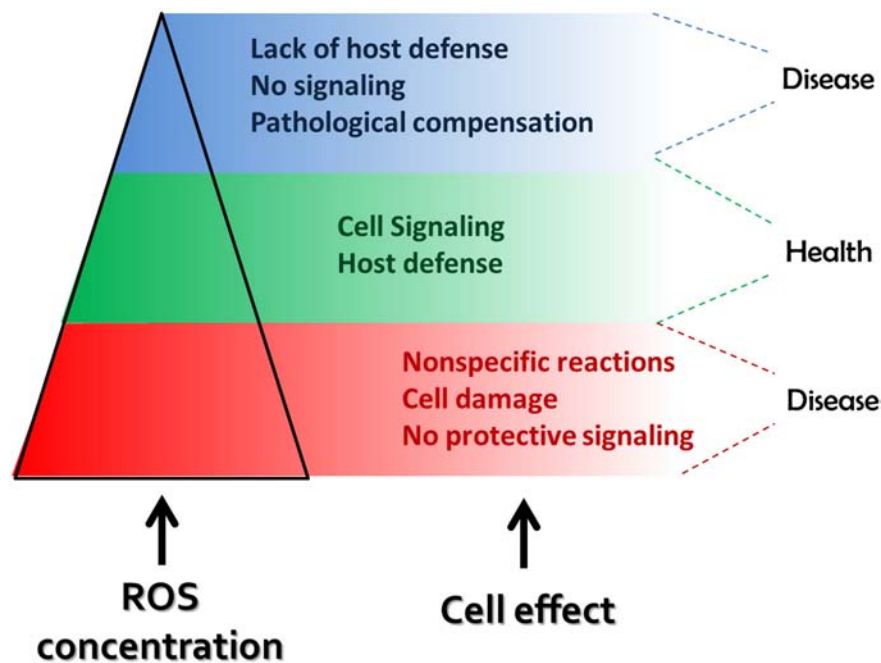


Fig. 2. The diagram shows the contrasting effects of ROS concentration in cell function.

reactive nitrogen species cause S-nitrosylation. Such alterations have emerged as important post-translational modifications that activate or deactivate the function of many proteins [56]. Examples of proteins that contain at least one redox-sensitive thiol(ate), regulated by redox signaling [57], are protein kinases, protein tyrosine phosphatases (PTP) [58], lipid phosphatases [59], caspases [60], Ca^{2+} and K^+ channels [61–63], and transcription factors such as activator protein-1 (AP-1), NF- κ B and Nrf2 [64,65].

The last part of this revision is focused on Nrf2 and NF- κ B redox signaling regulation, controlling opposite cellular processes that lead to either cytoprotection or pathological development. Recent findings related to the complex interaction between both pathways, through crosstalk mechanisms, under pathological conditions will also be discussed.

4.1. The NF- κ B signaling pathway

The nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is a widely expressed, pleiotropic transcription factor that has been implicated in many cellular processes including inflammation. Abnormal activation of NF- κ B occurs in many pathological conditions, such as allergic, auto-inflammatory diseases, and malignances [66]. NF- κ B is composed of homo- and hetero-dimeric complexes of Rel protein family members: p65 (relA), rel, relB, p50, and p52, which are regulated by eight I κ B family members [67]. NF- κ B is activated by both canonical and non-canonical pathways. In the canonical pathway, NF- κ B is activated by multiple pro-inflammatory receptors, such as toll-like receptor (TLR) ligands, T cell receptor, B cell receptor, and tumor necrosis factor (TNF) receptor [66,68,69]. The canonical pathway is mediated by I κ B kinase (IKK) complex, composed by two structurally related catalytic subunits IKK α , and IKK β , and a non-catalytic regulatory subunit: NF- κ B essential modulator (NEMO also known as IKK γ). Once activated, the regulatory subunit phosphorylates specific Ser residues within I κ Bs, leading to protein ubiquitination and subsequent proteasome-processing and NF- κ B release. Hence, the transcription factor accumulates within the nucleus, inducing the transcription of target genes involved in cellular processes such as inflammatory responses [67,70].

Although a variety of structurally diverse receptors initiate the canonical NF- κ B pathway, only a subset of TNF superfamily receptors

appears to activate the non-canonical NF- κ B pathway. The non-canonical pathway is activated by a subset of TNF superfamily receptors, including lymphotoxin- β receptor (LT- β R), CD40, the B-cell activating factor (BAFF), the tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), and the receptor activator of NF- κ B (RANK) [66,69]. This last pathway is involved in several biological phenomena including B lymphocyte survival, lymphoid organogenesis [71], and osteoclastogenesis [72]. The non-canonical pathway results in proteosomal degradation of cellular inhibitors of apoptosis (cIAPs) and sequestration of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) with simultaneous stabilization of NF- κ B inducing kinase (NIK) protein levels [73]. NIK is a Ser/Thr kinase also known as MAP3K14 that phosphorylates the regulatory kinase IKK α at Ser 176, which induces phosphorylation and ubiquitin-dependent processing of inactive NF- κ B2 (p100), precursor of the active p52 form. Then, p52 forms a heterodimeric transcription factor with RelB that is accumulated in the nucleus to regulate expression of its target genes [66,69,73] (Fig. 3).

4.2. Nrf2/ARE signaling pathway

Whereas the redox-sensitive transcription factor NF- κ B plays an important role in the coordinated expression of inflammatory genes, the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), a ubiquitously expressed transcription factor, is responsible for both constitutive and inducible expression of antioxidant response element (ARE)-regulated genes such as NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) [74–78], heme oxygenase-1 (HO-1) [79,75,80,81], glutathione S-transferase (GST), isoenzymes α 4, μ 2, μ 3 [74,75,82], μ 1, μ 5, α 1, α 2, α 3, and π 1 [76,82,77], microsomal GST (MGST1 and MGST2), epoxide hydrolase [74–76], UDP-glucuronosyltransferase, aldoketoreductase 1B7 and 1B8 [76], aldehyde dehydrogenase 1A1, 1A7 [76,77], glutamate-cysteine ligase (also known as γ -glutamylcysteine synthetase, i.e. γ -GCS) modifier subunit (GCLM) and catalytic subunit (GCLC), glutathione reductase [79,75,76], SOD1 [83], and glutathione peroxidase [76].

Nrf2 also regulates multiple transcription factors, such as aryl hydrocarbon receptor (AHR), v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian; MAFG), retinoid X receptor, alpha (RXRA), v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian; MYC), CCAAT/

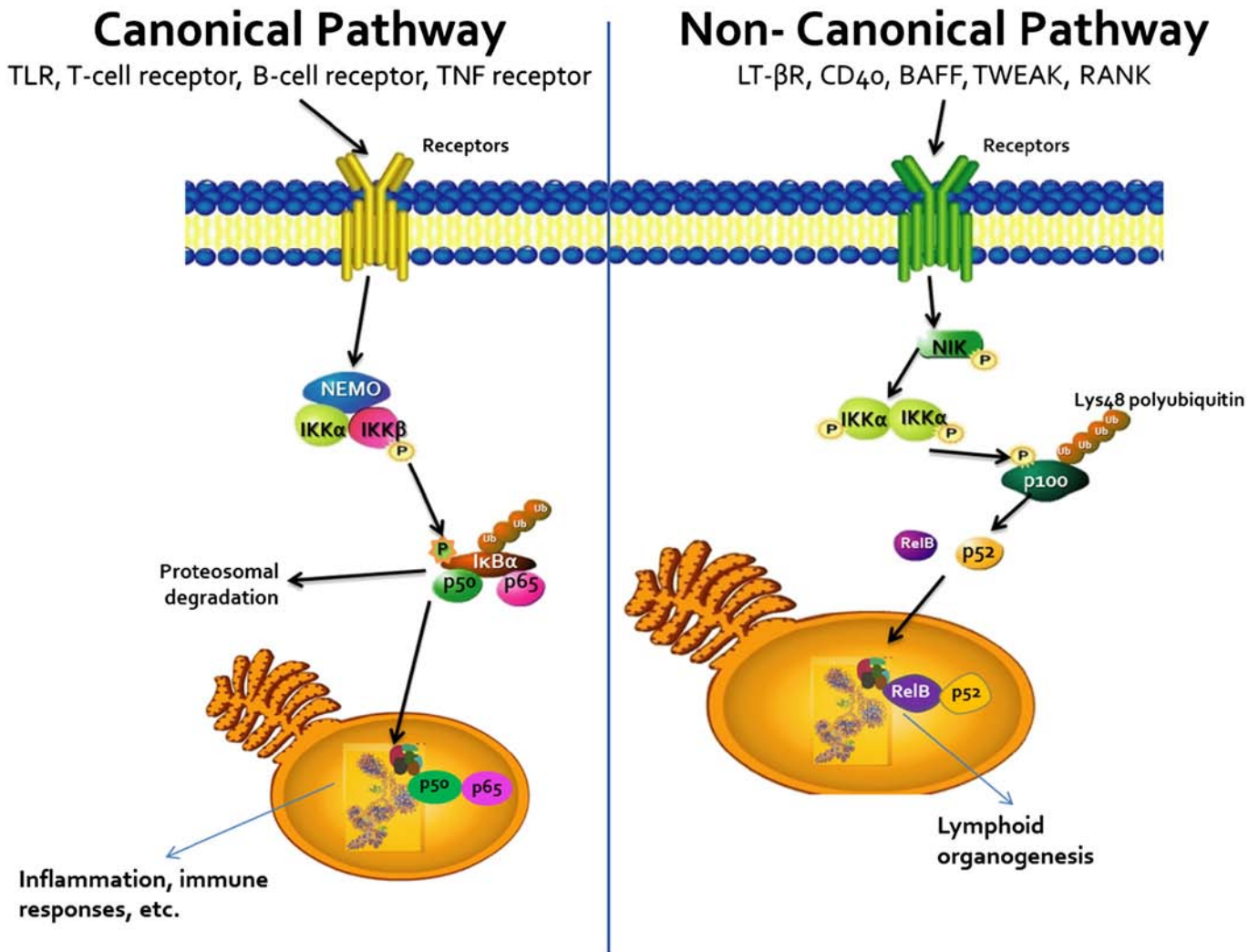


Fig. 3. The canonical and non-canonical NF- κ B activation pathways. The canonical pathway is activated downstream by multiple pro-inflammatory receptors, resulting in the activation of the IKK complex composed of IKK α , IKK β , and NEMO. IKK phosphorylates I κ Bs, triggering their ubiquitination and proteasomal degradation, releasing NF- κ B, which consists of p50 and p65 complex, allowing it to accumulate within the nucleus and activate the expression of target genes. The activation of the non-canonical pathway involves the activation of the IKK α dimer, which phosphorylates p100, promoting ubiquitin-proteasome processing of p52. The activated non-canonical NF- κ B, which typically consists of p52 and RelB, is accumulated within the nucleus for its transcriptional activity.

enhancer binding protein (C/EBP) alpha (CEBPA), YY1 associated factor 2 (YAF2), and hairy enhancer of split 1 (HES1) [74,79,75].

Nrf2 is a member of the Cap'n'collar (CNC) family, a subfamily of basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factors [84]. It is highly regulated by a cytosolic repressor protein called Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1), mainly distributed in the cytoplasm, which binds to filamentous-actin and/or myosin VIIa via the Kelch/DGR domain in the cytoskeleton [85]. Keap1, in combination with an adaptor component of Cul3 (Cullin 3)-based ubiquitin E3 ligase complex, promotes Nrf2 ubiquitination and proteasomal degradation in basal conditions [86,87]. In response to electrophilic or oxidative stress, Keap1 acts as a primary redox sensor by oxidation of specific reactive cysteine residues (Keap1 is a cysteine-rich regulatory and scaffold protein). Keap1 oxidation promotes Nrf2 release, allowing its accumulation into the nucleus [85] (Fig. 4). Nrf2 phosphorylation has also been proposed to induce Nrf2 release from its repressor. In this sense, members of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, and JNK, have been pointed out as potential kinases that promote Nrf2 activation [88–90]. Furthermore, some studies indicate that phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) [91–93] and/or PKC-catalyzed

phosphorylation of Nrf2 at Ser40 [94,95] results in its release from Keap1, leading to ARE-mediated cellular antioxidant response. Once inside the nucleus, Nrf2 heterodimerizes with the small Maf proteins, MafG, MafF and MafK (a family of bZip bidirectional transcription regulators) [96], enhancing its binding to ARE. Binding motif analysis showed that Nrf2–Maf heterodimers require a GC sequence (or GC box) on the 3'-region of ARE [75]. Besides, multiple transcriptional regulators like p160 family coactivator, CREB-binding protein (CBP)/p300 [97,98], corepressors such as silencing mediator of retinoid and thyroid receptors (SMRT) and histone deacetylase (HDAC)3 have been reported to interact with Nrf2 forming the nuclear complex [99,100]. It is also known that these modulator proteins are subjected to phosphorylation, being another point regulation in the activation or inactivation of Nrf2-directed gene expression [101]. This transcription factor has gained enormous relevance in the study of several pathologies, being an attractive candidate for the development of new therapeutic strategies. In this context, a recent study by Correa et al. [102] showed that the beneficial effects exerted by the natural antioxidant curcumin on both cardiac and renal function, in nephrectomized rats, were partially sustained by Nrf2 activation.

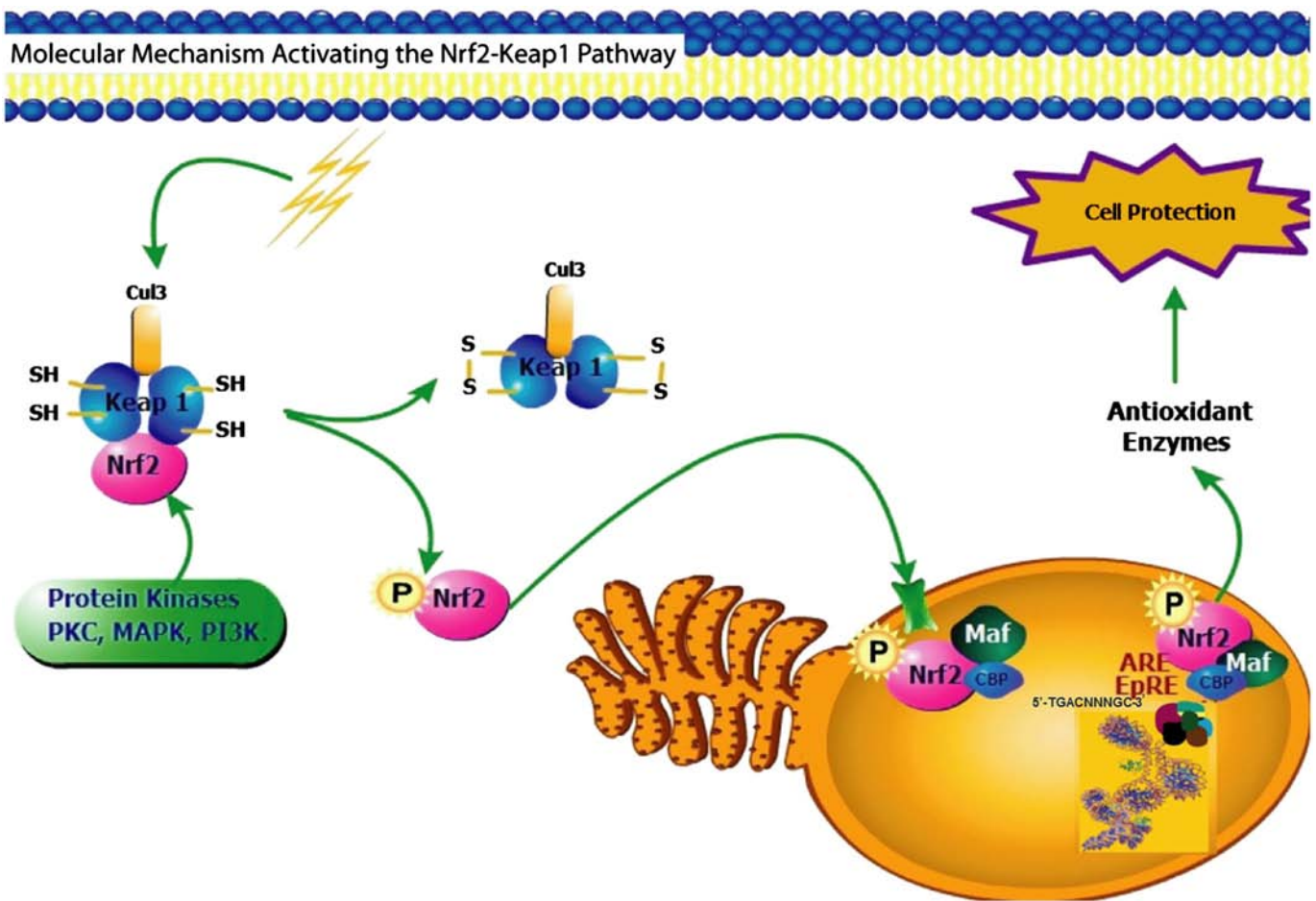


Fig. 4. Mechanism of Nrf2 activation. Under normal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by its repressor protein Keap1, which functions as an adapter between Nrf2 and Cul3 (for proteasomal degradation of Nrf2). In response to oxidative stress, Nrf2 accumulates within the nucleus forming heterodimers with Maf small proteins for chromatin binding at an ARE sequence in the promoter region of target genes. The role of Nrf2 in reducing inflammation and as a master antioxidant system regulator has been related to protective effects in the cell.

5. Evidence of crosstalk between Nrf2 and NF- κ B under pathological conditions

It has been proposed that after simultaneous accumulation within the nucleus, p65 antagonizes Nrf2-mediated gene transcription. Conversely, some phase II-inducers suppress NF- κ B signaling and activate the Nrf2 pathway [103].

To explain the opposite role that both signaling pathways exert on cell fate, it is important to describe the crosstalk regulation between both transcription factors, which occurs within the nucleus. Although the crosstalk mechanism between them is complex and is still under elucidation, it has been demonstrated that NF- κ B competes with Nrf2 for the coactivator CBP, and recruits the HDAC3 causing a local hypoacetylation that hampers activation of the Nrf2 pathway [100]. Currently, there are multiple studies designed to investigate the interplay between these relevant factors. Taking into account that inflammation is a hallmark of many diseases, like atherosclerosis, diabetes, liver disease, chronic obstructive pulmonary disease, acute respiratory distress syndrome, rheumatoid arthritis, and cancer, in the final part of this review we will highlight findings obtained from some of the abovementioned pathological conditions about possible crosstalk mechanisms between Nrf2 and NF- κ B pathways.

5.1. Inflammation

The following examples illustrate the effect of compounds that reduce the inflammatory response and that are also related with Nrf2

activation. The endogenous cyclic dipeptide cyclo(His-Pro) is produced by cleavage of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone. Cyclo(His-Pro) protects rat pheochromocytoma PC12 cells against paraquat toxicity, through Nrf2 signaling activation and, on the other hand, by suppressing the NF- κ B pathway. In that study, it is proposed that down-regulation of the inflammatory response by cyclo(His-Pro) is produced by redox modulation, specifically by the activity of the HO-1, an antioxidant and anti-inflammatory enzyme [104]. Coffee, one of the most popular beverages around the world, is a major contributor of redox-active phytochemicals in the diet, and influences the NF- κ B and Nrf2 interplay. In an interesting study, the degree of coffee roasting was related with its efficiency to alleviate inflammation caused by NF- κ B activity and, on the other hand, with its capacity to induce antioxidant response through Nrf2 signaling. Extracts of dark-roasted coffee exert potent inhibitory effects on NF- κ B signaling and act as efficient inducers of Nrf2 pathway in vitro [105]. The effect of Nrf2 signaling modulation on NF- κ B activity has been studied also in murine lymphocytes. Recently, it was reported that Schisandrin B (SB), a dibenzocyclooctadiene derivative isolated from *Schisandra chinensis*, increases the expression and nuclear translocation of Nrf2 and downstream target genes such as HO-1. SB inhibits the activation and nuclear accumulation of NF- κ B by preventing I κ B α degradation. Furthermore, a causal role of the Nrf2/HO-1 pathway in the anti-inflammatory SB effects observed was demonstrated by inhibiting Nrf2 and HO-1. In both conditions, the anti-inflammatory effects of SB are abolished, emphasizing the relevance of Nrf2 pathway activation in inflammation [106].

5.2. Atherosclerosis

Chronic inflammatory processes may result in increased adhesion of circulating monocytes to the injured endothelial layer. Some years ago, it was demonstrated that the compound cinnamaldehyde suppresses monocyte/endothelial cell interactions via downregulation of ICAM-1 and VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), through different mechanisms that depend on the pre-treatment time of endothelial cells. The compound blocks I κ B α degradation and suppresses NF- κ B pathway with short-time pre-treatment; with long time pre-treatment, the compound induces Nrf2-related genes including HO-1. Thus, cinnamaldehyde attenuates inflammation by increasing HO-1 expression and suppressing NF- κ B pathway [107].

Another compound, the novel cinnamate analog ethyl 3', 4', 5'-trimethoxythionocinnamate (ETMTC), has a potential role as anti-inflammatory and antioxidant natural derivative. ETMTC inhibits ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin, through NF- κ B pathway inhibition, by preventing phosphorylation and degradation of I κ B α , due to I κ B kinase activity inhibition. Additionally, its antioxidant role was demonstrated, as it activated the Nrf2 signaling pathway and induced gene expression of GCLM, HO-1, and NQO1 in human bronchial epithelial cells. These results strongly suggest a potential crosstalk mechanism between NF- κ B and Nrf2 [108].

5.3. Diabetes

Streptozotocin-induced cytokine toxicity is prevented by sulphoraphane (SFN) treatment and genetic overexpression of Nrf2 in isolated rat pancreatic islets and in RINm5F cells (rat insulinoma cell line). SFN induces expression of phase II enzymes, enhancing Nrf2 nuclear translocation and suppressing NF- κ B signaling pathway. Downregulation of pro-inflammatory enzymes is related with decreased I κ B α phosphorylation and degradation [109].

5.4. Liver injury

Hepatocytes exposed to galactosamine (Gal) treatment develop hepatotoxicity that is characterized by increased NF- κ B nuclear translocation, augmented expression of iNOS, TNF- α , IFN- γ (Interferon-gamma), and interleukin-(IL)-1 β , IL-6, IL-12, and IL-18. The inflammatory response contrasts with the diminution of Nrf2, NQO1, HO-1, and GST α expression. In this model, *Mangiferin* (xanthone glucoside) administration promotes hepatoprotective effects, by activating Nrf2 signaling and reducing the inflammatory response [110].

5.5. Acute lung injury

The ethanolic extract of *Alismatis rhizome* protects against severe inflammatory damage in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice and in a leukemic monocyte macrophage cell line (Raw 264.7 cell lines), inducing the expression of Nrf2-dependent genes, with concomitant suppression of pro-inflammatory cytokine gene expression [111]. Other studies have investigated the effect of natural compounds against acute lung injury and their effect on oxidative and inflammatory response. In a recent report, alpha-lipoic acid (ALA) treatment protected against acute lung injury in rats by attenuating pro-inflammatory cytokine production, diminishing iNOS levels and NF- κ B activity. Remarkably, ALA also increased Nrf2 activation and enhanced HO-1 expression. The authors conclude that the mechanism of protection against acute lung injury could be mediated by HO-1 induction and by inhibiting the inflammatory response dependent on the NF- κ B pathway [112]. In addition, pre-treatment with Dangkwisoo-san, a herbal medicine formula, has shown beneficial effects in attenuating lung inflammation induced by lipopolysaccharide. Dangkwisoo-san activates Nrf2 and downstream target genes in RAW 264.7 cells and in inflamed mouse lungs. Besides, the herbal medicine suppresses the transcriptional activity of NF- κ B

in vitro and, in consequence, NF- κ B-signaling dependent genes, like TNF- α , IL-1 β , and IL-6 [113].

However, although increased Nrf2 activity has been related with NF- κ B downregulation, the mechanism underlying the interplay between both factors has not been elucidated. Recent reports suggest that interactions between the transcription factors and activators or inhibitory molecules, like CBP and HDAC3, may modify gene expression and, therefore, determine cell fate under distinct conditions [98,100,101].

5.6. Kidney disease

The crosstalk mechanism of Nrf2 and NF- κ B has also become a crucial target against chronic kidney disease (CKD), as its regulation may produce attenuation of the pro-inflammatory cascade and enhancement of the antioxidant response.

Recently, it was described that AST-120 (an oral sorbent) protects from indoxyl sulfate effects in proximal tubular cells and rat kidney. Indoxyl sulfate is a uremic toxin that accelerates CKD progression in patients. Indoxyl sulfate activates NF- κ B signaling and downregulates Nrf2 expression, along with its downstream target genes HO-1 and NQO-1. It is proposed that NF- κ B activation modifies the Nrf2/ARE pathway by promoting p65/Keap1 interaction, diminishing Nrf2 protein level through protein ubiquitination and proteasomal-dependent degradation. Such effects are blocked by AST-120, an NF- κ B inhibitor and small interfering RNA specific to NF- κ B p65 [114].

5.7. Brain injury

Evidence of crosstalk pathways between Nrf2 and NF- κ B had been obtained in a rat model of brain ischemic injury by using octreotide (a synthetic cyclic octapeptide). Octreotide protective effects included enhancement of SOD, HO-1, and Nrf2 expression and suppression of NF- κ B nuclear accumulation [115]. On the other hand, the influence of Nrf2 on inflammatory response has been evaluated in cultured astrocytes from wild type and Nrf2 $-/-$ mice. Nrf2 depletion enhances the inflammatory process through NF- κ B activation and downstream overexpression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MMP9 (matrix metalloproteinase-9) [116]. A recent report shows that cell damage in rat striatum from rats with Parkinson's disease is due to an early-triggered kinase signaling component and intense inflammatory response mediated by NF- κ B activation and concomitant Nrf2 signaling inhibition [117].

5.8. Cancer

The potential molecular mechanisms involved in NF- κ B signaling inhibition have been studied in a colon carcinoma human cell line (HCT116) by using caffeic acid phenethyl ester (CAPE). CAPE blocked NF- κ B activation by I κ B α degradation and, consequently, p65 accumulation in the nucleus. Moreover, this compound activates Nrf2 pathway and its structural modification impairs its inhibitory effect on NF- κ B signaling [118]. In this regard, the latter authors suggest that quinones generated from the catechol moiety of CAPE may react with both the sulfhydryl residues of Keap1 (the cytosolic repressor of Nrf2), activating the transcription factor, and critical cysteine residues of IKK, inhibiting its function and disrupting the IKK-I κ B α -p65 pathway in HCT116 cells. As discussed below, the electrophilic property of CAPE is likely to be implicated in Nrf2 activation [119].

6. Putative crosstalk mechanisms between Nrf2 and NF- κ B

Information derived from a great number of experimental reports has given rise to an emerging picture of putative crosstalk mechanisms between both transcription factors. NF- κ B can unidirectionally antagonize the transcriptional activity of Nrf2, as in p65-overexpressing cells it

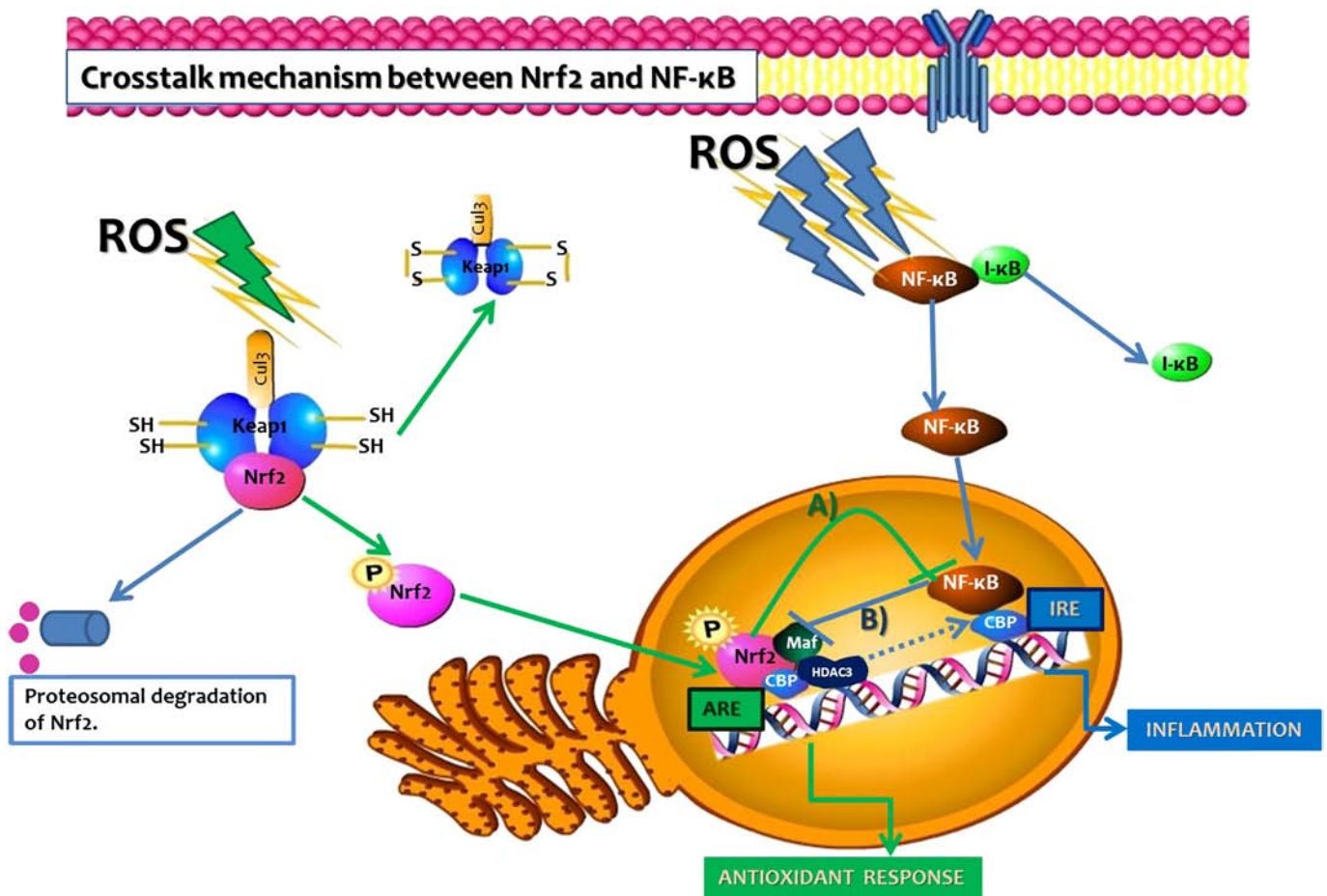


Fig. 5. Crosstalk mechanisms between NF- κ B and Nrf2. Blue arrows illustrate the NF- κ B transcriptional activation and its putative interaction with Maf or other Nrf2 regulatory proteins. Conversely, green arrows illustrate Nrf2 signaling activation and consequent NF- κ B pathway inhibition.

suppresses significantly ARE-dependent expression of HO-1, through selective deprivation of CBP from Nrf2 by competitive interaction. In the nucleus, p65 promotes recruitment of the co-repressor HDAC3 to ARE, facilitating the interaction of HDAC3 with either CBP or Maf, leading to local histone hypoacetylation, blocking chromatin decondensation, and suppressing Nrf2/ARE gene expression [100,98]. From the above, it is clear that NF- κ B activation induces intracellular events that concur with Nrf2 suppression and vice versa [101] (Fig. 5).

7. Concluding remarks

Current information indicates that Nrf2 and NF- κ B pathways share common effectors and regulatory points. NF- κ B pathway is inhibited by several Nrf2 activators; however, the definitive mechanistic evidence of Nrf2 regulatory role on NF- κ B signaling is still missing. Conversely, recent experimental evidence indicates that NF- κ B may directly repress Nrf2 signaling at the transcription level. This finding is an initial step to unravel the complex interplay/crosstalk mechanisms between Nrf2 and NF- κ B pathways, which could be promissory targets against the development of several diseases, in which inflammation and oxidative stress are main partners, like age-related diseases, cancer, diabetes, neurodegenerative disorders, and cardiovascular diseases.

Acknowledgments

We appreciate the valuable comments of Dr. José Pedraza Chaverri and Dr. Abel Santamaría. Mabel Buelna-Chontal was partially supported

by the Doctoral Program in Biomedical Sciences, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), and a scholarship from CONACYT. This work was partially supported by Grant 177527 to CZ from the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico.

References

- [1] A.J. Kowaltowski, N.C. de Souza-Pinto, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 333–343, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>.
- [2] A.A. Starkov, *Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S. A.* 1147 (2008) 37–52, <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1427.015>.
- [3] A.J. Lambert, M.D. Brand, *Biochem. J.* 382 (2004) 511–517, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040485>.
- [4] S. Dikalov, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (7) (2011) 1289–1301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033>.
- [5] S. Peglow, A.H. Toledo, R. Anaya-Prado, F. Lopez-Neblina, L.H. Toledo-Pereyra, *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 18 (2011) 137–146, <http://dx.doi.org/10.1007/s00534-010-0328-7>.
- [6] T. Münzel, T. Gori, R.M. Bruno, S. Taddei, *Eur. Heart J.* 31 (2010) 2741–2749, <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehq396>.
- [7] J. Nordberg, E.S.J. Arnér, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (11) (2001) 1287–1312.
- [8] H. Jaeschke, *J. Invest. Surg.* 16 (2003) 127–140.
- [9] C. Cardillo, C.M. Kilcoyne, R.O. Cannon III, A.A. Quyyumi, J.A. Panza, *Hypertension* 30 (1997) 57–63, <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.30.1.57>.
- [10] Z. Tan, T. Dai, X. Zhong, Y. Tian, M.K. Leppo, W.D. Gao, *Eur. J. Pharmacol.* 621 (1–3) (2009) 71–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.033>.
- [11] H.E. Cingolani, J.A. Plastino, E.M. Escudero, B. Mangal, J. Brown, N.G. Pérez, *J. Card. Fail.* 12 (7) (2006) 491–498, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2006.05.005>.
- [12] L.J. Ignarro, R.E. Byrns, G.M. Buga, K.S. Wood, *Circ. Res.* 61 (1987) 866–879, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.61.6.866>.
- [13] R.M. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, *Nature* 327 (1987) 524–526, <http://dx.doi.org/10.1038/327524a0>.

- [14] J. Garthwaite, Eur. J. Neurosci. 27 (2008) 2783–2802, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x>.
- [15] H. Bult, G.E. Boeckxstaens, P.A. Pelckmans, F.H. Jordaens, Y.M. Van Maercke, A.G. Herman, Nature 345 (1990) 346–347, <http://dx.doi.org/10.1038/345346a0>.
- [16] E.M. Schuman, D.V. Madison, Science 254 (1991) 1503–1506.
- [17] D.D. Rees, R.M.J. Palmer, S. Moncada, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 86 (9) (1989) 3375–3378.
- [18] R.M. Rapoport, M.B. Draznin, F. Murad, Nature 306 (1983) 174–176.
- [19] U. Förstermann, A. Mülsch, E. Böhme, R. Busse, Circ. Res. 58 (1986) 531–538, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.58.4.531>.
- [20] B.V. Khan, D.G. Harrison, M.T. Olbrych, R.W. Alexander, R.M. Medford, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1996) 9114–9119.
- [21] K. Pantopoulos, M.W. Hentze, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995) 1267–1271.
- [22] X.B. Liu, P. Hill, D.J. Haile, Blood Cells Mol. Dis. 29 (2002) 315–326, <http://dx.doi.org/10.1006/bcmd.2002.0572>.
- [23] U. Förstermann, W.C. Sessa, Eur. Heart J. 33 (2012) 829–837, <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- [24] N. Pozdnyakov, A. Lloyd, V.N. Reddy, A. Sitaramayya, Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1993) 610–615.
- [25] B. Brüne, S. Dimmeler, L. Molina y Vedia, E.G. Lapetina, Life Sci. 54 (1994) 61–70, [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00775-6](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(94)00775-6).
- [26] J. Viteček, A. Lojek, G. Valacchi, L. Kubala, Mediators Inflamm. 2012 (2012) 1–22, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/318087>.
- [27] C. Villanueva, C. Giulivi, Free Radic. Biol. Med. 49 (3) (2010) 307–316, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004>.
- [28] A. Daiber, S. Daub, M. Bachschmid, S. Schildknecht, M. Oelze, S. Steven, P. Schmidt, A. Megner, M. Wada, T. Tanabe, T. Münzel, S. Bottari, V. Ullrich, Int. J. Mol. Sci. 14 (2013) 7542–7570, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14047542>.
- [29] C.Y. Kim, C. Lee, G.H. Park, J.H. Jang, Arch. Pharm. Res. 32 (6) (2009) 869–881, <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-009-1609-z>.
- [30] W. Chen, H. Zhu, Z. Jia, J. Li, H.P. Misra, K. Zhou, Y. Li, Biochem. Biophys. Res. Commun. 390 (2009) 142–147, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.083>.
- [31] E. Schneider, D. Clark, Biosens. Bioelectron. 39 (2013) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.05.043>.
- [32] J. Sridhar, J. Liu, M. Foroozesh, C.L.K. Stevens, Molecules 17 (2012) 9283–9305, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17089283>.
- [33] S. Puntarulo, A. Cederbaum, Free Radic. Biol. Med. 24 (7/8) (1998) 1324–1330, [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00463-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00463-2).
- [34] A. Montezano, R. Touyz, Ann. Med. 44 (Suppl. 1) (2012) S2–S16, <http://dx.doi.org/10.3109/07853890.2011.653393>.
- [35] S. Dikalov, A.E. Dikalova, A.T. Bikineyeva, H. Schmidt, G. Harrison, K. Griendling, Free Radic. Biol. Med. 45 (9) (2008) 1340–1351 (doi: 0.1016/j.freeradbiomed.2008.08.013).
- [36] P.A. Krijnen, C. Meischl, C.E. Hack, C.J. Meijer, C.A. Visser, D. Roos, H.W. Niessen, J. Clin. Pathol. 56 (3) (2003) 194–199, <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.3.194>.
- [37] J.D. Lambeth, Nature 4 (2004) 181–189, <http://dx.doi.org/10.1038/nri1312>.
- [38] S. Hernández-Reséndiz, M. Buelna-Chontal, F. Correa, C. Zazueta, in: Volodymyr Lushchak (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-51-0552-7, 2012, <http://dx.doi.org/10.5772/35005>, (Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-and-mitochondrial-dysfunction-in-cardiovascular-diseases>).
- [39] M. Davies, Biochim. Biophys. Acta 1703 (2005) 93–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>.
- [40] M. Gutowski, S. Kowalczyk, Acta Biochim. Pol. 60 (1) (2013) 1–16.
- [41] S.I. Liochev, Free Radic. Biol. Med. 60 (2013) 1–4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>.
- [42] J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44 (2004) 239–267, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851>.
- [43] S. Schaffer, C. Jong, M. Mozaffari, Vasc. Pharmacol. 57 (2012) 139–149, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2012.03.005>.
- [44] J.K. Andersen, Nat. Med. 10 (2004) S18–S25, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1434> (Suppl.).
- [45] R.P. Brandes, N. Weissmann, K. Schöder, Free Radic. Biol. Med. 49 (2010) 687–706, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.030>.
- [46] C.R. Malfatti, L.T. Burgos, A. Rieger, C.L. Rüdiger, J.A. Túrmina, R.A. Pereira, J.L. Pavlak, L.A. Silva, R. Osiecki, Sci. World J. 2012 (2012) 348246, <http://dx.doi.org/10.1100/2012/348246>.
- [47] S. de M. Bandeira, G. da S. Guedes, L.J. da Fonseca, A.S. Pires, D.P. Gelain, J.C. Moreira, L.A. Rabelo, S.M. Vasconcelos, M.O. Goulart, Oxid. Med. Cell. Longev. 2012 (2012) 819310, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/819310>.
- [48] V. Benedusi, F. Martorana, L. Brambilla, A. Maggi, D. Rossi, J. Biol. Chem. 287 (2012) 35899–35911, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.366419>.
- [49] F.J. Miana-Mena, C. González-Mingot, P. Larrodé, M.J. Muñoz, S. Oliván, L. Fuentes-Broto, E. Martínez-Ballarín, R.J. Reiter, R. Osta, J.J. García, J. Neurol. 258 (2011) 762–769, <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-010-5825-8>.
- [50] R. Roy, S. Bagchi, P. Raychaudhuri, Int. J. Mol. Sci. 13 (9) (2012) 11012–11026, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms130911012>.
- [51] K. Maiellaro-Rafferty, D. Weiss, G. Joseph, W. Wan, R.L. Gleason, W.R. Taylor, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 301 (2) (2011) H355–H362, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00040.2011>.
- [52] S. Usui, B.C. Oveson, T. Iwase, L. Lu, S.Y. Lee, Y.J. Jo, Z. Wu, E.Y. Choi, R.J. Samulski, P.A. Campochiaro, Free Radic. Biol. Med. 51 (7) (2011) 1347–1354, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.010>.
- [53] Y. Li, T.T. Huang, E.J. Carlson, S. Melov, P.C. Ursell, J.L. Olson, L.J. Noble, M.P. Yoshimura, C. Berger, P.H. Chan, D.C. Wallace, C.J. Epstein, Nat. Genet. 11 (1995) 376–381, <http://dx.doi.org/10.1038/ng1295-376>.
- [54] K. Murakami, N. Murata, Y. Noda, S. Tahara, T. Kaneko, N. Kinoshita, H. Hatsuta, S. Murayama, K.J. Barnham, K. Irie, T. Shirasawa, T. Shimizu, J. Biol. Chem. 286 (52) (2011) 44557–44568, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.279208>.
- [55] C.C. Winterbourn, M.B. Hampton, Free Radic. Biol. Med. 45 (2008) 549–561, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>.
- [56] C. Spickett, A. Pitt, Amino Acids 42 (1) (2012) 5–21, <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0585-4>.
- [57] H. Forman, J. Fukuto, T. Miller, H. Zhang, A. Rinna, S. Levy, Arch. Biochem. Biophys. 477 (2) (2008) 183–195, <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.06.011>.
- [58] A. Corcoran, T. Cotter, FEBS J. 280 (9) (2013) 1944–1965, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12224>.
- [59] J. Kwon, S.R. Lee, K.S. Yang, Y. Ahn, Y. Kim, E. Stadtman, S. Rhee, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 16419–16424, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407396101>.
- [60] F. Ho, W. Tsang, S. Kong, T. Kwok, Biochem. Biophys. Res. Commun. 345 (3) (2006) 1131–1137, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.178>.
- [61] P. Mungai, G. Waypa, A. Jairaman, M. Prakriya, D. Dokic, M. Ball, P. Schumacker, Mol. Cell Biol. 31 (2011) 3531–3545, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.05124-11>.
- [62] Y. Chai, Y.F. Lin, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 298 (2010) C875–C892, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00196.2009>.
- [63] Y. Chai, D.M. Zhang, Y.F. Lin, PLoS One 6 (2011) e18191, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018191>.
- [64] I. Rahman, J. Marwick, P. Kirkham, Biochem. Pharmacol. 68 (6) (2004) 1255–1267, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.042>.
- [65] N. Bryan, H. Ahswin, N. Smart, Y. Bayon, S. Wohler, J.A. Hunt, Eur. Cell. Mater. 24 (2012) 249–265.
- [66] K. Iwai, Trends Cell Biol. 22 (2012) 355–364, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.001>.
- [67] S. Ghosh, M. Hayden, Nat. Rev. Immunol. 8 (2008) 837–848, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2423>.
- [68] A. Israël, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (3) (2010) a000158, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a000158>.
- [69] G. de Leon-Boenig, K. Bowman, J. Feng, T. Crawford, C. Everett, Y. Franke, A. Oh, M. Stanley, S. Staben, M. Starovasinik, H. Wallweber, J. Wu, L. Wu, A. Johnson, S. Hymowitz, Structure 20 (10) (2012) 1704–1714, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>.
- [70] S. Lee, Z. Toth, L.Y. Wong, K. Brulois, J. Nguyen, J.Y. Lee, E. Zandi, J. Jung, AmBio 3 (6) (2011) e00411–e00412, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00411-12>.
- [71] H. Hu, G.C. Brittain, J.H. Chang, N. Puebla-Osorio, J. Jin, A. Zal, Y. Xiao, X. Cheng, M. Chang, Y.X. Fu, T. Zal, C. Zhu, S.C. Sun, Nature 494 (7437) (2013) 371–374, <http://dx.doi.org/10.1038/nature11831>.
- [72] N. Soysa, N. Alles, Biochem. Biophys. Res. Commun. 378 (2009) 1–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.146>.
- [73] B. Razani, A. Reichardt, G. Cheng, Immunol. Rev. 244 (2011) 44–54, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01059.x>.
- [74] D. Malhotra, E. Portales-Casamar, A. Singh, S. Srivastava, D. Arenillas, C. Happel, C. Shyr, N. Wakabayashi, T. Kensler, W. Wasserman, S. Biswal, Nucleic Acids Res. 38 (17) (2010) 5718–5734, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq212>.
- [75] Y. Hirotsu, F. Katsuoka, R. Funayama, et al., Nucleic Acids Res. 40 (20) (2012) 10228–10239, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks827>.
- [76] R.K. Thimmulappa, K.H. Mai, S. Srisuma, T.W. Kensler, M. Yamamoto, S. Biswal, Cancer Res. 62 (18) (2002) 5196–5203.
- [77] M.O. Leonard, N.E. Kieran, K. Howell, M.J. Burne, R. Varadarajan, S. Dhakshinamoorthy, A.G. Porter, C. O'Farrelly, H. Rabb, C.T. Taylor, FASEB J. 79 (20) (2006) 1944–1955, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-5097fj>.
- [78] J. Lee, J. Hanson, W. Chu, J. Johnson, J. Biol. Chem. 276 (23) (2001) 20011–20016, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100734200>.
- [79] B. Chorley, M. Campbell, X. Wang, M. Karaca, D. Sambandan, F. Bangura, P. Xue, J. Pi, S.R. Kleiberger, D.A. Bell, Nucleic Acids Res. 40 (15) (2012) 7416–7429, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks409>.
- [80] T. Ishii, K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai, M. Yamamoto, J. Biol. Chem. 275 (21) (2000) 16023–16029, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.21.16023>.
- [81] J. Alam, D. Stewart, C. Touchard, S. Boinapally, A. Choi, J. Cook, J. Biol. Chem. 274 (37) (1999) 26071–26078, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.37.26071>.
- [82] S. Chanas, Q. Jiang, M. McMahon, G. McWalter, L. McLellan, C.R. Elcombe, C.J. Henderson, C.R. Wolf, G.J. Moffat, K. Itoh, M. Yamamoto, J.D. Hayes, Biochem. J. 365 (Pt 2) (2002) 405–416, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20020320>.
- [83] E.Y. Park, H.M. Rho, Mol. Cell. Biochem. 240 (1–2) (2002) 47–55.
- [84] H.K. Bryan, A. Olayanju, C.E. Goldring, B.K. Park, Biochem. Pharmacol. 85 (2013) 705–717, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.016>.
- [85] W. Li, A.N. Kong, Mol. Carcinog. 48 (2) (2009) 91–104, <http://dx.doi.org/10.1002/mc.20465>.
- [86] A. Eggler, E. Small, M. Hannink, A. Mesecar, Biochem. J. 422 (1) (2009) 171–180, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20090471>.
- [87] K. Takaya, T. Suzuki, H. Motohashi, K. Onodera, S. Satomi, T. Kensler, M. Yamamoto, Free Radic. Biol. Med. 53 (2012) 817–827, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023>.
- [88] L. Zipper, R. Mulcahy, Biochem. Biophys. Res. Commun. 278 (2000) 484–492, <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3830>.
- [89] G. Shen, V. Hebbar, S. Nair, C. Xu, W. Li, W. Lin, Y.-S. Keum, J. Han, M. Gallo, A.-N.T. Kong, J. Biol. Chem. 279 (2004) 23052–23060, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M401368200>.
- [90] M. Jin, A. Kumar, S. Kumar, PLoS One 7 (2012) e35505, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035505>.
- [91] C. Deng, Z. Sun, G. Tong, W. Yi, L. Ma, B. Zhao, L. Cheng, J. Zhang, F. Cao, D. Yi, PLoS One 8 (3) (2013) e58371, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058371>.

- [92] S. Niture, R. Khatri, A. Jaiswal, *Free Radic. Biol. Med.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>(in press).
- [93] C.Y. Tsai, C.C. Wang, T.Y. Lai, H.N. Tsu, C.H. Wang, H.Y. Liang, W.W. Kuo, *Int. J. Cardiol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.12.004>(in press).
- [94] H.C. Huang, T. Nguyen, C. Pickett, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42769–42774, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206911200>.
- [95] S. Niture, A. Jain, A. Jaiswal, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 4452–4464, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.058537>.
- [96] L. Baird, A. Dinkova-Kostova, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 241–272, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0674-5>.
- [97] M. Zhu, W. Fahl, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (2001) 212–219, <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5944>.
- [98] Z. Sun, Z. Huang, D. Zhang, *PLoS One* 4 (2009) e6588, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006588>.
- [99] S. Ki, I. Cho, D. Choi, S. Kim, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 4150–4165, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.10.4150-4165.2005>.
- [100] G.H. Liu, J. Qu, X. Shen, *BBA* 1783 (2008) 713–727, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.002>.
- [101] I. Bellezza, A.L. Mierla, A. Minelli, *Cancer* 2 (2010) 483–497, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24347>.
- [102] F. Correa, M. Buelna-Chontal, S. Hernández-Reséndiz, W. R. García-Niño, F. J. Roldán, V. Soto, A. Silva-Palacios, A. Amador, J. Pedraza-Chaverri, E. Tapia, C. Zazueta, *Free Radic. Biol. Med.* 61C (2013) 119–129, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.017>.
- [103] W. Li, T. Khor, C. Xu, G. Shen, W.S. Jeong, S. Yu, A.N. Kong, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1485–1489, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.017>.
- [104] A. Minelli, S. Grottelli, A. Mierla, F. Pinnen, I. Cacciatore, I. Bellezza, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 525–535, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.006>.
- [105] I. Paur, T. Balstad, R. Blomhoff, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1218–1227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.005>.
- [106] R. Checker, R. Patwardhan, D. Sharma, J. Menon, M. Thoh, H. Bhilwade, T. Konishi, S. Sandur, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1421–1430, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.006>.
- [107] B.C. Liao, C.W. Hsieh, Y.C. Liu, T.T. Tzeng, Y.W. Sun, B.S. Wung, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229 (2008) 161–171, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.021>.
- [108] S. Kumar, B. Singh, A. Prasad, V. Parmar, S. Biswal, B. Ghosh, *Eur. J. Pharmacol.* 700 (2013) 32–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.12.004>.
- [109] M.Y. Song, E.K. Kim, W.S. Moon, J.W. Park, H.J. Kim, H.S. So, R. Park, K.B. Kwon, B.H. Park, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235 (2009) 57–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.007>.
- [110] J. Das, J. Ghosh, A. Roy, P.C. Sil, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2602 (1) (2012) 35–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.015>.
- [111] C. Han, M. Kwun, K. Kim, J.Y. Choi, S.R. Oh, S. Ahn, J. Lee, M. Joo, J. Ethnopharmacol. 146 (2013) 402–410, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.010>.
- [112] Y.C. Lin, Y.S. Lai, T.C. Chou, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 229 (2013) 161–171, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/590363>.
- [113] J. Lyu, K. Kim, H. Kim, S.-I. Cho, K.-T. Ha, J.-Y. Choi, C. Han, H.-S. Jeong, H.-K. Lee, K.-S. Ahn, S.-R. Oh, R. Sadikot, J. Christman, M. Joo, *J. Ethnopharmacol.* 140 (1) (2012) 107–116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.043>.
- [114] D. Bolati, H. Shimizu, M. Yisireyili, F. Nishijima, T. Niwa, *BMC Nephrol.* 14 (2013) 56, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2369-14-56>.
- [115] L. Chen, L. Wang, X. Zhang, L. Cui, Y. Xing, L. Dong, Z. Liu, Y. Li, X. Zhang, C. Wang, X. Bai, J. Zhang, L. Zhang, X. Zhao, *Brain Res.* 1475 (2012) 80–87, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.052>.
- [116] H. Pan, H. Wang, X. Wang, L. Zhu, L. Mao, *Mediators Inflamm.* (2012) 217580, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217580>.
- [117] J. Tobón-Velasco, J. Limón-Pacheco, M. Orozco-Ibarra, M. Macías-Silva, G. Vázquez-Victorio, E. Cuevas, S. Ali, A. Cuadrado, J. Pedraza-Chaverri, A. Santamaría, *Toxicology* 304 (2013) 109–119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.011>.
- [118] Y. Lee, D.-H. Shin, J.-H. Kim, S. Hong, D. Choi, Y.-J. Kim, M.-K. Kwak, Y. Jung, *Eur. J. Pharmacol.* 643 (2010) 21–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.016>.
- [119] E. Balogun, M. Hoque, P. Gong, E. Killeen, C. Green, R. Foresti, J. Alam, R. Motterlini, *Biochem. J.* 371 (2003) 887–895, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021619>.