

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

<u>Trabajo de Tesis Doctoral:</u>

"INFLUENCIA DEL HIPOTIROIDISMO EN EL ATONTAMIENTO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN: ENERGÉTICA DE LA PARTICIPACIÓN MITOCONDRIAL Y FARMACOLOGÍA CARDIOPROTECTORA"

<u>Tesista</u>: Farm. Matías Bayley

Directora: Prof. Dra. Alicia E. Consolini

Codirectora: Prof. Dra. María Inés Ragone

<u>Año</u>:2025

Agradecimientos

Al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme realizar esta Tesis en la Cátedra de Farmacología.

A la Universidad Nacional de La Plata por otorgar la beca doctoral que me permitió iniciar esta Tesis y financiarla parcialmente con los subsidios a Jóvenes Investigadores.

Al CONICET por otorgar la beca doctoral de finalización que me permitió continuar y finalizar esta Tesis de Doctorado.

A los miembros del jurado por haber aceptado el rol de evaluar este trabajo. Agradezco profundamente el tiempo, el esfuerzo y la atención que han dedicado a revisar esta Tesis.

A mi directora, la Dra. Alicia Consolini, por su incansable dedicación, respaldo y orientación a lo largo de todo el proceso de esta Tesis. Fue ella quien me enseñó a amar y disfrutar del estudio de la farmacología experimental. Gracias a su paciencia y confianza, pude enfrentar cada obstáculo con una visión mas clara. Su labor y acompañamiento durante estos años no solo fueron esenciales para mi crecimiento académico y profesional, sino también para mi desarrollo personal.

A mi codirectora, la Dra. Inés Ragone, por su amistad y por acompañarme con generosidad en este recorrido. Su compromiso, conocimientos y experiencia fueron claves para la evolución de este trabajo. Estoy profundamente agradecido por su presencia constante que resultó esencial tanto en los momentos de incertidumbre como en los de éxito. Con Inés compartí incontables horas de trabajo experimental, aprendizajes y desafíos que me permitieron avanzar, no solo en el ámbito profesional, sino también en lo personal. Su apoyo continuo y su perspectiva fueron determinantes en este proceso.

A mi esposa Malena, mi compañera y uno de los pilares fundamentales en mi vida. Durante todos estos años su respaldo incondicional fue lo que me sostuvo en los momentos más dificiles. Ella es la persona con la que elijo caminar cada día; su comprensión, paciencia y amor han sido mi mayor fortaleza. Gracias por estar siempre a mi lado, por confiar en mí y por hacer de cada día un motivo para seguir adelante.

A mi mamá por su apoyo constante durante los primeros años de este recorrido en el posgrado. Gracias por estar siempre a mi lado, por confiar en mí y por ser una fuente inagotable de aliento. Fue ella quien me transmitió el amor por la biología y las ciencias biológicas desde que era chico, inspirándome un poco a seguir este camino. Sin su apoyo este logro no habría sido posible.

A mi familia por su amor, comprensión y respaldo inquebrantable a lo largo de todo este proceso. Gracias por su constante presencia. Quiero hacer un reconocimiento especial a mi hermana Florencia, quien me brindó su valiosa ayuda en los últimos detalles del diseño de las figuras de esta tesis. Su dedicación y mirada precisa de diseñadora fueron cruciales para dar forma final a este trabajo (y a tantos otros).

A la Dra. Gisel Diaz por su amistad y por acompañarme en este último tramo de la tesis. Su generosidad y apoyo fueron fundamentales. Gracias por enseñarme algunas de las técnicas que apliqué y utilicé en el desarrollo de este proyecto. Su conocimiento y disposición para compartirlo fueron esenciales.

A Mercedes Leoz por su dedicación y esfuerzo en lel cuidado de los animales del laboratorio, continuando el valioso trabajo iniciado por Fabio Cruces. Su compromiso y

labor fueron determinantes para que esta tesis fuera posible. Sin su invaluable aporte, el desarrollo de este trabajo no habría sido factible. Gracias por tu entrega y por estar siempre dispuesta a colaborar.

A mis amigos y amigas, por su constante compañía, por escucharme y por estar a mi lado durante todo este viaje. Aprecio su apertura, su disposición para darme consejos y su apoyo durante todos estos años. Gracias por ser una fuente inagotable de ánimo, por alegrar mis días más difíciles y por estar siempre allí.

A mis compañeros de laboratorio y colegas del GFEYEC por su colaboración y respaldo durante todo este tiempo. Gracias por compartir sus conocimientos, por ayudarme en los momentos de incertidumbre y por contribuir a crear un ambiente de trabajo tan enriquecedor. Su participación fue esencial para el avance de este proyecto.

Dedico esta tesis a Alicia y a Inés, dos personas cuya dedicación y sabiduría fueron fundamentales en cada etapa de este recorrido. Esta Tesis es fruto de mucho trabajo en equipo y de la visión que compartieron conmigo. Gracias por estar siempre presentes, por motivarme a superarme y por ser una influencia esencial en mi desarrollo académico y humano.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN DE LA TESIS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Isquemia y reperfusión miocárdica	4
1.a. Efectos de la isquemia	5
1.b. Efectos de la reperfusión	6
1.c. Participación mitocondrial en la I/R	7
2. Vías celulares involucradas en la I/R	9
2.a. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	9
2.b. Vía del óxido nítrico (NO)	11
2.c Vía de la proteína kinasa C (PKC)	15
2.d. Transporte de K⁺ mitocondrial	17
2.e. Vía PI3K/Akt	19
2.f. Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)	20
3. Hipotiroidismo y efectos cardíacos	23
4. Antiarrímicos clase III	25
4.a. Amiodarona	25
4.b. Dronedarona	29
5. Energética Cardíaca	32
5.a Desarrollo del método calorimétrico	32
5.b Metabolismo activo y metabolismo basal	34
5.c Aplicación de la energética cardiaca al estudio en modelos de corazones aislados expuestos a I/R	36
	38
OBJETIVOS	40
Objetivos generales	10
Objetivos específicos	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Preparados biológicos	44
1.a. Animales de experimentación empleados	44
1.b. Tratamientos in vivo en ratas Wistar	44
1.c. Corazones aislados de rata	45
1.d. Aislamiento de cardiomiocitos de rata	46
2. Mediciones mecánico-calorimétricas en corazones perfundidos	47
3. Calibración y estabilización del calorímetro	48
4. Protocolos para la evaluación contráctil y calorimétrica	49
. ,	

4.a. Evaluación de los efectos del hipotiroidismo en corazones expuestos a isquemia moderada y reperfusión (I/Rm)4	9
4.b. Evaluación de los efectos del hipotiroidismo en corazones expuestos a isquemia severa y reperfusión (I/Rs)5	1
4.c. Evaluación de los efectos de amiodarona oral en corazones EuT e HipoT expuestos a I/Rs5	3
4.d. Evaluación de los efectos de amiodarona perfundida en corazones EuT e HipoT expuestos a I/Rs5	5
4.e. Evaluación de los efectos de dronedarona perfundida en corazones EuT e HipoT expuestos a I/Rs56	6
5. Microscopía confocal	8
6. Determinación del grado de infarto60	0
7. Western Blot de corazones expuestos a I/Rs60	D
8. Determinación de niveles de hormonas tiroideas en muestras de sangre6	1
9. Soluciones y drogas empleadas en esta Tesis62	2
10. Análisis estadísticos63	3
RESULTADOS6	5
1. Mediciones in vivo del estado tiroideo66	6
2. Evaluación de la dinámica de calcio mitocondrial y citosólica en cardiomiocitos de ratas EuT e HipoT6	7
3. Parámetros mecánico-calorimétricos previo a la I/R68	8
4. Estudio mecánico-calorimétrico de los efectos del hipotiroidismo en corazones de rata expuestos a un modelo de isquemia/reperfusión moderada (I/Rm)	0
i) Evaluación de la participación del intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial (mNCX) en el modelo de l/Rm) 6
ii) Rol de los canales mitocondriales de potasio-ATP dependientes (mKATP)80	D
iii) Rol del retículo sarcoplásmico en la I/Rm y efecto del hipotiroidismo82	2
5. Estudio mecano-energético de corazones aislados de ratas eutiroideas (EuT) e hipotiroideas (HipoT) expuestos a isquemia severa y reperfusión (I/Rs)83	3
 i. Evaluación de la participación del mPTP (poro de transición de permeabilidad mitocondrial) en la disfunción por I/Rs e influencia del hipotiroidismo8 	7
ii. Evaluación de la influencia de las ROS en la disfunción por I/R en corazones EuT8	8
iii. Evaluación de la participación del óxido nítrico en la disfunción por I/Rs y en la cardioprotección del Hipotiroidismo89	9
iii. Evaluación de la participación de las vías antiapoptóticas PI3K/Akt y PKC en la disfunción por isquemia/reperfusión (I/Rs) de corazones de ratas hipotiroideas94	4
iv. Evaluación de la participación de los canales mitocondriales de potasio-ATP dependientes (mKATP) en la disfunción por I/Rs y en la cardioprotección del hipotiroidismo90	6
v. Evaluación de la participación del intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial (mNCX en la cardioprotección del hipotiroidismo en I/Rs99) 9

vi. Evaluación de la influencia adrenérgica en los efectos del hipotiroidism	o en la
isquemia severa y reperfusión	101
 Evaluación de los efectos mecánico-calorimétricos en corazones de ratas vía oral subagudo con amiodarona y expuestos a I/R severa (I/Rs) 	tratadas 104
i. Efectos de la administración oral subaguda de amiodarona 30 mg/Kg/dí corazones de rata en I/Rs	a en 104
ii. Evaluación de la participación de la vía PKC y los canales mitocondriale potasio ATP dependientes (mKATP) en los efectos cardioprotectores de amiodarona en I/Rs en corazones EuT e HipoT	es de 109
iii. Evaluación de la participación de la vía del óxido nítrico en los efectos amiodarona frente a la disfunción por isquemia y reperfusión en corazone HipoT	de s EuT e 112
iv. Evaluación de la participación de las vías antiapoptóticas PI3K/Akt en l efectos de amiodarona en corazones Eut en la disfunción por isquemia/reperfusión	os 116
v. Evaluación de la participación de las ROS en los efectos de amiodaron corazones EuT e HipoT expuestos a isquemia/reperfusión	a oral en 117
 Expresión de proteínas relacionadas con ROS y NO en los corazones reperfundidos de ratas EuT, HipoT y tratadas con Amd. 	119
8. Efectos directos por perfusión de amiodarona 5 μg/ml previo a l/Rs	122
i. Efectos directos por perfusión de amiodarona en corazones eutiroideos hipotiroideos (HipoT) expuestos a I/Rs.	(EuT) e 122
ii. Influencia de las ROS en los efectos de la perfusión de Amd en corazor	nes EuT.
iii. Influencia de la producción de NO en los efectos de la perfusión de Am en corazones EuT expuestos a I/Rs.	iodarona
9. Efectos directos de la perfusión de dronedarona 1 µg/ml previo a I/Rs	127
i. Efectos de la perfusión de Dronedarona y su interacción con el hipotiroi	dismo. 128
ii. Evaluación de los canales mitocondriales de potasio ATP-dependientes (mKATP), en los efectos directos de Dronedarona en I/R en corazones Eu	s JT 129
iii. Evaluación de la participación de la vía del óxido nítrico en los efectos Dronedarona en perfusión frente a la disfunción por I/Rs en corazones de EuT e HipoT.	de rata 131
DISCUSIÓN	134
Efectos del Hipotiroidismo en la I/R	135
Efectos del HipoT en el modelo de I/R moderado:	136
Efectos del HipoT en el modelo de I/R severo	138
Efectos de Amiodarona	144
Efectos de la administración oral subaguda de Amiodarona	144
Efectos directos en I/Rs por perfusión de amiodarona	152
Efectos de Dronedarona	154

CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161
PUBLICACIONES DE ESTA TESIS	190

ABREVIATURAS

5-HD: 5-hidroxi-decanoato. ADP: adenosin difosfato. Adre: adrenalina. AG: aminoguanidina. Akt: proteína kinasa B. Amd: amiodarona. ATP: trifosfato de adenosina. BDM: butanodiona monoxima. C: control. Caf: cafeína. cGMP: guanosina monofosfato cíclico. Che: celeritrina. Clzp: clonazepam. CTE: cadena transportadora de electrones. Cvd: carvedilol. Cys-A: ciclosporina A. DAG: diacilglicerol. DMSO: dimetil sulfóxido. DOG: 1.2-dioctanoilglicerol dP/dt/P: velocidad de contracción. -dP/dt/P: velocidad de relajación. Drd: dronedarona. eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial. EuT: eutiroideos. F/Fo: relación de intensidad de fluorescencia respecto al punto inicial. Ha: Calor activo. Ha: mercurio. HipoT: hipotiroideos. Hr: calor de reposo. Ht: flujo de calor total. HW: peso del corazón. Hz: Hertz. I/R: isquemia-reperfusión. I/Rm: isquemia-reperfusión moderada. I/Rs: isquemia-reperfusión severa. I: isquemia. IH: calor inicial. IM: infarto miocárdico. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible. KATP: canales de K⁺ sarcolemales- ATP dependientes L-NAME: N-nitro-L-arginina metil ester LVP: presión intraventricular izquierda. mKATP: canales de K⁺ mitocondriales- ATP dependientes mNCX: intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial. MPG: N-(-2-mercaptopropionil) glicina. mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial. mW: miliwatts. NADH: nicotinamida adenina dinucleótido hidruro. NCX: intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal.

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal. NO: óxido nítrico. NOS: óxido nítrico sintasa. NS: no significativo. ONOO-: peroxinitrito. P/Ht: economía muscular total. P: contractilidad. p-Amd: perfusión de Amiodarona. PCI: precondicionamiento isquémico. PI3K: fosfatidilinositol-3-kinasa. PKC: Proteína Kinasa C. Pre-I: pre isquemia. QA: calor de activación. QB: calor basal. R: reperfusión RCPI: recuperación contráctil post-isquémica. ROS: especies reactivas del oxígeno. RS: retículo sarcoplásmico SEM: desviación estándar de la media. SERCA2: Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico. T4: levotiroxina oral. TDH: calor dependiente de la tensión. TIH: calor independiente de la tensión. UCam: uniporter de calcio mitocondrial. W: trabajo externo. Wrt: wortmanina.

 Δ F/Fo: cambios en la relación de intensidad de fluorescencia respecto al punto inicial. Δ LVEDP: diferencia de presión intraventricular izquierda diastólica respecto del control pre isquémico.

RESUMEN DE LA TESIS

Esta Tesis abordó el estudio de los mecanismos celulares subyacentes a dos modelos de "aturdimiento cardíaco" por isquemia/reperfusión (I/R) en corazones de rata eutiroideas (EuT) e hipotiroideas (HipoT). Luego, se evaluaron los efectos del tratamiento subagudo con amiodarona oral 30 mg/kg/día (durante 7 días) en dichos modelos, y los mecanismos de acción subyacentes. Por otra parte, se estudiaron los efectos directos de amiodarona (5 µg/ml) y los efectos de dronedarona (1 µg/ml), ambos por perfusión arterial en los corazones EuT e HipoT previo a la I/R. Para ello se empleó un estudio mecánico-energético de los corazones aislados en un calorímetro de flujo, que permite evaluar continua y simultáneamente la presión intraventricular izquierda (LVP) y el flujo de calor (Ht) durante todo el proceso de I/R. Se calcularon la presión máxima desarrollada (P), los cambios en la presión diastólica (Δ LVEDP), y la economía mucular (P/Ht). Se emplearon bloqueantes selectivos de diversas vías celulares cardioprotectoras, para evaluar si participan en el efecto mecánico-energético durante la I/R. Además, se complementó con la determinación del área de infarto, y de la expresión de algunas proteínas de vías cardioprotectoras al final de la reperfusión. Por otra parte, se evaluaron cambios en los niveles citosólicos y mitocondriales de Ca²⁺ en cardiomiocitos de ratas EuT e HipoT. Las conclusiones principales son:

El HipoT fue cardioprotector, excepto en presencia de niveles fisiológicos de adrenalina, y en este caso la cardioprotección fue recuperada por el tratamiento previo con carvedilol oral y subagudo.

En la cardioprotección del HipoT participan mecanismos que evitan la sobrecarga de Ca²⁺ y ROS mitocondrial propia de la I/R, como la activación de los canales mKATP, el mNCX, la iNOS, y las proteínas antiapoptóticas PKC y PI3K.

El tratamiento oral subagudo con amiodarona fue cardioprotector en la I/R en ratas eutiroideas, pero no en ratas hipotiroideas. El efecto benéfico de amiodarona involucra la activación de la vía de PKC, PI3K, los canales mKATP, activación de iNOS y atrapamiento de radicales hidroxilos. En cambio, en corazones hipotiroideos amiodarona incrementa el daño oxidativo de la I/R.

Por perfusión, amiodarona no mostró efectos cardioprotectores en la I/R de ratas eutiroideas y redujo la recuperación post-isquémica de ratas hipotiroideas, acentuando la producción de ROS, y evidenciando la la inhibición de canales de calcio.

Por el contrario, la perfusión de dronedarona fue cardioprotectora en corazones eutiroideos en I/R, por activación de los canales mKATP y de la iNOS; y no afectó la cardioprotección del hipotiroidismo.

Los resultados de esta Tesis aportan a la bibliografía el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la interacción de dos patologías frecuentes, el hipotiroidismo y la isquemia cardíaca por obstrucción coronaria, a través de modelos preclínicos. Además, brinda información preclínica acerca de los efectos contráctiles y energéticos de dos fármacos que en clínica son seleccionados por sus propiedades electrofisiológicas para tratar otra patología cardíaca, las arritmias. Hasta este trabajo de Tesis, no había reportes en la bibliografía acerca de sus consecuencias y mecanismos en el "corazón aturdido", cuando tanto este estado como las arritmias pueden desarrollarse luego de un episodio isquémico. Estos resultados alertan sobre la influencia del estado tiroideo en los efectos de dichos fármacos, y las diferencias entre la administración intravenosa aguda y el tratamiento oral subagudo de amiodarona. La posibilidad de que lo observado en estos modelos preclínicos se produzca total o parcialmente en la clínica será un interrogante que incentiva el estudio a nivel médico cardiológico.

INTRODUCCIÓN

1. Isquemia y reperfusión miocárdica

La isquemia miocárdica se explica como el desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno, generado por la ausencia total o parcial de flujo sanguíneo coronario, generalmente como consecuencia de una afección cardiovascular primaria (aterosclerosis). La falta de perfusión al miocardio afecta no solo el suministro de oxígeno, sino también el aporte de nutrientes para las células miocárdicas y la eliminación de desechos metabólicos, cuya acumulación resulta perjudicial y tóxica.

Como tal, el fenómeno de isquemia y reperfusión (I/R) tiene dos consecuencias conocidas: el atontamiento (*stunning* o aturdimiento) y el infarto. Se llama atontamiento a la función miocárdica deprimida o deteriorada siguiente a un evento isquémico de duración relativamente corta y que persiste una vez restablecido el flujo (normal o casi normal) de perfusión a pesar de la ausencia de daño irreversible. Por otro lado, cuando se observa una función notablemente más deteriorada y daño irreversible por apoptosis o muerte celular, se habla de lesión por reperfusión letal que conduce finalmente a infarto miocárdico (IM) (Kloner y Jennings, 2001; Bolli y Marbán, 1999).

El corazón es particularmente sensible a los episodios de I/R o hipoxia debido a su continua actividad de ciclos de contracción y relajación, para lo cual requiere la simultánea resíntesis del ATP consumido acoplado al metabolismo aeróbico mitocondrial.

1.a. Efectos de la isquemia

Dado que el corazón es un órgano sometido a un estrés metabólico constante debido a su actividad contráctil continua, es extremadamente sensible y cualquier alteración prolongada de su perfusión puede afectar severamente su funcionamiento. En primer lugar, la ausencia total o parcial de perfusión desencadena la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial debido a la falta de oxígeno (el cual es el aceptor final fundamental de la cadena respiratoria mitocondrial). Consecuentemente, se produce un cambio metabólico de aeróbico a exclusivamente anaeróbico para satisfacer la demanda energética. Por lo tanto, las células recurren al aumento de la fermentación láctica como una vía alternativa para generar energía y compensar la caída de los niveles de ATP, lo que conduce a la acumulación de lactato en el tejido y provoca acidosis (disminución drástica del pH intracelular) (Halestrap y col., 2004). La mayor parte del ATP producido por la glucólisis es hidrolizado por la F1F0ATP sintasa mitocondrial, que utiliza la energía para regenerar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \psi$) (Baines, 2009). Además, se produce una caída en los niveles de creatina fosfato y un incremento en las concentraciones de AMP y fosfato inorgánico (Halestrap y col., 2007; Ferdinandy y col., 2007). El medio intracelular acidificado y el aumento de fosfatos inorgánicos contribuyen significativamente a la disfunción contráctil y electrofisiológica observada durante la isquemia (Lee y col., 1988; Bers, 2001). Con la disminución de los niveles de ATP, varios procesos que mantienen el funcionamiento normal del miocardio se ven afectados, como los canales de K⁺ sarcolemales- ATP dependientes (KATP), que se activan cuando los niveles de ATP se reducen, acortando la fase 2 del potencial de acción. Esto reduce el influjo de Ca²⁺, lo que contribuye a la disminución de la contractilidad (Cole y col., 1991). Simultáneamente, el bajo nivel de ATP afecta el funcionamiento de la Na⁺, K⁺ -ATPasa, lo que resulta en una sobrecarga celular de Na⁺ (Pike y col., 1990). El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal (NCX) reduce su funcionamiento, lo que lleva a una disminución en el eflujo de Ca²⁺ (Bolli y Marbán,

1999). Además, la falta de ATP reduce la actividad de la SERCA2 en el retículo sarcoplásmico y el eflujo a través de la Ca²⁺-ATPasa sarcolemal. Todos estos factores pueden contribuir a una acumulación de Ca²⁺ de hasta el 50% de sus concentraciones normales (Varadarajan y col., 2001). La suma de estos efectos genera un aumento de la concentración de calcio ([Ca²⁺]) citosólico que contribuye a la contractura propia de la isquemia.

1.b. Efectos de la reperfusión

La reperfusión es el proceso por el cual se restablece el flujo coronario y la oxigenación al tejido. Restituida oportunamente, puede limitar de manera importante la magnitud del daño miocárdico, evitando que sea irreversible. Sin embargo, el proceso no está libre de potencial para causar daño irreversible a las células del miocardio, dependiendo de la duración de la isguemia previa (Ferdinandy y col., 2007).

Con el aumento de O₂, se restaura el metabolismo mitocondrial y se recupera la síntesis de ATP por reactivación de la F₀,F₁-ATP-sintasa, fosforilando ADP y AMP que se acumularon durante la isquemia (Kloner y Jennings, 2001). La Na⁺, K⁺-ATPasa sensible a la recuperación de ATP regresa a su funcionamiento normal, y el pH también se normaliza rápidamente debido al eflujo de H⁺ en intercambio con Na⁺, mediante el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHX). El aumento resultante de [Na⁺] intracelular, del 5 al 150% (Varadarajan y col., 2001), repercute directamente en el funcionamiento del NCX, reduciéndolo (o incluso revirtiéndolo). Esto disminuye el eflujo neto de Ca²⁺, lo que aumenta su concentración y conduce a hipercontractura y daño a los cardiomiocitos (Schafer y col., 2001). La elevada [Ca²⁺] citosólico promueve un aumento en su captación por parte del uniporter de calcio mitocondrial (UCam), y estas organelas son sensibles a la sobrecarga ya que puede iniciar señales pro-apoptóticas, especialmente durante los primeros minutos de la reperfusión (Murphy y col., 2008; Salas y col., 201).

Diversas estrategias farmacológicas han mostrado ser efectivas para minimizar el daño mitocondrial por sobrecarga de Ca²⁺ durante los primeros minutos de la reperfusión.

La reperfusión está asociada además con una explosión en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Aún durante la respiración "normal", la cadena transportadora de electrones mitocondrial contiene varios centros redox, que pueden funcionar como fuente primaria de producción del anión superóxido a nivel de los complejos mitocondriales (Turrens y col., 2003). La reoxigenación producto de la reperfusión agrava aún más este proceso, desacoplando la cadena transportadora de electrones mitocondrial y produciendo un estallido en la producción del anión superóxido (Turrens y col., 1997). Este incremento en la producción de ROS, junto con la sobrecarga de Ca²⁺, son los principales responsables del daño por reperfusión, ya que promueven la formación y apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Misra y col., 2009; Halestrap y col., 2009). Este poro de estructura compleja permite la extrusión de componentes celulares esenciales, disparando el proceso de apoptosis o muerte celular. Dado que los componentes mitocondriales son muy sensibles a la acción de los ROS, el aumento de sus niveles daña principalmente a las proteínas. Existen estudios basados en la hipótesis de que los ROS producidos durante la reperfusión del miocardio isquémico representan la mayor causa de la injuria letal por reperfusión (Piper y col., 1998). La producción de estas especies y el alcance de su daño cuando se encuentran desbalanceados serán abordadas en un apartado posterior.

1.c. Participación mitocondrial en la I/R

La función principal de las mitocondrias es proveer energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) para las células. Su función está íntimamente modulada por la variación en las concentraciones de oxígeno, ATP, especies reactivas del oxígeno (ROS) y Ca²⁺ en el citoplasma y en la matriz (Kuznetsov y col., 2008). Las mitocondrias

de los cardiomiocitos cuentan con un gran número de crestas formadas a partir de las invaginaciones de la membrana mitocondrial interna lo que refleja su alta demanda en producción de energía. Sin embargo, las mitocondrias no sólo se limitan a esta función, también intervienen en otros mecanismos regulando una gran variedad de procesos metabólicos, vías de señalización, síntesis de metabolitos, regulación del equilibrio redox celular e incluso interviniendo en la homeostasis del calcio y procesos de apoptosis.

Las mitocondrias desempeñan un papel sustancial en el mantenimiento de la homeostasis de Ca²⁺, dada la interacción espacial y funcional con el retículo sarcoplásmico (Csordas y col., 1999, Csordás y col., 2006). El Ca²⁺ juega un rol protagónico en el metabolismo mitocondrial. El aumento en las [Ca²⁺] en la matriz estimula ciertas enzimas del ciclo de Krebs y activa sitios de producción de ATP como la F0/F1-ATPasa, la translocasa de nucleótidos de adenina y complejos de la cadena respiratoria, entre otros (Di Lisa y col., 2007; Graier y col., 2007; Halestrap y col., 2002).

Los órganos y tejidos con una elevada demanda energética, como el corazón y sus cardiomiocitos, son mucho más sensibles a la lesión por corte de perfusión como lo son las derivadas por isquemia y reperfusión (Wiedemann, 2013). Ante la isquemia, se produce el cese de la fosforilación oxidativa, la disminución en el volumen de la matriz y el agrandamiento del espacio intermembranoso, la caída del potencial de membrana mitocondrial que deviene en hinchazón, y la afectación sistemática de todos aquellos procesos mitocondriales (Costa y col., 2005). Con la reperfusión y reoxigenación del tejido, la función del órgano se restaura, pero se exacerba la producción de ROS dañando al tejido. Adicionalmente, se produce la afectación e inactivación de dos enzimas que participan en el ciclo de Krebs: la aconitasa y α -cetoglutaratodeshidrogenasa (KGDH), lo que afecta directamente la producción de ATP (Lucas y Sweda, 1999; Sadek y col., 2002).

Vías celulares involucradas en la I/R

2.a. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las especies reactivas son moléculas con un electrón desapareado y con la capacidad de aparearse con otra molécula estable que se lo ceda. Las especies reactivas que contienen oxígeno (ROS) se generan fisiológicamente como subproductos del metabolismo celular, principalmente a nivel de la cadena transportadora de electrones, en las mitocondrias. Algunos ejemplos de ROS incluyen el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH⁻).

Cuando las ROS se encuentran en rangos fisiológicos, desempeñan funciones importantes interviniendo en diversos procesos esenciales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la señalización celular e incluso la cardioprotección frente a estímulos nocivos. Además, intervienen en la respuesta inmune, regulando la actividad de macrófagos y contribuyendo a la eliminación de patógenos. A nivel vascular regulan el tono de los vasos e intervienen en la respuesta a la vasodilatación y vasoconstricción (Zhou y Toan, 2020).

El radical superóxido (O₂⁻) se genera mediante la auto oxidación de semiquinonas en los complejos mitocondriales I y III. Para controlar su producción, la célula cuenta con una serie de sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión-peroxidasa (Turrens y col., 2003; Slodzinski y col., 2008). Como amortiguadores no específicos se encuentran los sistemas de tiorredoxina y glutatión. Este último es considerado, posiblemente, el mayor y más importante de los grupos de antioxidantes del miocardio debido a su ubicuidad en los distintos compartimentos celulares. Sin embargo, los sistemas antioxidantes son saturables, y cuando estos mecanismos amortiguadores se desbordan, y las ROS exceden los niveles fisiológicos normales, se produce el estrés oxidativo que acarrea el daño a

distintas biomoléculas y contribuye a estados patológicos variados (Slodzinski y col., 2008).

Las diversas organelas son blanco de ROS, provocando diversos efectos. En las mitocondrias, los grupos SH oxidables en el complejo I, son un blanco de oxidación, lo que puede intensificar aún más la producción de ROS durante la IR (Lesnefsky y col., 2017). A nivel de la maquinaria contráctil, en modelos de isquemia de 30 minutos en corazones de rata perfundidos con solución salina, los ROS indujeron una modificación oxidativa (carbonilación de actina y tiolación de tropomiosina) (Canton y col., 2004). Tanto la SERCA como el receptor de rianodina tipo 2 (RyR2) están funcionalmente influenciados por modificaciones redox (Hidalgo y col., 2005). La presencia de grupos tioles libres susceptibles a oxidación en los RyR2, parece convertirlos en los primeros afectados por las alteraciones redox (Hool y Corry, 2007), vinculando así el estrés oxidativo con la regulación del Ca²⁺ (Giles y Jacob, 2002). Se ha demostrado que la actividad del RyR2 aumenta en presencia de ROS y se describen tres tipos de modificaciones redox reversibles para RyR2: oxidación por disulfuro, S-nitrosilación y Sglutationilación (Niggli y col., 2013). Becerra y colaboradores encontraron que la Snitrosilación y la S-glutationilación de RyR2 aumentan durante los primeros momentos posteriores a la restauración del flujo sanguíneo post-isquemia con connotaciones protectoras (Becerra y col., 2016). Sin embargo, una exacerbada actividad de los RyR2 como resultado de la elevada producción de O2⁻, deviene en una mayor facilidad para la liberación del contenido del retículo sarcoplásmico (RS) y con ello fugas del mismo (Kawakami y Okabe, 1998). Dichas fugas pueden traer aparejados incrementos en los niveles basales de Ca²⁺ durante la diástole y eventos arrítmicos que pueden conducir a una falla cardíaca (Belevych y col., 2011). En lo que respecta a la actividad de la SERCA y su sensibilidad al estrés oxidativo, alteraciones en la captación de Ca²⁺ por el RS, también pueden sobrecargar el citosol de Ca2+. Concentraciones elevadas de O2- y otros ROS, inhiben la captación de Ca²⁺ en el RS porque interfieren directamente con el sitio de unión del ATP en la Ca²⁺ ATPasa (Rowe y col., 1983; Xu y col., 1997).

2.b. Vía del óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que se encuentra presente en ínfimas cantidades en las células de los mamíferos. Allí, desempeña una gran variedad de funciones entre las que destacan la vasodilatación y agregación plaquetaria a través de mecanismos endoteliales, pero también interviene en un sinfín de funciones celulares a nivel cardíaco en los cardiomiocitos.

El NO colabora en los balances redox junto con la vía de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en diversos procesos fisiológicos y en modificaciones postransduccionales (nitrosilación, nitrosación y nitración de proteínas) (Burwell y col., 2008). Además, actúa como segundo mensajero e intermediario de diversas vías intracelulares que afectan en mayor o menor medida la contractilidad y funcionalidad del miocardio.

Las principales fuentes de producción de NO son las isoenzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS), que son responsables de la generación de NO a partir de diversos precursores (L-arginina, L-Arg) y cofactores como calcio y calmodulina (Kelm y col., 1999). En la actualidad, se han identificado tres isoformas distintas de NOS.

La NOS neuronal o NOS1 está principalmente ubicada en el RS donde juega un rol crucial, interaccionando con los canales de liberación de Ca²⁺ (RyR2) y con la recaptación mediante la SERCA, influyendo así directamente en la regulación de la [Ca²⁺] citosólica (Xu y col.,1999; Sears y col., 2003). Ante situaciones patológicas, se ha demostrado que la NOS1 se trasloca con facilidad desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcolema en los cardiomiocitos, pudiendo perder parcialmente su actividad protectora sobre los canales iónicos del miocardio (Damy y col., 2004).

La NOS2 (o inducible: iNOS), se expresa como una proteína citosólica durante procesos inflamatorios o patológicos y puede tener un rol dual en condiciones de

isquemia y reperfusion (Yu y col., 2018). La sobreproducción de NO por iNOS puede contribuir a la lesión tisular en situaciones de estrés oxidativo y a la patogénesis de enfermedades cardiovasculares (Tang y col., 2014). Por otro lado, el uso de un inhibidor especifico de la isoforma inducible de la NOS (S-metilisotiourea por vía intraperitoneal 25 minutos antes de la oclusión de la arteria coronaria durante 20 minutos y reperfusión de 3 horas en ratas expuestas a hipoxia crónica) revirtó la disminución del tamaño de infarto, lo que demuestra un rol protector de la iNOS en un contexto de precondicionamiento (Tsibulnikov y col., 2018).

La NOS3 (o endotelial, eNOS) está ubicada también en caveolas del sarcolema y túbulos T del miocardio, e interactúa con adrenoreceptores beta y canales de Ca²⁺ tipo L. El NO producido por eNOS puede tener efectos beneficiosos, incluyendo la regulación del tono vascular coronario cuando se expresa en el endotelio vascular, y también la protección contra la isquemia/reperfusión y la modulación de la función cardíaca cuando se expresa en el miocardio (Feron y col., 1998; Lima y col., 2010). Sin embargo, y ante un elevado aporte de NO por parte de la iNOS en condiciones de estrés oxidativo, puede desacoplarse y contribuir a la producción de anión superóxido (Mercanoglu y col., 2015). El NO interactúa con cascadas intracelulares pro-apoptóticas en la I/R prolongada y severa, y la eNOS es activada por fosforilación de las vías con PKA, PKB/Akt, AMPK y CaMK2b, y es inhibida por la vía de PKC (Gluvic y col., 2020).

Existen también vías no enzimáticas de producción cardíaca de NO, entre las cuales la acidosis tisular aumenta la producción de NO. Otra vía ocurre incluso a pH normal, ya que en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y alta concentración de NADH, la xantina oxidasa es capaz de producir NO a partir de nitrito. Estas vías no enzimáticas son de especial relevancia ya que pueden contribuir a la producción de NO durante la isquemia aún después de la inhibición completa de las NOS mediante herramientas farmacológicas (Schulz y col., 2004).

Durante la isquemia y reperfusión miocárdica tanto las fuentes de NO como su concentración son variables y cumplen diferentes funciones, dependiendo del entorno

Redox, pudiendo ser beneficiosas o deletéreas. Durante la isquemia temprana, se produce la activación de las isoformas de la NOS (especialmente la iNOS) y de las vías de producción de NO no enzimáticas, con el consecuente incremento en la concentración de NO (Csonka y col., 1999). A medida que progresa el período isquémico, y debido a la disminución de la disponibilidad de sustratos, la producción de NO disminuye como resultado de la inactividad de las NOS (Wang y Zweier, 1996). Una vez restablecido el flujo en la reperfusión temprana ocurre un estallido en la concentración de NO dentro del miocardio como resultado de distintos procesos, la reactivación de las eNOS y nNOS, y la liberación de NO de los depósitos de S-nitrosotiol. A medida que progresa la reperfusión, y como resultado de la elevada producción de ROS, la disponibilidad de NO vuelve a disminuir incluso por debajo de los valores iniciales (Amrani y col., 1995).

Los efectos del NO varían según su concentración y la activación de diversas vías. El NO activa a la guanilato ciclasa soluble (sGC), lo que conduce a un aumento en la formación del monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). La vía de GMPc desempeña un papel crucial en la cardioprotección contra la I/R miocárdica. Si las concentraciones de GMPc permanecen bajas, prevalece el efecto resultante de su inhibición de las enzimas fosfodiesterasas II y III (PDE) que promueven un incremento de la disponibilidad del segundo mensajero AMPc por inhibición de su degradación, y consecuentemente mayor actividad de las PKA. Esta kinasa fosforila componentes celulares tales como canales de calcio del RS sensibles a rianodina (RyR2) y canales de calcio voltaje operados (L), incrementando la [Ca²⁺] intracelular y por lo tanto, la fuerza desarrollada (Caricate-Neto y col., 2019).

A altas concentraciones de GMPc, predomina la activación de las kinasas dependientes de GMPc (PKG), con cuya catálisis de la fosforilación de ciertas proteínas produce la consiguiente inhibición de canales de Ca²⁺ tipo L y disminución de la afinidad de la troponina I. Es decir, se induce una caída de la fuerza de contracción y consiguiente depresión funcional de los cardiomiocitos (Caricate-Neto y col., 2019).

A nivel mitocondrial, bajas [NO] ayudan a conservar el potencial de membrana mitocondrial y los procesos que de él dependen (producción de ATP, transportadores e intercambiadores mitocondriales). Además, el NO contribuye a la regulación en la formación (e inhibición de la eventual apertura) del poro mPTP, y funciona como un amortiguador del estrés oxidativo al reaccionar con pequeñas cantidades de ROS y prevenir el daño celular inducido por ellos. Se han encontrado evidencias que señalan que la producción de NO puede inducir la vía de señalización para cGMP, PKG y canales mKATP, lo cual conduce a la reducción de la sobrecarga de calcio mitocondrial. Así, se previene la apertura de los mPTP, y ello conduce a una mejora de la tolerancia cardíaca a la isquemia/reperfusión (Costa y col., 2008).

A concentraciones suprafisiológicas e incluso patológicas, el NO contribuye a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y, en consecuencia, se incrementa la producción de ROS al producirse un proceso de respiración celular ineficiente. Sumado a la saturación de los sistemas antioxidantes, la regulación positiva de la actividad de la iNOS conduce a un incremento de la nitrolización de los residuos cisteína de la arginasa por el NO, y con ello aumenta la actividad de esta enzima que degrada a L-Arg (Mercanoglu y col., 2015). La consecuente reducción de la disponibilidad de L-Arg induce el desacoplamiento de la eNOS, que contribuye a la producción de altos niveles de superóxido (O²⁻). Éste se combina con NO y forma la especie peroxinitrito (ONOO-), uno de los elementos identificados como responsables de lesión a diversos componentes celulares (Mercanoglu y col., 2015). La formación de ONOO-, impulsada por el creciente estrés oxidativo y cantidades crecientes de ROS, es un marcador clave del daño producido por la isquemia y la reperfusión miocárdica (Valdez y col., 2018).

2.c Vía de la proteína kinasa C (PKC)

Las proteínas kinasa C (PKC) son una familia de enzimas serina/treonina quinasas, que juegan un rol clave en la regulación y transducción de señales biológicas variadas, desde el crecimiento hasta la apoptosis (Rosse y col., 2010). Las isoformas de la PKC se clasifican según la capacidad de unión de su dominio regulador N-terminal siendo éstas: activadas por diacilglicerol (DAG) y Ca²⁺ (α , β , γ); activadas por DAG, pero sin residuos de coordinación para Ca²⁺ (δ , ϵ , θ , η) (Newton y col., 2016); y aquellas que no dependen de DAG o Ca²⁺ para su activación (ζ , λ /l) (Diaz-Meco y Moscat, 2012).

Durante la I/R miocárdica, puede producirse la acumulación de ROS, formación y apertura de los mPTP y, en última instancia, muerte celular por apoptosis o necrosis (Crompton y col., 1998). Durante estos períodos, se ha descrito que las isoformas δ y ϵ intervienen sobre todo a nivel mitocondrial y cuando hay disfunción, en la regulación del estrés oxidativo, la homeostasis del calcio y los procesos de muerte celular (Chen y col., 2021). De experimentos en los que se investigó la cardioprotección de procedimientos de precondicionamiento isquémico o farmacológico, en los últimos 30 años se ha dilucidado que las isoformas δ y ϵ de la PKC son las principales involucradas en la cardioprotección frente al daño por isquemia y reperfusión miocárdica.

La isoforma δ parece tener un rol dual que varía de acuerdo al contexto experimental. En protocolos de precondicionamiento isquémico o farmacológico potencia vías cardioprotectoras, reduciendo la apoptosis y necrosis. En contextos diferentes, sin embargo, se ha demostrado que la PKC δ puede resultar proapoptótica al promover la acumulación de la proteína BAD, la desfosforilación de la proteína Akt, inhibiendo su acción, o incluso traslocarse durante la reperfusión a la membrana mitocondrial favoreciendo la liberación de citocromo C (Murriel y col., 2004).

Por el contrario, el precondicionamiento farmacológico con sulfuro de hidrógeno mejora el manejo intracelular de calcio en cardiomiocitos aislados de rata expuestos a protocolos de isquemia simulada (Yong y col., 2008). El uso de celeritrina, inhibidor de

PKC, atenuó estos efectos protectores provocando una sobrecarga de Ca⁺² (Pan y col., 2008). Resultados similares se obtuvieron con la perfusión de fenilefrina para estimular los receptores α 1 (acoplados a una proteína Gq y a la fosfolipasa C), en los que se redujo la necrosis e incrementó la función ventricular al involucrar a las MAPK y AMPK, y a canales de potasio ATP-dependientes sarcolemales (KATP). De igual manera, el bloqueante selectivo celeritrina anuló los efectos positivos observados, poniendo en evidencia la participación de la PKC δ en dichos procesos protectores (Turrel y col., 2008). El uso de diazóxido (abridor del canal mKATP) e inhibidores específicos de la PKC demostró que dicha enzima es un componente integral del canal mKATP, y que se trasloca a las mitocondrias induciendo cardioprotección en contextos de isquemia y reperfusión (Wang y col., 1999; Ludwig y col., 2004).

Por otro lado, y a diferencia de la isoforma δ , se ha descrito que los efectos de la activación de la PKC- ϵ son enteramente cardioprotectores. En condiciones de pre condicionamiento isquémico, la fosforilación y translocación de PKC- ϵ está mediada por la activación de la fosfolipasa C y representa un mecanismo benéfico al limitar la acumulación de Ca²⁺ citosólico, disminuir la acumulación de ROS y el estrés oxidativo durante la lesión por I/R (Stamm y Del Nido, 2004; Xu y col., 2017; Ciocci y col., 2018).

Adicionalmente, la utilización de distintas herramientas farmacológicas en condiciones de precondicionamiento isquémico mostró la importancia de mediadores como el NO (y las NOS que lo regulan, en especial la isoforma endotelial eNOS) y la proteína Akt tanto en modelos murinos como en conejos. Tong y Murphy (2000) utilizaron 1,2-dioctanoilglicerol (DOG), un activador de la isoforma PKCε en conjunto con wortmanina (inhibidor de la PI3K) y expusieron a los corazones a 4 ciclos de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión (precondicionamiento, PC) antes de la isquemia global de 20 minutos. DOG mejoró la presión desarrollada (LVDP) postisquémica y wortmanina abolió este efecto, lo que sugiere que PI3K se encuentra antes en la vía de señalización de PKC-ε y NO involucradas en el precondicionamiento (Tong y col., 2000). Respecto de la influencia del NO, Ping y colaboradores (1999) utilizaron L-NAME y

celeritrina en corazones de conejo expuestos a protocolos de precondicionamiento isquémico, encontrando que la traslocación de PKC ϵ fue anulada por dichas sustancias, perdiéndose así los efectos protectores del precondicionamiento. Esto sugiere que las NOS estarían activando a la PKC ϵ . Posteriormente, Xuan y colaboradores (2007) describieron la importancia de la isoforma endotelial de la NOS (eNOS) en los efectos protectores del precondicionamiento del precondicionamiento, y que involucran a la PKC. En ensayos realizados en mitocondrias cardiacas de ratón aisladas, Baines y col. (2003) encontraron que la incubación con PKC- ϵ recombinante conduce a la inhibición de la inflamación mitocondrial inducida por sobrecarga de Ca²⁺, señal que conduce a la formación y apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) con fines apoptóticos.

2.d. Transporte de K⁺ mitocondrial

El K⁺ está sujeto a un ciclo dentro de las células, de igual manera que el Ca²⁺. Para que ocurra la síntesis de ATP, es necesario el bombeo de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna, lo cual genera un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) que funciona como fuerza impulsora para el movimiento (influjo) de K⁺. Esta entrada de K⁺ está acompañada por agua y el exceso de K⁺ es eyectado de la matriz mitocondrial a través del antiporter K⁺/H⁺ (Garlid y col., 2003).

El movimiento dentro y fuera de la mitocondria ocurre a través de 3 clases de canales de K⁺ mitocondriales: el canal de K⁺ regulado por ATP (mKATP), el canal de K⁺ activado por Ca²⁺ (mBKCa) y el canal de K⁺ voltaje dependiente (mK_V). Tanto el mKATP, como el mBKCa están involucrados en la regulación del potencial de membrana mitocondrial, la producción de ROS, la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP) y la fosforilación oxidativa (Graier y col., 2007).

Como tal, el ciclo del K⁺ tiene como objetivo principal amortiguar las variaciones en el volumen mitocondrial, ya que un hinchamiento o retracción excesiva de la matriz podría afectar el espacio intermembrana y con ello la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones (CTE). La afectación de la CTE, tiene injerencia directa en la producción de ATP y ROS (Garlid y Paucek, 2003). En condiciones patológicas como la isquemia, la matriz experimenta una contracción excesiva, una caída de su $\Delta\Psi m$ y expansión del espacio intermembrana. Además, la permeabilidad de la membrana externa al ATP y ADP aumenta, por lo que se favorece la rápida hidrólisis del ATP por la F0F1-ATPsintasa y se pierden los sitios de contacto entre membranas. Esto conduce a la liberación del citocromo C que da inicio al proceso apoptótico (Dos Santos y col., 2002).

El uso de distintas estrategias o tratamientos que potencian la apertura de los canales mKATP ha sido asociada con la disminución del tamaño del infarto y el mejoramiento de la recuperación contráctil post-isquémica, además de estar implicados en el proceso de precondicionamiento cardíaco (Grover y col., 1997).

A continuación, se describe el funcionamiento de los canales de K⁺ mitocondriales ATPdependientes y su injerencia en la I/R miocárdica.

Los canales de K⁺ mitocondriales regulados por ATP, están ubicados en la membrana mitocondrial interna y regulan la entrada de K⁺ a la matriz mitocondrial, el volumen de la misma, del espacio intermembranoso y, en consecuencia, la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial al ATP y al ADP (Paucek y col., 1992; Costa y col., 2006). Su bloqueo está regulado fisiológicamente por el Mg⁺², el ATP y el ADP, pero no por el GDP (Liu y O'Rourke, 2008; Misra y col., 2009). Farmacológicamente, sustancias como el diazóxido, pinacidil y cromakalim promueven su apertura (abridores), mientras que otros como 5-HD y glibenclamida, inhiben su apertura (Garlid y col., 1997).

Distintos estudios han mostrado que promover la apertura de los mKATP con diazóxido durante la I/R induce un moderado incremento en la producción de ROS

mitocondrial en cardiomiocitos (Garlid y col., 2000) y en corazones perfundidos, con fines protectores (Das y col., 1999; Forbes y col., 2001). Si los canales mKATP se abren la conductancia al K⁺ se incrementa, ingresando, el volumen de la matriz se mantiene constante y en consecuencia no se modifica el espacio intermembranoso ni sus sitios de contacto (Paucek y col., 1992; Costa y col., 2006). Al prevenirse la alteración en el volumen, el potencial de membrana se conserva y la permeabilidad al ATP de la membrana externa disminuye, minimizando la pérdida del mismo y su hidrólisis por la F0F1ATP-sintasa mitocondrial (Costa y col., 2006). Una vez iniciada la reperfusión, la disponibilidad de ADP para su fosforilación está garantizada y se reduce la acumulación de Ca²⁺ en la mitocondria porque la captación de K⁺ disminuye el $\Delta\Psi$ m (se reduce la fuerza impulsora para el influjo de Ca²⁺ a través del UCam) (Garlid y col., 1997; Ishida y col., 2001; Murata y col., 2001; Carreira y col., 2005). De esta forma se da el efecto protector de los abridores del mKATP frente a la apoptosis/necrosis.

En concordancia con lo anterior, Zhu y col. (2003) han mostrado que la adición de glibenclamida y 5-HD abolió los efectos cardioprotectores observados con los abridores, al bloquear la apertura de los mKATP.

2.e. Vía PI3K/Akt

Las PI3K son una familia de enzimas quinasas que juegan roles cruciales en diversos procesos fisiológicos de células y tejidos (Marone y col., 2008). En el sistema cardiovascular, tanto la PI3K como demás mensajeros rio abajo, son mediadores de la vía RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinases), una vía ampliamente descripta y que forma parte de las estrategias cardioprotectoras que se buscan promover.

La activación de la PI3K requiere de factores de crecimiento, citoquinas, hormonas como la insulina, señales propias de la isquemia e incluso el estrés oxidativo (Baxter y col., 2001; Jonassen y col., 2001; Brar y col., 2000). Una vez en

funcionamiento, cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), que actúa como un segundo mensajero que recluta y activa a la Akt (o proteína kinasa B) ubicada en la membrana celular. La activación de Akt lleva a la fosforilación de múltiples sustratos que promueven la supervivencia celular al fosforilar y desactivar proteínas pro-apoptóticas (Bad, Caspasa-9) (Cardone y col., 1998). También regula el metabolismo celular promoviendo la captación de glucosa y la síntesis de lípidos, procesos fundamentales para la adaptación celular a condiciones de estrés (Oudit y col., 2009). Y, como resultado de la inhibición de la proteína GSK3B por su fosforilación, promueve la proliferación celular al regular la síntesis de logido, procesos fundamentales para la regular la síntesis de proteínas y el crecimiento (Shioi y col., 2002). Esto es esencial en la recuperación de tejidos después del daño por isquemia y reperfusión.

Se ha demostrado que el precondicionamiento isquémico (PCI), activa la vía RISK y reduce el tamaño de infarto en corazones aislados de ratón expuestos a protocolos de 35 minutos de isquemia global y 120 minutos de reperfusión (Rosello y col., 2018). Se ha demostrado además que durante la I/R se produce una acumulación de Akt en las mitocondrias, señalando una posible interacción entre éstas, los canales mKATP y componentes del mPTP, con fines protectores (Yellon y Downey, 2003). Además, la inhibición especifica de la PI3K con sustancias como wortmanina (100 µM), ha atenuado dichos efectos cardioprotectores, demostrando que PI3K y la consecuente activación de Akt, intervienen en la cardioprotección mencionada (Yellon y Downey, 2003; Rosello y col., 2018).

2.f. Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)

Además de proveer energía a las células produciendo ATP a través de la fosforilación oxidativa y consumiendo oxígeno, las mitocondrias actúan como reservorios de calcio, que ingresa mediante el uniporter (UCam) impulsado por el

potencial de la membrana interna ($\Delta\Psi$ m). En condiciones fisiológicas, la [Ca²⁺]m está regulada principalmente por su extrusión mediante el intercambiador Na/Ca (mNCX). En condiciones de estrés oxidativo elevado o incremento masivo de las [Ca²⁺]m, las mitocondrias responden con la formación y posterior apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).

El mPTP es un complejo de canales que se extiende por los sitios de contacto de las membranas mitocondriales interna y externa con sensibilidad variable al calcio y dependiente del voltaje (Crompton y col., 1999). La formación y accionar del mPTP está determinada por varias proteínas, especialmente el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, ubicado en la membrana externa), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, ubicado en la membrana interna) y la ciclofilina D (CypD, ubicada sobre la matriz) (Webster y col., 2009).

La formación y apertura del mPTP está estrechamente relacionado con la lesión por isquemia y reperfusión miocárdica y es considerado un evento clave camino a la apoptosis (Crompton y col., 1998; Halestrap y col., 2004). Durante la isquemia, y ante la ausencia de oxígeno, el poro permanece cerrado (Griffith y col., 1995). Durante los primeros minutos de la reperfusión, los desbalances en las concentraciones de ROS (que pueden oxidar algunos residuos de la proteina ANT), el agotamiento de los nucleótidos de adenina (como el ATP y el ADP), el aumento en las concentraciones de fosfato inorgánico, la despolarización de la membrana mitcondrial y el hinchamiento de la matriz, provocan un aumento de la sensiblidad del poro al Ca²⁺ en la matriz y su consiguiente apertura (Halestrap y Davidson, 1990; Halestrap y col., 2002). Una vez abierto el mPTP es permeable al agua y a cualquier molécula con un peso menor de 1,5 kDa. Con la apertura masiva sobreviene la liberación de factores proapoptóticos, como el citocromo c, la pérdida inmediata de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana interna, con el cese resultante de la síntesis de ATP, afluencia de soluto e hinchazón mitocondrial, lo que activa una cascada de eventos que llevan a la muerte celular por apoptosis (Halestrap y col., 2002).

Es posible entonces, demorar la formación o inhibir la apertura del mPTP como estrategia cardioprotectora en modelos de lesión por isquemia/reperfusión. Halestrap y col. (2002) demostraron que la ciclosporina A (CysA, fármaco inmunosupresor) bloquea la apertura del poro al unirse a la CypD e impedir su interacción con el ANT. Esto previene la unión de la proteína ANT a la membrana mitocondrial interna y disminuye la sensibilidad del poro al Ca²⁺ (Halestrap y col., 2002). Sin embargo, y a pesar de lo prometedor de la estrategia descrita, la eficacia de la CysA para prevenir arritmias postisquémicas es incierta y algunos estudios han cuestionado su seguridad (Ghaffari y col., 2013).

Respecto del estado tiroideo y su relación con el mPTP, Yehuda y col. (2005) observaron una disminución significativa en la expresión de la proteína ciclofilina D (CypD) en mitocondrias aisladas de hígado de ratas con hipotiroidismo (inducido por administración de metimazol 0.025% durante 4 semanas en el agua de bebida). Este resultado vino acompañado de una disminución significativa en la salida de Ca²⁺ mitocondrial sensible a la Ciclosporina A, la hinchazón mitocondrial y la liberación de proteínas de la matriz. Es importante señalar que la administración de T3 a las ratas hipotiroideas restauró las propiedades de la membrana mitocondrial y los niveles de Ciclofilina D, disminuyendo los niveles de la proteína antiapoptóticas. Estos cambios, en que el hipotiroidismo previno la apertura del mPTP, sugieren que la hormona tiroidea juega un papel en la regulación de la sensibilidad del mPTP (Yehuda y col., 2005).

3. Hipotiroidismo y efectos cardíacos

El hipotiroidismo es una condición clínica en la que la producción o acción de las hormonas tiroideas se encuentra disminuida, respondiendo a diversas causas que afectan la glándula tiroides. El hipotiroidismo es una de las alteraciones tiroideas más frecuentes, especialmente en mujeres, y se caracteriza por síntomas cardiovasculares que incluyen bradicardia, hipertensión diastólica suave, baja tasa metabólica basal y fatiga, agravados por hipercolesterolemia (Nyirenda y col., 2005). Aunque su tratamiento es sencillo (suplementación con levotiroxina oral, T4), las consecuencias de no abordarlo oportunamente pueden ser graves e incluso fatales. Las manifestaciones clínicas variables (desde fatiga, constipación y calambres hasta manifestaciones más graves) requieren de análisis bioquímicos que lo controlen. Respecto de su origen, el mismo puede ser primario (origen en la misma glándula tiroidea y también causa más probable), secundario (por alteración hipofisaria o hipotalámica) o bien, periférico (ocasionado por la resistencia a la acción de las hormonas tiroideas) (Chaker y col., 2017). Una vez instaurado el cuadro hipotiroideo, todos los órganos y sistemas se ven afectados, siendo uno de los impactados el sistema cardiovascular.

El hipotiroidismo puede provocar un aumento de la resistencia vascular, disminución del gasto cardíaco y disminución de la función ventricular izquierda. Además, las lesiones miocárdicas y los derrames pericárdicos son más comunes en los pacientes con hipotiroidismo que en aquellos eutiroideos (Gao y col., 2016). Los pacientes con hipotiroidismo tienen una mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular y suelen presentar características de síndrome metabólico y dislipemia que agravan el riesgo de enfermedad coronaria (Tiller y col., 2016).

El hipotiroidismo puede alterar diversos parámetros hemodinámicos y bioquímicos. En corazones enteros de ratas hipotiroideas (tratadas con propiltiouracilo, PTU, 500 mg/L durante 21 días en agua de bebida), se encontró una disminución

significativa de la presión diastólica, de las velocidades de contracción y relajación, de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial sistólica, respecto de controles eutiroideos. Conjuntamente, se registró una disminución significativa de los niveles de metabolitos del NO en suero y corazón, pero no en la aorta; junto a una baja en los niveles de la isoforma inducible de la NOS (iNOS), y un aumento de la nNOS sin afectar los niveles de eNOS (Yousefzadeh y col., 2021). Otros autores mostraron que el hipotiroidismo también reduce la expresión de iNOS y la apoptosis (Jeddi y col., 2016). Además, se demostró que el hipotiroidismo desensibiliza los receptores beta-adrenérgicos, y estaría relacionado a la *up-regulation* de la iNOS, causando disfunción (Shao y col., 2016). Por otra parte, Gluvic y col. (2020) demostraron que en el hipotiroidismo se reduce la actividad de NOS participantes en el daño por I/R.

En células ventriculares aisladas de rata, el hipotiroidismo provocó alteraciones en la dinámica del Ca²⁺ con reducción de los transitorios de Ca⁺² y de la expresión de la proteína SERCA2 con una consecuente disfunción contráctil. Además, no se encontraron modificaciones importantes en el contenido de ATP o el consumo de O₂, lo que sugiere que las alteraciones en el movimiento de Ca²⁺ de los miocitos no se deben a la afectación metabólica (Montalvo y col., 2018).

En cuanto a la influencia del hipotiroidismo en corazones expuestos a I/R, cuando corazones de rata fueron expuestos a protocolos de isquemia de 30 minutos y reperfusion de 1 hora se observó una mejora de la contractilidad. De acuerdo con Seara y col. (2018), los corazones de ratas hipotiroideas (estado inducido por la administración de metimazol a razón de 300 mg/L durante 35 días) mostraron una mejora de la recuperación contráctil durante la reperfusión, demora de la contractura post isquémica y aumento de la expresión de enzimas antioxidantes (SOD1 y GPX1) que protegen contra el daño oxidativo. Algunos estudios demuestran que los corazones de ratas hipotiroideas son más resistentes a la injuria por I/R, debido en parte a disminución en los niveles de fosforilación de la p38 MAPK y JNK (Mourouzis y col., 2009), pero los mecanismos no fueron totalmente establecidos (Chen y col., 2018). Las mitocondrias
aisladas de corazones de ratas hipotiroideas (por administración de metimazol en el agua de bebida al 0.02%) no cambiaron la capacidad antioxidante y disminuyeron el hinchamiento comparado con un grupo sin tratamiento (Venditti y col., 2003).

Resultados similares se obtuvieron en ratones que recibieron metimazol en el agua de bebida (0.02%) durante 3 semanas expuestos a 30 minutos de isquemia y 120 minutos de reperfusión. Los corazones hipotiroideos mostraron una mejor recuperación de la presión ventricular izquierda desarrollada durante la reperfusión, en comparación con los corazones de los ratones eutiroideos (Pape y col., 2022). Estuvo acompañado por una reducción significativa en la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y STAT3 y una disminución significativa del tamaño del infarto, tanto en ausencia como en presencia de adrenalina. Los autores sugieren que el estado hipotiroideo podría estar confiriendo resistencia a la isquemia al reducir la demanda metabólica del miocardio y alterar la señalización del Ca²⁺ en las mitocondrias, haciéndolas más resistentes a las condiciones poco favorables propias de la I/R (Pape y col., 2022). También los corazones de ratas hipotiroideas presentaron menor frecuencia de aparición de arritmias por I/R (Zhang y col., 2002).

Podría hipotetizarse que la reducción del metabolismo celular actúa como un factor de economía muscular y protección. Sin embargo, la susceptibilidad clínica a la falla diastólica postisquémica en hipotiroideos sugiere que factores externos al corazón como la regulación autonómica podrían contribuir a la disfunción.

4. Antiarrímicos clase III

4.a. Amiodarona

La amiodarona (clorhidrato de 2-butilbenzofuran-3-il 4-[2-(dietilamino) etoxi]-3,5diiodofenil cetona) es un fármaco mundialmente utilizado en clínica, que fue desarrollado

en la década de 1960. En la actualidad es prescrito para el tratamiento de taquiarritmias ventriculares y supraventriculares como también para cuadros de fibrilación auricular. Desde el punto de vista farmacológico, la amiodarona es un antiarrítmico clase III dado que bloquea corrientes de sodio, calcio y potasio con leves efectos antiadrenérgicos. Estos mecanismos le confieren capacidad de prolongar el periodo refractario y disminuir la velocidad de conducción (Singh y Vaughan Williams, 1970).

A pesar de su efectividad como antiarrítmico, el tratamiento con amiodarona acarrea consigo una serie de efectos adversos y tóxicos que pueden motivar la interrupción del tratamiento. Su elevada lipofilia y la de su principal derivado (desetilamiodarona, DEA), producido por N-desalquilación, dan razón a su elevada distribución a tejidos periféricos. Y la presencia de yodo en su molécula le brinda afinidad por la glándula tiroides, sumado a su baja tasa de eliminación (Melmed y col., 1981). Entre los principales efectos adversos encontramos las disfunciones tiroideas, fibrosis hepática, fibrosis pancreática, e incluso fibrosis pulmonar en altas dosis, manifestación que reviste gravedad (Martin y Howard, 1985).

Uno de los efectos adversos presentado por la amiodarona en algunos pacientes sensibles, es el hipotiroidismo. Estudios clínicos mostraron que una dosis diaria de 200 mg de amiodarona, expone a los pacientes a una ingesta de yodo que excede ampliamente la recomendada (150-200 µg/día) dado que la estructura de este antiarrítmico posee yodo (Rao y col., 1986). Como consecuencia de la elevada carga de este elemento se induce una inhibición de la organificación en la glándula tiroides que desencadena frecuentemente hipotiroidismo en pacientes sensibles con tiroiditis autoinmune o incluso, en pacientes eutiroideos sin anomalías tiroideas subyacentes (Basaria y Cooper, 2005). Wiersinga (2009) ha reportado que amiodarona interactúa con los receptores de hormona tiroidea, reduciendo la actividad de ésta.

Adicionalmente, estudios llevados a cabo por Di Matola y colaboradores (2000), encontraron que tanto la amiodarona como su metabolito DEA son citotóxicos para las líneas celulares tiroideas y no tiroideas de manera dependiente de la dosis. Los autores

demostraron que este efecto no está mediado por la modulación de la expresión de las proteínas p53, Bcl-2, Bcl-XL o Bax ni por la generación de radicales libres pero que particularmente amiodarona induce la liberación del citocromo c de las mitocondrias, desencadenando la apoptosis a través de un mecanismo independiente del yodo (Di Matola, 2000). En este sentido, se ha encontrado que un tratamiento prolongado con amiodarona induce una disminución de la expresión de distintas bombas y transportadores como las Ca²⁺ ATPasa en el retículo sarcoplásmico (Bagchi y col., 1987). Estos efectos son similares a los del hipotiroidismo, al igual que ambos incrementan la expresión de las cadenas pesadas de α -miosina (α MHC) y β -miosina (β MHC) (Franklyn y col., 1989). Debido a esta similitud los efectos cardíacos de la amiodarona se atribuyeron a la inducción de un trastorno local similar al hipotiroidismo en el corazón (Eskes y Wiersinga, 2009). Sin embargo, Pantos y col. (2005) han encontrado que amiodarona y su derivado dronedarona potencian la expresión de la SERCA, reduciendo la contractura isquémica.

Varios autores han investigado el efecto de amiodarona cuando se lo administra previo a protocolos de isquemia y reperfusión miocárdica, e incluso, combinado con otras estrategias cardioprotectoras ya probadas como el pre condicionamiento isquémico. Moreau y col. (1999) demostraron que la administración de amiodarona por vía intraperitoneal a ratas Wistar en dosis de 100 mg/kg/día y 50 mg/kg/día durante 5 días, mejoró el flujo aórtico en un 10% y el gasto cardiaco en un 8%, en corazones expuestos a períodos de isquemia de 20 minutos. Los autores atribuyen estos efectos a la capacidad de amiodarona de modificar el ciclo del Ca²⁺ intracelular, aumentando la capacidad captadora de Ca²⁺ por parte de las mitocondrias o incluso, inhibiendo el intercambiador Na/Ca mitocondrial. (Moreau y col., 1999).

En miocitos cardiacos aislados de perro, amiodarona exhibió la capacidad antioxidante de eliminar directamente el radical hidroxilo (•OH) in vitro y ejercer un efecto protector contra el daño mediado por este radical, de manera dependiente de la dosis (Ide y col., 1999). Contrariamente, se le atribuyen efectos oxidativos, dependientes de

la dosis y de la edad del paciente, que serían los causantes del efecto tóxico de fibrosis pulmonar por acumulación (Betiu y col., 2021).

Por otro lado, Varbiro y col. (2003b) mostraron que el efecto de la amiodarona es dependiente de su dosis y concentración plasmática, mostrando así un efecto dual: positivo a concentraciones bajas (hasta 30 mM) y deletéreo a concentraciones mayores (superiores a 30 mM). Sin embargo, estos efectos no fueron exhibidos por su metabolito DEA, el cual muestra efectos antiarrítmicos similares a su precursor, pero tóxicos en tejidos periféricos a todas las concentraciones ensayadas (Varbiro y col., 2003a). Los autores mostraron que la administración intraperitoneal a ratas Wistar de amiodarona en dosis 20 mg/kg, 30 minutos previo a la extirpación del corazón, y la instauración de los protocolos de I/R miocárdica, mejoró la eficiencia de utilización del fosfato inorgánico y fosfatos de alta energía. Adicionalmente, amiodarona mostró propiedades desacoplantes que mejoraron el consumo de oxígeno mitocondrial, inhibió la liberación de factores inductores de la apoptosis, estabilizó el potencial de membrana mitocondrial, retrasó significativamente la disminución de la [ATP] durante la isquemia y mejoró su recuperación durante la reperfusión. Acompañando a estos efectos, inhibió el hinchamiento mitocondrial inducido por Ca2+ (de manera similar a la Ciclosporina A) e inhibió la formación del poro mPTP por un mecanismo diferente a Cys-A (Varbiro y col., 2003b).

Por otro lado, Koo y col. (2006), evaluaron los efectos de amiodarona en dosis de 0.1 nmol/litro cuando se la agregó al medio de perfusión de los corazones de rata expuestos a un modelo isquemia global por disminución de flujo (a 0.3 ml/min) y precondicionamiento isquémico (PCI). En estos experimentos, los autores encontraron que el PCI y la amiodarona por sí solos redujeron la contractura diastólica ventricular izquierda, disminuyendo el tamaño de infarto y la duración de las arritmias durante la reperfusión en comparación con el grupo sin tratamiento. Sin embargo, cuando se administró amiodarona después del PCI, todos los efectos benéficos se vieron atenuados. Esta pérdida de cardioprotección fue atribuida a una posible interacción

entre los dos mecanismos de protección, dado que el PCI protege vía la activación de los canales KATP tanto mitocondriales como sarcolemales, y este efecto es potencialmente abolido por las propiedades antiarrítmicas de la amiodarona (Koo y col., 2006). En esta Tesis fue de interés evaluar más profundamente su mecanismo cardioprotector en ratas eutiroideas y la influencia del hipotiroidismo en su efecto.

A nivel clínico, un estudio retrospectivo de seguimiento de 354 pacientes tratados con amiodarona durante 48 meses encontró que quienes desarrollaron hipotiroidismo inducido por amiodarona tenían un riesgo más alto de infarto de miocardio (4.1% vs. 0.4%) en comparación con los pacientes que permanecieron eutiroideos (Yiu y col. 2009).

Dados los efectos controversiales que se reportaron acerca de amiodarona en la recuperación post-isquémica, y que el hipotiroidismo es considerado un factor de riesgo cardíaco, interesa profundizar sobre los efectos y mecanismos de amiodarona sobre el miocardio post-isquémica eutiroideo e hipotiroideo.

4.b. Dronedarona

La dronedarona, N-(2-butil-3-(p-(3-dibutilamino-propoxi)-benzoil)-5-benzofuranil) metanosulfonamida, es un fármaco antiarrítmico desarrollado para superar los efectos adversos y la toxicidad tiroidea y pulmonar asociadas a la amiodarona. La diferencia entre ellos radica principalmente en que la dronedarona no contiene yodo en su estructura. Clínicamente, este fármaco se usa para tratar cuadros de fibrilación auricular y flutter (aleteo) auricular en pacientes de bajo riesgo (Hohnloser y col., 2004). Sin embargo, en pacientes con insuficiencia cardíaca severa o disfunción ventricular izquierda, dronedarona podría estar asociado con un mayor riesgo de muerte (Khatofer y col., 2005).

Al igual que amiodarona, dronedarona se clasifica en el grupo o clase III de agentes antiarrítmicos propuesta por Vaughan-Williams, ya que presenta características mixtas de bloqueo de canales iónicos cardíacos, que prolongan la duración del potencial de acción. Éstos incluyen el bloqueo de corrientes de potasio, corrientes de sodio y corrientes de calcio tipo L en cardiomiocitos aislados (Varro y col., 2001; Kathofer y col., 2005). Adicionalmente, exhibe propiedades antiadrenérgicas (Chatelain y col., 1995).

De acuerdo con los resultados de diversos ensayos clínicos, presenta efectos adversos de índole gastrointestinal como náuseas, vómitos y diarrea, siendo éstos la principal causa de abandono de la terapéutica (Toubol y col., 2003). Por otro lado, tiene las ventajas de no producir efectos significativos sobre la función tiroidea, y tampoco se ha observado toxicidad pulmonar, hepática u ocular en humanos.

En estudios realizados en ratas por Jiang y col. (2016), la dronedarona (120 mg/kg/día oral) indujo hipertiroidismo en una etapa temprana, pero a su vez causó hipotiroidismo en etapas tardías (amiodarona causó hipotiroidismo durante todo el experimento). Wiersinga (2009) ha reportado que dronedarona interactúa con los receptores de hormona tiroidea. También se encontró que dronedarona puede dañar la glándula tiroides ya que se pudo observar presencia de células epiteliales foliculares dañadas en las ratas tratadas con este fármaco, como así también se observó dislipemia y aumento en los niveles de colesterol total, LDL-c y HDL-c (Jiang y col., 2016). Karkhkanis y col. (2018) investigaron el efecto de dronedarona (y su metabolito principal: N-desbutildronedarona) en mitocondrias de cardiomiocitos de ratas. La dronedarona fue capaz de inhibir el complejo mitocondrial 1 y de desacoplar la cadena transportadora de electrones (efecto compartido por amiodarona), es decir que puede producir toxicidad mitocondrial. Los autores encontraron, además, que es capaz de desregular el metabolismo del ácido araquidónico y así incrementar la susceptibilidad a la hipertrofia cardíaca, a la lesión celular en condiciones de estrés, llegando a provocar la apoptosis (Karkhkanis y col., 2018). Por otro lado, Watanabe y Kimura (2008) estudiaron el efecto de la administración aguda de dronedarona en el funcionamiento del intercambiador

Na⁺/Ca²⁺ (NCX) en células ventriculares cardíacas de cobayos. Los resultados mostraron que dronedarona inhibió al NCX de una manera dependiente de la concentración (Watanabe y Kimura, 2008).

Pantos y col. (2002) evaluaron el efecto de la administración oral de dronedarona 30 mg/kg/dia durante dos semanas a ratas Wistar macho cuyos corazones fueron expuestos a protocolos de I/R. Después de 20 minutos de isquemia global por corte de flujo y 45 minutos de reperfusión, los corazones mostraron una tendencia hacia el aumento en la recuperación contráctil postisquémica. Al extender el periodo de isquemia a 30 minutos no se encontraron diferencias significativas en la recuperación contráctil o la contractura diastólica en comparación con los corazones control (Pantos y col., 2002). A dosis mayores (90 mg/kg), la administración de dronedarona durante 2 semanas a ratas Wistar redujo la frecuencia cardiaca y el peso de los animales que la recibieron en comparación a los animales que no. Asimismo, una vez instaurada la isquemia por corte de flujo de 20 minutos, la contractura diastólica resultó significativamente menor y, durante la reperfusión de 45 minutos, disminuyó la disfunción diastólica junto a una marcada disminución de la liberación de lactato deshidrogenasa cardiaca. lo que indica una disminución de la extensión de la lesión miocárdica en aquellos corazones de animales tratados y en comparación a los controles que no recibieron tratamiento alguno (Pantos y col., 2005). Por último, en corazones de cerdos anestesiados expuestos a isquemia por hipoperfusión coronaria de 90 minutos y 120 minutos de reperfusión el pretratamiento con dronedarona (2.5 mg/kg, en infusión directa) redujo el tamaño de infarto en un 10% (Skyschally y col., 2011). En esta Tesis fue de interés evaluar más profundamente su mecanismo cardioprotector en ratas eutiroideas e hipotiroideas.

5. Energética Cardíaca

Se llama "Energética cardíaca" al estudio del balance entre la producción y utilización de energía en el corazón, tanto en condiciones de reposo como de actividad, y de cómo estos procesos se ven afectados por diferentes condiciones (fisiológicas, fisiopatológicas o farmacológicas). Entre otros métodos, la energética cardíaca puede evaluarse mediante calorimetría, que es una metodología fisicoquímica que permite estudiar los procesos y fenómenos biológicos de intercambio de energía en forma de calor.

5.a Desarrollo del método calorimétrico

Los primeros estudios de calorimetría se realizaron en músculo esquelético por Helmholz y Hill durante la primera mitad del siglo XX (Hill, 1965). Sin embargo, medir el calor en tejidos tan pequeños y en constante movimiento como el corazón fue tan complejo que recién entrados los años 60 fue posible el estudio en pequeños trozos de músculo cardíaco, como el músculo papilar de pequeños mamíferos (conejos, ratas) apoyados en un dispositivo de termopila (Gibbs y col., 1967). Estas mediciones requerían que las muestras fueran muy delgadas para asegurar una oxigenación adecuada. Además, para medir el calor liberado, era necesario drenar brevemente la termopila, lo cual generaba un artefacto eléctrico en el registro y una pequeñísima hipoxia (Gibbs y col., 1967).

Posteriormente, Chapman y Gibbs (1972) adaptaron el formalismo introducido por Hill para analizar el calor liberado en la contracción del músculo esquelético, en el cual están separadas las señales calóricas de la recuperación metabólica respecto al calor liberado por los procesos contráctiles a bajas temperaturas. Definieron así el calor inicial (IH) como la suma del calor de activación independiente de la tensión (TIH) y el

calor dependiente de la tensión (TDH), determinando el primero por estiramiento de la fibra esquelética. Sin embargo y como el músculo cardíaco no puede estirarse más allá de su longitud óptima (ya que se produciría un daño irreversible) se desarrollaron estrategias para medir el TIH, utilizando calorimetría de termopila en músculos papilares delgados: la técnica de pre-acortamiento, el uso de soluciones hipertónicas o compuestos cardiopléjicos como butanodiona monoxima (BDM), entre otras (Gibbs y col., 1967; Gibbs y col., 1988; Alpert y col., 1989). Aún así, los valores absolutos del flujo de calor liberado por el músculo cardíaco en condiciones de reposo (metabolismo basal) eran difíciles de estimar debido a la inestabilidad de la línea base.

Por otra parte, en el corazón de perro entero in situ Neill y colaboradores (Neill y col., 1961), calcularon el calor liberado a partir de la velocidad de circulación sanguínea y las diferencias de temperatura. Luego, se adaptó la técnica a corazones aislados perfundidos por el método de Langendorff (McDonald y col., 1971). Más tarde se desarrolló una técnica de microcalorimetría de flujo para medir el metabolismo basal y activo en trabéculas pequeñas del corazón de cobayo (Daut y Elzinga, 1988) que, aunque fue superadora de las técnicas anteriores, no podía medir simultáneamente la fuerza desarrollada. Muchos años después, se mejoró esta técnica para medir en simultáneo el calor asociado a las diversas etapas de la contracción isotónico e isométrica en papilar de cobayo (Taberner y col., 2005; Han y col., 2009).

En relación a la metodología empleada en esta Tesis, el sistema calorimétrico se desarrolló en 1982 en la Universidad de California (UCLA) y permite mediciones simultáneas del flujo de calor y de la presión intraventricular en preparaciones perfundidas arterialmente con perfusión fisiológica (lo que soluciona el problema de la restricción de oxígeno) (Ponce-Hornos y col., 1982). Este sistema también permite la medición continua aún en condiciones de no-flujo, siendo el único tipo de calorímetro que permite realizar el modelo de isquemia por corte de flujo y reperfusión. Además, posibilita recoger el efluente para analizar la producción de lactato, lo cual es útil para cuantificar el metabolismo anaeróbico. Posteriormente, el sistema fue adaptado para la

identificación de las fracciones del calor total de una contracción cardíaca, sea en condición de latido aislado sobre el flujo de calor de reposo (Hr), como en un latido dentro de una condición de estimulación estacionaria, detectando 4 fracciones asociadas a la contracción que componen el calor activo (Ha): calor de "binding" de Ca²⁺, calor de remoción activa de iones (ambos integrando el TIH), calor dependiente de tensión (TDH) y calor asociado al metabolismo de recuperación (Ponce-Hornos y col., 1995; Consolini y col., 1997). Años más tarde, otro sistema calorimétrico artesanal fue realizado para nuestro laboratorio GFEYEC, a fin de emplearlo en condiciones más fisiológicas de frecuencia de estimulación y generación de diversos modelos de isquemia y reperfusión (I/R) (Consolini y col., 2007). Este último sistema calorimétrico de flujo es el que empleé en esta Tesis.

En la actualidad la energética muscular cardíaca se resume en una ecuación basada en la primera ley de la termodinámica, donde el cambio de entalpía (ΔH) es la suma del calor liberado (Q) y el trabajo externo (W, que es 0 cuando el músculo se contrae isométricamente). El calor liberado se divide en calor basal (QB), calor de activación o TIH (QA) y calor dependiente de la fuerza o TDH (QF).

$$\Delta U \approx \Delta H = Q + W = QB + QA + QF + W$$

Cada una de las fracciones de calor indicadas puede asociarse a diferentes procesos que tienen lugar en un tejido cardíaco funcional.

5.b Metabolismo activo y metabolismo basal

El metabolismo cardíaco puede ser entendido y abordado como la suma de dos componentes básicos: el metabolismo basal que representa la energía necesaria para mantener las funciones celulares básicas en ausencia de contracción; y el metabolismo activo que involucra la serie de procesos del ciclo de excitación-contracción-relajación y conlleva un gran gasto de energía (Gibbs y Chapman., 1979).

El metabolismo basal se refiere a la energía que consume el corazón en estado de reposo o quiescencia, es decir, cuando no hay actividad contráctil. Esta energía se manifiesta como calor liberado por el músculo cardíaco sin latir, conocido como flujo de calor de reposo (Hr). Para ser medido, el corazón debe ser despojado de toda actividad contráctil, ya sea eliminando la actividad espontánea o utilizando una solución cardiopléjica con alta concentración de potasio (Loiselle y Gibbs, 1979). Al momento de señalar qué eventos liberan calor, el metabolismo basal incluye una serie de procesos exotérmicos que mantienen la homeostasis iónica y energética. En particular, incluye el bombeo de iones a través de la membrana celular por la Na⁺,K⁺-ATPasa, y la actividad de los transportadores de calcio que mantienen las concentraciones intracelulares en su rango fisiológico, como el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal (NCX) y las Ca-ATPasas de sarcolema y del retículo sarcoplásmico (SERCA2), y el metabolismo basal mitocondrial. Distintos factores se ha descrito que pueden influir en el Hr como lo son la especie utilizada, la temperatura del medio, el sustrato metabólico utilizado, y las concentraciones de calcio o sodio extracelulares (Bonazzola y Takara, 2010; Ponce-Hornos y col., 1987; Marquez y col., 1997; Consolini y col., 2011).

En términos del metabolismo activo, la energética nos da herramientas para estimar la fracción de calor liberado en cada contracción. Se le llama calor activo (Ha) a la energía asociada a una contracción cardíaca individual y representa el gasto energético del corazón durante el ciclo de excitación-contracción-relajación. El Ha puede calcularse a partir de la diferencia entre el flujo de calor total (Ht) y el flujo de calor en reposo (Hr) (ambos se suelen expresar en mW= mJ/s) mediante la siguiente ecuación: Ha = (Ht – Hr) / HR, donde HR es la frecuencia cardíaca en 1/segundos y Ha resulta expresado en mJ.

A su vez, el Ha está compuesto de 2 fracciones principales:

- un componente de calor independiente de la tensión o TIH (asociado principalmente a la hidrólisis de ATP para transporte activo de iones como sodio y calcio que incluye la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa y del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal (NCX) y de las Ca-ATPasas del SL y RS; a la unión de Ca²⁺ a la troponina C y a los cambios conformacionales en los filamentos delgados),
- otro componente de calor dependiente de la tensión o TDH (asociada a la hidrólisis de ATP producida en la interacción actomiosínica y a la generación de fuerza durante la contracción, incluyendo la recuperación de esa energía mediante la fosforilación oxidativa acoplada a la actividad de la membrana mitocondrial que involucra liberación de calor (componente mixta).

A diferencia del músculo esquelético, en el músculo cardíaco no se puede separar claramente el calor independiente de la tensión (TIH) y el calor dependiente de la tensión (TDH) del componente de calor de recuperación metabólica, ya que el corazón está constantemente recuperando el ATP consumido para mantener los ciclos periódicos de contracción y relajación (Gibbs y col., 1967; Gibbs y col., 1979; Gibbs y col., 1988; Loiselle, 1987; Ponce-Hornos y col., 1995).

5.c Aplicación de la energética cardiaca al estudio en modelos de corazones aislados expuestos a I/R

La relevancia del empleo de la energética cardiaca y la calorimetría en estudios de isquemia y reperfusion radica en la sensibilidad que provee esta técnica para detectar cambios en el metabolismo del musculo cardiaco y en el manejo del calcio, tanto en reposo como en actividad. Estos cambios pueden ser indicadores tempranos de disfunción celular, incluso antes de que se manifiesten alteraciones en la contractilidad (Consolini y col., 2017)

Con el parámetro P/Ht, definido como la economía muscular total, podemos evaluar la eficiencia con la que el corazón convierte la energía en trabajo mecánico. En condiciones normales, esta relación se mantiene relativamente constante, pero durante la isquemia y la reperfusión, esta relación se ve alterada (Consolini y col., 2001). La evaluación de la P/Ht permite determinar si la condición es más o menos favorable para la función cardíaca e incluso detectar signos tempranos de disfunción, ya que la economía muscular (P/Ht) puede verse reducida aún cuando la contractilidad puede mantenerse sin cambios, indicando un mayor gasto energético para el mismo nivel de trabajo mecánico. Adicionalmente, los cambios en el Ht y P/Ht pueden indicar alteraciones en la función mitocondrial siendo que las mitocondrias juegan un papel clave en la producción de energía y el manejo del calcio, por lo que su disfunción es un componente importante en la disfunción por I/R (Consolini y col., 2007; Ragone y Consolini, 2009; Ragone y col., 2013; Ragone y col., 2015).

A diferencia de otras técnicas, la calorimetría nos permite realizar mediciones continuas durante todo el ciclo de isquemia y reperfusión y el efecto de intervenciones terapéuticas dándonos un entendimiento más profundo de la dinámica de los cambios energéticos y de manejo de calcio en tiempo real. La evaluación calorimétrica proporciona una visión integral de la respuesta del músculo cardíaco a condiciones adversas, permitiendo detectar alteraciones metabólicas, de manejo de calcio y de función mitocondrial que no se evidencian solamente con mediciones de la contractilidad. Esto es crucial para comprender la fisiopatología de la isquemia y reperfusión, así como para desarrollar terapias más efectivas (Consolini y col., 2017).

HIPÓTESIS

- 1- Dado que el hipotiroidismo reduce el metabolismo mitocondrial miocárdico, eso afectaría la homeostasis de Ca²⁺ dependiente de la interacción mitocondrias-retículo sarcoplásmico, con consecuencias mecánicoenergéticas en la reperfusión.
- 2- Basado en que el antiarrítmico amiodarona puede inducir hipotiroidismo debido a su estructura iodada, sus efectos en el corazón postisquémico podrían ser aditivos a los de dicho estado; en cambio los efectos mecánicoenergéticos de la dronedarona (otro antiarrítmico de similar estructura y mecanismo pero que carece de átomos de iodo en su molécula) producirían menor interacción con el hipotiroidismo en la disfunción por isquemia/reperfusión (I/R).
- 3- Puesto que estos dos antiarrítmicos son inhibidores de corrientes de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ podrían producir cambios en las cascadas intracelulares influenciadas por dichos iones, que se activan o inhiben durante un episodio de I/R (PKC, PI3K/Akt, NOS, mKATP).
- 4- Los efectos del hipotiroidismo y el rol de la iNOS en el corazón postisquémico podrían diferir con el grado de isquemia, y/o con el tratamiento con los fármacos antiarrítmicos evaluados.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Estudiar la influencia del hipotiroidismo en el comportamiento mecánicoenergético y en la homeostasis de calcio durante la isquemia y reperfusión miocárdica (I/R) en modelos de atontamiento moderado y severo.

Evaluar la participación mitocondrial "in situ" en interacción funcional con el retículo sarcoplásmico (RS) y el citosol en cardiomiocitos de ratas eutiroideas e hipotiroideas.

Estudiar los efectos de los antiarrítmicos clase III, amiodarona y dronedarona, en ratas eutiroideas e hipotiroideas sobre la disfunción miocárdica contráctil y energética post-isquémica, y sus mecanismos de acción.

Objetivos específicos

Caracterizar el comportamiento mecánico-energético de corazones aislados de *rata hipotiroidea* en los modelos de I/R de atontamiento moderado y severo, y los mecanismos subyacentes con el uso de bloqueantes selectivos de vías celulares (PI3K, PKC, NOS y transportadores mitocondriales).

Estudiar los cambios en las concentraciones de Ca²⁺ en compartimentos celulares como citosol y mitocondrias, en *cardiomiocitos aislados de rata hipotiroidea* con protocolos que evalúen la relación funcional mitocondrias/RS

Evaluar los efectos del *tratamiento oral subagudo de amiodarona* en ratas eutiroideas e hipotiroideas, cuyos corazones aislados se exponen a un modelo de I/R severo, y los mecanismos de acción responsables de la cardioprotección (NO-sintasas, PI3K-Akt, PKC, mKATP y ROS).

Comparar los efectos de los 2 antiarrítmicos *amiodarona y dronedarona perfundidos* en los corazones aislados de ratas eutiroideas e hipotiroideas, evaluando la recuperación mecánico-energética durante la I/R miocárdica, y los mecanismos de protección o falta de ella (NOS, mKATP, ROS).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparados biológicos

1.a. Animales de experimentación empleados

Todos los protocolos realizados en esta Tesis se llevaron a cabo con ratas Wistar, de ambos sexos, provenientes de los bioterios de la Facultad de Ciencias Exactas, la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y del bioterio del IATIMET-Facultad de Medicina UBA-CONICET.

Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Cátedra de Farmacología bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 hs, a temperatura controlada de 25°C durante todo el año, y abastecidos con alimento y agua acidulada ad libitum.

Los procedimientos y condiciones descritas anteriormente fueron realizados en concordancia con las normas de cuidado, uso, sujeción, anestesia y eutanasia aceptados internacionalmente (NIH 85-23, 1996 y 2010; Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU) con la aprobación del CICUAL (Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio) de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP en los protocolos 015-05-15 (renovado en 2019) y 005-43-2023.

1.b. Tratamientos in vivo en ratas Wistar

El hipotiroidismo se indujo en un grupo de ratas Wistar (HipoT) por administración de metimazol al 0,02 % p/v en el agua de bebida durante 15 días anteriores al sacrificio de los animales (Venditti y col., 2004; Ragone y col., 2020).

Amiodarona se administró en el agua de bebida durante 1 semana, calculando la dosis de 30 mg/kg/día (Pantos y col., 2002). Carvedilol se administró también en el

agua de bebida a la dosis de 20 mg/kg/día durante 1 semana (Yuan y col., 2004). Amiodarona y carvedilol se administraron tanto a ratas eutiroideas como a las hipotiroideas, en éstas durante la segunda semana en que recibían también metimazol.

1.c. Corazones aislados de rata

Las ratas Wistar de ambos sexos (250-400 g; 2-4 meses) eutiroideas (EuT) e hipotiroideas (HipoT) fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (40 mg/kg vía intraperitoneal) y tratadas con heparina sódica (2000 UI, vía intraperitoneal), y con tramadol (5-10 mg/kg, vía subcutánea) para lograr analgesia profunda. Una vez detectada la pérdida de reflejo palpebral y del tono muscular esquelético, el corazón fue rápidamente removido por toracotomía y sumergido en solución Krebs. Además, se extrajeron alícuotas de sangre para la determinación de hormonas tiroideas.

El corazón fue inmediatamente perfundido con solución Krebs (ver composición en apartado 9) de forma retrógrada desde la aorta hacia las arterias coronarias mediante la técnica de Langerdorff, a un flujo constante de 7 ml/min/g mediante una bomba peristáltica Gilson Minipuls (France) (Ponce-Hornos y col., 1995; Consolini y col., 2001; Consolini y col., 2004; Consolini y col., 2007; Ragone y Consolini, 2009; Ragone y col., 2015; Ragone y col., 2020). Dicho flujo de perfusión basal fue calculado de acuerdo a lo recomendado para prevenir el edema miocárdico bajo perfusión de solución salina, que suele ocurrir a más altos flujos según la siguiente ecuación CF= 7.43 x HW^{0.56} (donde CF es el flujo coronario y HW es el peso del corazón) (Dhein y Mohr, 2005).

A continuación, se removieron ambas aurículas mediante pequeños y cuidadosos cortes y se eliminó todo rastro de contracciones espontáneas. Luego se introdujo un balón de látex desinflado conectado a cánula con agua en el ventrículo izquierdo, y mediante una sutura se procedió a cerrar la cavidad ventricular. La cánula con agua se conectó con un transductor de presión (Bentley DEL900, Nevada, USA),

destinado a medir la presión intraventricular izquierda (LVP). El corazón perfundido fue colocado en el interior de la cámara de un calorímetro de flujo artesanal (Ponce-Hornos y col., 1982; Consolini y col., 2007). Se colocaron dos electrodos (uno en el ápice y otro en el ventrículo derecho), se procedió al cierre del dispositivo y se sumergió en un baño termostatizado a 37 ± 0.01 °C (mediante circuito equilibrado con un baño Lauda y con otro baño que contenía los matraces para perfusión y la bomba impulsora). Los corazones fueron estabilizados a frecuencia constante de 3 Hz, con estímulo eléctrico umbral de 1 a 5 V - 9 ms mediante un estimulador eléctrico (Letica 12406).

1.d. Aislamiento de cardiomiocitos de rata

Las ratas Wistar (250 – 400 g, ambos sexos) EuT e HipoT fueron anestesiadas y heparinizadas (sobredosis de pentobarbital 40 mg/kg vía intraperitoneal, tramadol 5-10 mg/kg, vía subcutánea y heparina sódica 2000 UI, vía intraperitoneal) y su corazón fue removido por toracotomía. Seguidamente se perfundió mediante la técnica de Langendorff durante 5 minutos con solución Krebs modificada libre de Ca²⁺, mantenida a 35-37°C y burbujeada con oxígeno (ver composición en apartado 9). Posteriormente, se perfundió solución Krebs modificada conteniendo 50 µM CaCl₂, 0.1 mg/mL de colagenasa P (Roche) y 0.02 mg/mL protease XIV (Sigma-Aldrich, USA), durante 13 minutos (Consolini y col., 2011; Ragone y col., 2013, Ragone y col., 2015). A continuación, las enzimas se lavaron durante 5 minutos con la solución Krebs modificada conteniendo 50 µM CaCl₂. Finalmente, los ventrículos fueron removidos, cortados en piezas y agitados suavemente en la solución de bajo-Ca²⁺ durante 10 min y luego separados. La concentración de Ca²⁺ de la solución salina fue incrementada secuencialmente hasta una concentración de 1 mM y los miocitos fueron mantenidos en ella hasta la medición de las señales fluorométricas.

2. Mediciones mecánico-calorimétricas en corazones perfundidos

En las preparaciones de corazón aislado, el balón intraventricular izquierdo conectado mediante cánula con agua al transductor de presión (Bentley DEL900) fue regulado hasta obtener el volumen diastólico óptimo. Para ello, mientras el corazón estaba estimulado eléctricamente, el volumen del balón se aumentó progresivamente en pequeños pasos cada 5 minutos, hasta que en dos sucesivos aumentos no se incrementara la máxima presión desarrollada durante la contracción (P). Se cuidó que la presión diastólica del ventrículo izquierdo (LVEDP) en el inicio no excediera los 30 mm Hg. El transductor de presión se calibró (en mm Hg) antes de cada experimento. El volumen diastólico obtenido se mantuvo durante todo el experimento para comparar efectos durante todo el protocolo. La señal de LVP se amplificó y se registró simultáneamente con la señal de flujo de calor, en un sistema de adquisición de 2 canales (PowerLab 2/26, AD Instruments, Australia). A partir del registro continuo de presión intraventricular izquierda (LVP) se calcularon la máxima presión desarrollada en cada contracción (P) y los cambios en la presión diastólica con respecto a la condición pre-isquémica obtenida con solución Krebs-C (ΔLVEDP), ambas en mm de Hg. Para comparar los efectos de los diversos tratamientos durante la isquemia y la reperfusión, la P también fue expresada como el porcentaje del valor pre isquémico inicial durante la estabilización en solución Krebs-C. Además, se calcularon las máximas velocidades de contracción (+dP/dt) y relajación (-dP/dt) a partir de los máximos y mínimos de la primera derivada del registro de LVP de cada contracción, que luego se normalizaron por la máxima presión desarrollada P (+P= +dP/dt/P y -P= -dP/dt/P, respectivamente).

3. Calibración y estabilización del calorímetro

El calorímetro está constituido por una gran masa de cobre con una cámara interna delimitada por 2 módulos de cerámica paralelos, con 127 unidades termosensibles cada uno, que registran las variaciones de temperatura entre el interior de la cámara y el baño externo de temperatura constante. Mediante este método puede medirse continuamente el flujo de calor liberado (Figura 1).

Un día antes de cada experimento se procede a encender el sistema termostatizante del baño del calorímetro regulado a 37 ± 0.01 °C, colocando las soluciones de perfusión (solución Krebs, ver composición en apartado 9) de forma tal de obtener una temperatura uniforme en todo el sistema. El efluente de perfusión es drenado por medio de una manguera ajustada al exterior inferior del baño calorimétrico, donde puede controlarse su flujo. El día del experimento se calibra el equipo, tanto el canal que registra la presión intraventricular como aquel que registra el flujo de calor liberado.

Antes y después de la colocación del músculo en la cámara se registró el flujo de calor debido a la perfusión y al corte de la misma, que se utilizan como líneas de base de los respectivos períodos en cada experimento. La calibración del calorímetro se realizó mediante la inyección de una potencia constante de 2 mW (a frecuencia de 2.1 Hz y voltaje subumbral de 1 volt) a través del mismo músculo que actúa como resistencia, o eventualmente de una resistencia eléctrica de 1000 ohm ubicada en el interior del calorímetro. Así se obtuvo un factor de calibración (en mW/V) en condiciones de presencia y ausencia de perfusión. La señal de flujo de calor fue amplificada y registrada simultáneamente con la de presión intraventricular mediante el equipo Power Lab 2/26 (AD Instruments, New South Wales, Australia).



Figura.1: Foto del calorímetro de flujo y del corazón montado en la cámara interna (izquierda), del momento de ser sumergido en el baño termostatizado (centro) y esquema de la estructura del calorímetro de flujo (derecha), que fue utilizado en los protocolos mecánico-calorimétricos en esta Tesis.

4. Protocolos para la evaluación contráctil y calorimétrica

4.a. Evaluación de los efectos del hipotiroidismo en corazones expuestos a isquemia moderada y reperfusión (I/Rm)

Luego de un período de estabilización con Krebs-C, los corazones de ratas **eutiroideas (EuT)** estimulados eléctricamente fueron expuestos a isquemia por corte de flujo durante 20 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C (modelo de I/R moderada, I/Rm). Para evaluar los mecanismos de acción, diversos grupos recibieron los siguientes tratamientos durante 15 min previo a la isquemia (Figura 2)

- (1) C (Krebs-C),
- (2) C/C + 10 mmol/L clonazepam (Clzp, para inhibir el intercambiador sodio/calcio mitocondrial, mNCX) (Cox y Matlib, 1993).
- (3) C/C + 100 μmol/L 5-hidroxi-decanoato (5-HD, para inhibir el canal de potasio ATP dependiente mitocondrial, mKATP) (Garlid y col., 1997).
- (4) C/ Isquemia/reperfusión moderada con Krebs-36 mM Na⁺-10 mM cafeína (para liberar el Ca²⁺ del RS sin eflujo vía NCX) (Ragone y Consolini, 2009).

0		4	0 6	50 105
	Kreb	s-C	Isquemia	Reperfusión
0	25	5 40) 6	60 105
	Krebs-C	Clzp	Isquemia	Reperfusión
	Krebs-C	5-HD	Isquemia	Reperfusión
	Kreb	s-C	Isquemia	Reperfusión-36 mM Na*-10 mM cafeína

Figura 2: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata EuT expuestos a l/Rm.

El mismo procedimiento experimental de I/Rm, con isquemia por corte de flujo de 20 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C, se aplicó en corazones de **ratas hipotiroideas** (HipoT), los que recibieron los siguientes tratamientos previos (Figura 3):

- (1) C (Krebs-C),
- (2) C/C + 10 mmol/L Clzp (para inhibir el mNCX)
- (3) C/C + 10 mmol/L Clzp + 0.2 mmol/L ciclosporina-A (Cys-A, bloqueante del poro de permeabilidad mitocondrial, mPTP) y reperfundido con C + Cys-A (Ragone y Consolini, 2009).
- (4) C/C + 100 µmol/L 5-HD (para bloquear los canales mKATP).
- (5) C/ Isquemia/reperfusión moderada con Krebs-36 mM Na⁺-10 mM cafeína (para liberar el Ca²⁺ del RS sin eflujo vía NCX) (Ragone y Consolini, 2009)



Figura 3: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata HipoT expuestos a I/Rm.

4.b. Evaluación de los efectos del hipotiroidismo en corazones expuestos a isquemia severa y reperfusión (I/Rs)

Los controles del modelo de isquemia severa (I/Rs) fueron realizados con corazones de **ratas eutiroideas** que fueron expuestos a isquemia por corte de flujo de 30 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C. Los tratamientos ensayados durante 15 min previos a la I/Rs fueron los siguientes (Figura 4):

- (1) C (Krebs-C),
- (2) C/C + 0.2 mmol/L Cys-A y reperfundido con C + Cys-A (para bloquear el mPTP).
- (3) C/C + N-(-2-mercaptopropionil) glicina 2 mM, (MPG, scavenger de ROS) y reperfundido con C + MPG 2 mmol/L (Becerra y col., 2016),
- (4) C/C + 30 µmol/L N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, bloqueante no selectivo de las óxido-nítrico sintasas, NOS),
- (5) C/C + 30 μmol/L aminoguanidina (AG, bloqueante selectivo de la óxido nítricosintasa inducible, iNOS) (Jeddi y col., 2018),
- (6) C/C + 100 µmol/L 5-HD (para bloquear los canales mKATP),
- (7) C/C + 10 mmol/L Clzp (para bloquear el mNCX),

(8) C/C + 30 nmol/L adrenalina (Adre).



Figura 4: Esquema reperesentativo de los protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata EuT expuestos a I/R severa.

Para estudiar los mecanismos implicados en el efecto del HipoT durante la I/Rs, los corazones **de ratas hipotiroideas** recibieron los siguientes tratamientos durante 15 min previo a la isquemia de 30 minutos (Figura 5):

- (1) C/C (Krebs-C),
- (2) C/C + 30 µmol/L L-NAME (para inhibir NOS),
- (3) C/C + 100 µmol/L aminoguanidina (para inhibir iNOS),
- (4) C/C + 10 mmol/L nitroprusiato sódico (Nitrop, dador de óxido nítrico endotelial),
- (5) C/C + 100 μmol/L wortmanina (Wrt, inhibidor selectivo de la fosforilación de PI3K)
 (Vincent y col., 2017),
- (6) C/C + 100 μmol/L celeritrina (Che, un inhibidor de la proteín kinasa C, PKC)
 (Ciocci Pardo y col., 2021),
- (7) C/C + 100 µmol/L 5-HD (para inhibir los canales mKATP),

(8) C/C + 10 mmol/L Clzp (para inhibir mNCX),

(9) C/C + 30 nmol/L Adrenalina (Adre),

(10) C/C + 30 nmol/L Adre + carvedilol (Cvd, beta bloqueante de tercera generación).

0		4	0 /	U I
	Krebs-	с	Isquemia	Reperfusión
0	20	40) 7	0 1
Krebs	-C	L-NAME	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	AG	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	Nitrop	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	Wrt	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	Che	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	5-HD	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	Clzp	Isquemia	Reperfusión
Krebs	-C	Adre	Isquemia	Reperfusión
Cvd-oral 0	20	40) 7	0 1
Krebs	.c	Adre	Isquemia	Reperfusión

Figura 5: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata HipoT expuestos a I/R severa.

4.c. Evaluación de los efectos de amiodarona oral en corazones EuT e HipoT expuestos a I/Rs.

Luego de un período de estabilización con Krebs-C, los corazones de ratas eutiroideas que habían recibido amiodarona 30 mg/Kg/día en el agua de bebida

durante 7 días fueron expuestos al protocolo de I/R severa, recibiendo los siguientes tratamientos durante 20 minutos previos a la isquemia de 30 minutos (Figura 6):

- (1) C/C (Krebs-C)
- (2) C/C + 30 µmol/L L-NAME (para inhibir las NOS),
- (3) C/C + 30 µmol/L aminoguanidina (AG, para inhibir la iNOS),
- (4) C/C + + 100 µmol/L wortmanina (Wrt, para inhibir la PI3K),
- (5) C/C + 100 µmol/L celeritrina (Che, para inhibir PKC),
- (6) C/C + 100 µmol/L 5-HD (para inhibir los canales mKATP),
- (7) C/C + N-(-2-mercaptopropionil) glicina 2 mM, (MPG, scavenger de ROS) y reperfundido con C + MPG 2 mmol/L.



Figura 6: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de ratas EuT tratadas con Amd oral y expuestos a I/R severa.

Los corazones de **ratas hipotiroideas** tratadas durante 7 días con **amiodarona oral 30 mg/Kg/día** fueron expuestos al modelo de I/R severa, con isquemia por corte de flujo de 30 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C, y recibieron los siguientes tratamientos durante 20 min previo a la isquemia (Figura 7):

- (1) C/C (Krebs-C)
- (2) C/C + 30 µmol/L L-NAME (para inhibir las NOS),
- (3) C/C + 30 µmol/L AG (para inhibir la iNOS),
- (4) C/C + 100 µmol/L 5-HD (para bloquear los canales mKATP),
- (5) C/C + 2 mmol/L MPG y reperfundiendo con C + MPG (*scavenger* de ROS).



Figura 7: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de ratas HipoTtratadas con amiodarona (Amd) oral, y expuestos a I/R severa.

4.d. Evaluación de los efectos de amiodarona perfundida en corazones EuT e HipoT expuestos a I/Rs

Luego de un período de estabilización con Krebs-C, los corazones de **ratas eutiroideas (EuT)** que fueron **perfundidos con amiodarona** (Amd) y recibieron los siguientes tratamientos durante 20 min, se expusieron a I/R severa (isquemia por corte de flujo de 30 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C) (Figura 8):

- (1) C/C (Krebs-C) + Amiodarona 5 µg/L
- (2) C/C + 30 µmol/L L-NAME (5 min) + Amiodarona 5 µg/L+ L-NAME (15 min)
- (3) C/C + 2 mmol/L MPG y reperfundiendo con C + MPG (*scavenger* de ROS).

0	20	40	70	115
Krebs-C	C Amd	Isquemia	Re	perfusión
		-	_	
Krebs-C	Amd+MP	G Isquemia	Reper	fusión+MPG
Krebs-C	Amd+L-NA	ME Isquemia	Rei	perfusión

Figura 8: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata EuT perfundidos con amiodarona (Amd) y expuestos a l/R severa.

El grupo de corazones de **ratas hipotiroideas** (HipoT) fueron tratadas con **perfusión de amiodarona** durante 20 min previos, y expuestos a I/Rs (isquemia por corte de flujo de 30 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C) según el siguiente esquema (Figura 9):

(1) C/C (Krebs-C) + Amiodarona (Amd) 5 µg/L.



Figura 9: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata HipoT perfundidos con amiodarona (Amd) y expuestos a I/R.

4.e. Evaluación de los efectos de dronedarona perfundida en corazones EuT e HipoT expuestos a I/Rs

Luego de un período de estabilización con Krebs-C, los corazones de **ratas eutiroideas (EuT)** fueron **perfundidas con dronedarona** y recibieron los siguientes tratamientos durante 20 min previos a ser expuestos a I/R severa (isquemia por corte de flujo de 30 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C) (Figura 10):

- (1) C/C (Krebs-C) + dronedarona 1 μg/mL (1.69 μmol/L) (la concentración se obtuvo de Kondratieva y col., 2018)
- (2) C/ C + 100 µmol/L 5-HD (5 min) / dronedarona 1 µg/mL + 100 µmol/L 5-HD (15 min) (para bloquear canales mKATP),
- (3) C/C+ 30 μmol/L L-NAME (5 min) / dronedarona 1 μg/mL + 30 μmol/L L-NAME
 (15 min) (para inhibir NOS),
- (4) C/ C + 30 μmol/L AG / dronedarona 1 μg/mL + 30 μmol/L AG (15 min) (para inhibir iNOS).

0	2	20 40) 7	0 115
	Krebs-C	Drd	Isquemia	Reperfusión
_				
	Krebs-C	Drd + 5-HD	Isquemia	Reperfusión
_				
	Krebs-C	Drd + L-NAME	Isquemia	Reperfusión
	Krebs-C	Drd + AG	Isquemia	Reperfusión

Figura 10: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata EuT perfundidos con dronedarona (Drd) y expuestos a I/R severa.

Los corazones de **ratas hipotiroideas** fueron perfundidos con dronedarona y recibieron los siguientes tratamientos durante 20 min previo a ser expuestos a I/Rs (isquemia por corte de flujo de 30 min y reperfusión de 45 min con Krebs-C) (Figura 11):

- (1) C/C (Krebs-C) + dronedarona 1 µg/mL.
- (2) C/ C+ 30 µmol/L L-NAME (5 min) / dronedarona 1 µg/mL + 30 µmol/L L-NAME
 (15 min) (para inhibir NOS).

0	20	40) 7	0 115
Krebs	s-C	Drd	Isquemia	Reperfusión
Krebs	s-C C	Ord + L-NAME	Isquemia	Reperfusión

Figura 11: Protocolos experimentales realizados en corazones aislados de rata HipoT perfundidos con dronedarona (Drd) y expuestos a I/R severa.

5. Microscopía confocal

Los cardiomiocitos aislados como se describió en el apartado 1.d fueron incubados a temperatura ambiente con 12 mmol/L de Fura-4 AM (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, California) durante 15 minutos en un tubo Eppendorf y luego lavado durante un mínimo de 15 min, previos a ser empleados para la medición de la señal de Ca²⁺ citosólico. Otro grupo de cardiomiocitos fue incubado con 3 mmol/L de Rohd-2AM (Molecular Probes/Invitrogen) durante 60 minutos a 4°C y luego lavado durante otra hora a 37°C previo al objetivo de medir la señal de Ca²⁺ mitocondrial.

Una vez que cada alícuota de cardiomiocitos fue cargada con el fluoróforo correspondiente, las células se colocaron en una cámara de perfusión para un microscopio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) y se estabilizaron con Krebs-24 HEPES con 2 mmol/L Ca²⁺. Las células cargadas con Fluo-4 fueron excitadas a 488 nm y la detección fue realizada a 505 nm mientras que las cargadas con Rhod-2 fueron excitadas a 540 nm y detectadas a 560 nm.

Los cambios de fluorescencia fueron medidos en una región seleccionada de interés (ROI) en cada célula. Los datos se registraron cada 20 segundos durante 20 a 25 minutos de protocolo utilizando el software LAS AF Lite versión 2.2.1 de Leica, y expresados como la relación de intensidad de fluorescencia (F/Fo) respecto al punto inicial (Fo). Los cambios en la línea de base (Δ F/Fo) producidos por las intervenciones realizadas fueron calculados luego de trazar una línea de base obtenida por el ajuste no-lineal de las señales correspondientes al inicio y final de cada protocolo, cuando se perfundía Krebs-HEPES control (C). Esto se hizo utilizando el programa Origin 8.0 program (OriginLab Corporation. Northampton, Massachusetts).

Cada protocolo fue realizado con 5 a 9 células provenientes de al menos dos corazones diferentes.

Se utilizó un protocolo de perfusión en cardiomiocitos de ratas EuT cargados con Fluo-4 (para medir el calcio citosólico) y otro análogo para las células cargadas con Rhod-2 (para medir el calcio mitocondrial) (Figura 12):

> C (Krebs-C) /C (10 minutos), Krebs-36 mmol/L Na⁺ + 10 mmol/L cafeína (para inducir la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico) (10 minutos), y C (Krebs-C) (5 minutos).

En cardiomiocitos de ratas HipoT cargados con Fluo-4 y con Rhod-2, se ensayaron los siguientes protocolos (Figura 12):

- (1) C (Krebs-C) (10 minutos), Krebs-36 mmol/L Na⁺ + 10 mmol/L cafeína (10 minutos), y C (Krebs-C) (5 minutos).
- (2) C (Krebs-C) (5 minutos), C + 10 mmol/L clonazepam (5 minutos, para inhibir el mNCX), Krebs-36 mmol/L Na⁺ + 10 mmol/L cafeína + clonazepam (10 minutos), y C (Krebs-C) (5 minutos).

0	1	0 2	20	25
ĸ	irebs-C	Krebs-C+Caf+36mM Na⁺	Krebs-C	
Protocolos en ca	rdiomiocitos de ratas	HipoT		
Protocolos en ca 0	rdiomiocitos de ratas 51	НіроТ 02	0	2!
Protocolos en ca 0 Krebs-C	rdiomiocitos de ratas 5 1 Krebs-C + Clzp	HipoT 0 2 Krebs-C+Caf+36mM Na*+Clzp	0 Krebs-C	2!
Protocolos en ca 0 Krebs-C	rdiomiocitos de ratas 5 1 Krebs-C + Clzp	HipoT 0 2 Krebs-C+Caf+36mM Na ⁺ +Clzp	0 Krebs-C	2!

Figura 12: Protocolos experimentales realizados en cardiomiocitos aislados de corazones de ratas EuT e HipoT para microscopía confocal.

<u>6. Determinación del grado de infarto</u>

Para evaluar el grado de infarto de los tratamientos, algunos corazones de ratas eutiroideas e hipotiroideas que recibieron amiodarona oral 30 mg/Kg/día, y otros de ratas no tratadas, fueron expuestos a un modelo de isquemia de 30 minutos y reperfusión de 120 minutos, tal como ha sido descrito como criterio de valoración de cardioprotección (Lecour, 2021). Para ello, una vez concluidas las dos horas, los corazones fueron rápidamente congelados (-20°C) y cortados con hojas de afeitar y colocados en portaobjetos de 1 mm. Cada trozo fue incubado con una solución al 1% p/v de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en solución salina tamponada con fosfato a 37 °C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, cada trozo fue transferido de TTC a formalina tamponada al 10 % donde se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Por último, los corazones fueron sacados de la solución de formalina y escaneados dentro de las 24 h utilizando el programa Scion Image 1.62 (Scion Corp., Frederick, Maryland, EE. UU.). El tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área de riesgo (Pardo y col., 2022).

7. Western Blot de corazones expuestos a I/Rs

Inmediatamente después de concluidos los protocolos de isquemia y reperfusión (I 30 min / R 45 min) algunos ventrículos izquierdos de corazones de ratas eutiroideas e hipotiroideas (controles sin tratamiento y que recibieron amiodarona oral 30 mg/Kg/día por 7 días) fueron pesados, sumergidos en nitrógeno líquido y conservados en freezer a -80 °C. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron en hielo con buffer RIPA adicionado con inhibidores de proteasas (kit Roche) y fosfatasas (VO₃Na). Con el fin de conocer la concentración de proteína total en cada muestra y garantizar que se encuentren en el rango de detección adecuado para el ensayo (y que puedan
compararse de manera equivalente), se midió la absorbancia de una dilución 1:100 de la solución de lisado con el ensayo de Bradford en un lector de placas (Varioskan) a una longitud de onda de 595 nm. La absorción del reactivo de Bradford en la dilución de la muestra se comparó con una curva de calibración de albúmina realizada a concentraciones finales conocidas. Una vez determinadas las concentraciones de las muestras, se sembraron cantidades equivalentes a 50 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 8%. Luego, se separaron mediante electroforesis a voltaje constante y se transfirieron a membranas de PVDF. Finalizada la transferencia las membranas fueron bloqueadas con leche descremada en T-TBS al 10% por 1 hora, luego se procedó a la incubación con anticuerpos primarios a 4°C overnight. A la mañana siguiente, se retiró dicho anticuerpo, se lavó sucesivamente las membranas y se incubó 1hora a temperatura ambiente con el respectivo anticuerpo secundario para posteriormente lavar y proceder al revelado. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-iNOS (ABN26 Sigma-Aldrich), anti-eNOS (07-520 Sigma-Aldrich), anti SODM (ab13533), anti SOD_{CuZn} (sc-271014), anti nNOS (37-2800 Thermofisher), anti PI3K (SC-8010) y anti-GAPDH (Abcam-AM4300), para normalizar. Como anticuerpos secundarios se utilizaron IgG anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). La detección y revelado se realizó por quimioluminiscencia (Chemidoc) con reactivo quimioluminiscente (Merck Millipore) y software asociado (Quantity One-BioRad). La cuantificación final se realizó por densitometría de las imágenes obtenidas (ImageJ). Para cada proteína, las señales correspondientes a cada intervención se expresaron como la relación entre la proteína analizada y la GAPDH normalizadora.

8. Determinación de niveles de hormonas tiroideas en muestras de sangre

Se midieron los niveles de levotiroxina (T4) libre en sangre, extraída de algunas de las ratas eutiroideas e hipotiroideas antes del experimento ex vivo. La muestra de

61

sangre fue seguidamente centrifugada y el sobrenadante conservado en heladera. La medición se realizó mediante la técnica de ensayo de fluorescencia ligado a enzimas (ELFA) en un sistema automatizado (Vidas Instruments, Bio-Mérieux, Mary l'Etoile, Francia).

9. Soluciones y drogas empleadas en esta Tesis

- La solución control (Krebs-C) para corazones perfundidos tuvo la siguiente composición (en mM): 1 MgCl₂, 125 NaCl, 0.5 NaH₂PO₄, 7 KCl, 25 NaHCO₃, 6 glucosa y 2 mmol CaCl₂, burbujeada con carbógeno (95% O₂-5% CO₂, pH 7.4).
- La solución para el aislamiento y perfusión de cardiomiocitos (Krebs-HEPES) tuvo la siguiente composición (en mM): 4.4 KCl, 1.0 NaH₂PO₄, 5 MgCl₂, 24 HEPES, 22 dextrosa, 20 taurina, 5 creatina, 0.5 piruvato sódico, ajustada con NaOH a pH 7.4 y burbujeada con O₂ (100%).

Se utilizaron las siguientes drogas:

- Amiodarona (Roemmers ®): se preparó una solución con 1% dimetilsulfóxido (DMSO) y luego fue diluido a una concentración de 5 μg/L en solución Krebs-C para la perfusión directa (Xing y col., 2014). Para administración oral, se administró en el agua de bebida. Para ello, luego de disolver 25 mg en 1 ml DMSO, se diluyó a 100 ml de agua acidulada para beber, calculando que dado el consumo de las ratas (de 75 ml/día) se alcanzaba la dosis reportada previamente de 30 mg/kg/día (Pantos y col., 2002).
- Dronedarona (Sigma ®): se preparó una solución madre con DMSO y fue diluido a una concentración de 1 µg/ml (1.7 µmol/L) en la solución Krebs-C para perfusión directa (Kondratieva y col., 2018).

- 5-Hidroxidecanoato de sodio (5-HD, ICN Biochemicals and Reagents®, CA, USA): se preparó una solución madre de 100 mmol/l en dimetilsulfóxido y fue diluído a una concentración de 100 µmol/l en la solución Krebs-C.
- Aminoguanidina (Sigma-Aldrich®): se preparó una solución madre a 100 mmol/l con DMSO y fue diluído a una concentración de 100 µmol/l en la solución Krebs-C.
- Celeritrina (Sigma-Aldrich®): se preparó una solución madre a partir de 1 mg de polvo disuelto en 2.6 ml de DMSO y fue diluido a una concentración de 100 µmol/L en la solución de Krebs-C.
- Ciclosporina A (Sigma-Aldrich®): se preparó en una solución madre con dimetil sulfóxido (DMSO) y fue diluido a una concentración de 0.2 µmol/L en la solución de Krebs-C.
- L- NAME (Sigma-Aldrich[®]) se preparó una solución madre a 30 mM en DMSO y fue diluído a una concentración de 30 μM en la solución Krebs-C.
- N-(-2-mercaptopropionil) glicina (MPG) (Sigma-Aldrich®): se preparó una solución madre a partir de 0.5 g de polvo disuelto en 5.11 ml de agua destilada y fue diluido a una concentración de 0.6 mol/L en la solución de Krebs-C.
- Wortmanina (Sigma-Aldrich®): se preparó una solución madre a partir de 1 mg de polvo disuelto en 2.33 ml de DMSO y fue diluido a una concentración de 100 µmol/L en la solución de Krebs-C.

10. Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como media ± ESM (n= número de experimentos). En los protocolos en que se compararon los efectos de más de dos

tratamientos a lo largo del período de isquemia/reperfusión, se realizaron comparaciones múltiples mediante ANOVA de dos vías (variables: tratamiento y tiempo), seguidos por post-tests de Tukey para las varias comparaciones pareadas. En casos de comparación de dos tratamientos se empleó el t-test de Student, y en casos de comparaciones de múltiples tratamientos con una sola variable se empleó el ANOVA de una vía. Se consideró una diferencia significativa al nivel de P < 0.05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa GraphPad Prism v. 8.0.

Para cada parámetro (P, Ht, P/Ht y ΔLVEDP) se efectuaron 2 comparaciones múltiples por ANOVA de dos vías, una para corazones EuT y otra para corazones HipoT, en ambos casos con todos sus protocolos de I/R (moderada o severa). Los resultados generales se muestran en las tablas 1 a 6. Los resultados de las pruebas *a posteriori* de Tukey se muestran en las respectivas figuras con asteriscos. Esto asegura que cada grupo se comparó una sola vez, a pesar de que se lo muestra más de una vez en gráficos para visualizar más claramente la comparación; por ejemplo, con grupos control sin tratamiento, o los tratamientos básicos con los antiarrítmicos.

RESULTADOS

1. <u>Mediciones in vivo del estado tiroideo</u>

En la Figura 13 se muestra el resultado de la medición de los niveles de levotiroxina (T4) libre en sangre, extraída de algunas de las ratas eutiroideas e hipotiroideas y que recibieron (o no) amiodarona oral 30 mg/Kg/día durante 7 días antes del experimento ex vivo.



Figura 13. Niveles de T4 libre en pmol/l en muestras de sangre de ratas EuT e HipoT y aquellas que recibieron Amiodarona oral (Amd-EuT, Amd-HipoT). Anova de una vía. * p<0.0001 vs EuT. # p<0.0001 vs Amd-EuT y vs EuT.

Los resultados muestran que el HipoT redujo significativamente los niveles de T4 libre en las muestras de sangre recolectadas en comparación con las muestras de animales EuT, comprobando el estado HipoT inducido por la aministración de metimazol. Por otro lado, Amd no alteró significativamente los niveles de esta hormona respecto de los controles sin tratamiento, en EuT ni en HipoT, respectivamente.

2. Evaluación de la dinámica de calcio mitocondrial y citosólica en cardiomiocitos de ratas EuT e HipoT.

Con el objetivo de estudiar la dinámica del calcio intracelular y la influencia del hipotiroidismo, se trabajó con cardiomiocitos aislados de corazones de ratas EuT e HipoT, no expuestos a protocolo de I/R.

En cardiomiocitos aislados de corazones de rata EuT cargados con el fluoróforo Fluo-4, tras la perfusión de la solución conteniendo cafeína 10 mM para liberar el Ca²⁺ del RS, y baja [Na⁺] para evitar el eflujo vía NCX, se observó el incremento de los niveles de calcio citosólico (Figura 14 a). Como consecuencia del aumento en el citosol, la misma intervención provocó un incremento de la señal de Ca⁺² mitocondrial en los cardiomiocitos cargados con Rhod-2 (Figura 14 b). Por otro lado, los cardiomiocitos aislados de corazones de rata HipoT, presentaron un patrón con diferencias respecto a los de EuT, que se resumen como: a) un menor incremento en la concentración de Ca⁺² citosolico con más rápida caída de la señal debida a la recaptación hacia las mitocondrias (ya que el RS no retiene Ca²⁺ en presencia de cafeína) (Figura 14 a); b) una reducción en la señal mitocondrial de Ca²⁺, indicando menor acumulación (Figura 14 b). Además, el bloqueo del mNCX con clonazepam aumentó ligeramente la señal de Ca²⁺ mitocondrial en cardiomiocitos HipoT, pero a un valor muy inferior al de cardiomiocitos EuT (Figura 14 a-b).

Estos resultados sugieren que el HipoT reduce la captación mitocondrial de Ca²⁺, en parte por activar al mNCX. El HipoT altera la dinámica del Ca⁺² intracelular en los cardiomiocitos, afectando tanto los niveles citosólicos como mitocondriales. Los cardiomiocitos HipoT mostraron un manejo del calcio más rápido y eficiente en comparación con los EuT, lo que puede contribuir a la cardioprotección ante I/R observada en el hipotiroidismo.

67



Figura 14. Liberación y ciclado de Ca⁺² sarcorreticular en cardiomiocitos de ratas hipotiroideas (HipoT) y eutiroideas (EuT). Cambios en la [Ca²⁺] citosólica medida por Fluo-4 (a) y en la [Ca⁺²] mitocondrial medida por Rhod-2 (b) durante la perfusión con Krebs control (C) en ausencia o presencia de 10 mmol/L clonazepam (Clzp) durante la perfusión de Krebs- 10 mM cafeína -36 mM Na⁺ (caff 10- Na 36). Los resultados están expresados en media y error estándar de la media (SEM) de Δ F/Fo (n).

3. Parámetros mecánico-calorimétricos previo a la I/R.

En la Tabla 1 se muestras los valores absolutos de P (en mmHg), Ht (en mW/g) y P/Ht (en mmHg.g/mW) alcanzados durante la estabilización previo a la isquemia o a cualquiera de los tratamientos en perfusión. Se muestran los datos obtenidos en todos los protocolos correspondientes a ratas eutiroideas (EuT), hipotiroideas (HipoT), sin tratar y las respectivamente tratadas con amiodarona oral (Amd-EuT, Amd-HipoT).

Los resultados muestran que no existen diferencias en la presión desarrollada en la contracción (P) entre los grupos EuT e HipoT, y entre los grupos que recibieron Amd oral (EuT vs. HipoT). El flujo de calor total (Ht) y la economía muscular (P/Ht) también fueron constantes en general. Sin embargo, la administración de amiodarona incrementó el Ht en corazones EuT disminuyendo la P/Ht respecto de los grupos EuT.

Pre-I – pre- Tto	P (mmHg)	Ht (mW/g)	<i>P/Ht (</i> mmHg.g/mW)
EuT (n=94)	76.3 ± 2.7	15.9 ± 0.5	4.9 ± 0.1
HipoT (n=87)	73.2 ± 2.7	16.5 ± 0.6	4.7 ± 0.2
Amd-EuT (n=40)	84.8 ± 4.7	20.5 ± 1.1*	4.2 ± 0.1*
Amd-HipoT (n=25)	88.9 ± 6.6	19.0 ± 1.3	4.7 ± 0.2
Variables del ANOVA de una vía	F = 3.212 DF = 3 P = 0.0237	F = 7.229 DF = 3 P = 0.0001	F = 3.314 DF = 3 P = 0.0207

Tabla 1. Valores absolutos de P (en mmHg), Ht (en mW/g), P/Ht (en mmHg.g/mW), de corazones de ratas EuT, e HipoT que recibieron Amiodarona oral (Amd-EuT, Amd HipoT), tomadas durante la preisquemia (Pre-I) y antes de la perfusión de cualquier droga. Anova de una vía. * p<0.0001 vs EuT (Tukey post-tests).

Por otro lado, en la Tabla 2 se muestran las máximas velocidades de contracción (+dP/dt) y relajación (-dP/dt), normalizadas por la máxima presión desarrollada P (+P= +dP/dt/P y –P= -dP/dt/P, respectivamente) en la condición estable pre-isquémica explicada anteriormente en corazones de los grupos EuT, HipoT, Amd-EuT, Amd-HipoT.

Se observa que Amiodarona oral incrementó marcadamente las velocidades de contracción y relajación respecto de los grupos EuT e HipoT que no recibieron Amd.

Pre-I – pre-Tto	+dP/dt/P	-dP/dt/P	
EuT (n=45)	14.2 ± 0.4	-11.1 ± 0.6	
HipoT (n=36)	13.1 ± 0.3	-10.5 ± 0.3	
Amd-EuT (n=40)	16.7 ± 0.5*	-14.5 ± 0.5*	
Amd-HipoT (n=25)	15.7 ± 0.3 [#] -12.8 ± 0.4 [#]		
Variables del ANOVA de una vía	F = 21.58 DF = 3 P < 0.0001	F = 19.11 DF = 3 P < 0.0001	

Tabla 2. Máximas velocidades de contracción y relajación normalizadas por P de corazones de ratas EuT e HipoT que recibieron Amiodarona oral (Amd-EuT, Amd HipoT), tomadas durante la preisquemia (Pre-I) y antes de la perfusión de cualquier droga. Anova de una vía. * p<0.0001 vs EuT y # p<0.0001 vs HipoT (Tukey post-tests).

4. <u>Estudio mecánico-calorimétrico de los efectos del hipotiroidismo en corazones</u> de rata expuestos a un modelo de isquemia/reperfusión moderada (I/Rm)

En la Figura 15 se muestra un registro obtenido de un corazón de rata eutiroidea expuesto a isquemia de 20 minutos y a 45 minutos de reperfusión con solución Krebs. En la parte superior (rojo) se observa el registro de la presión intraventricular desarrollada por el corazón (en mmHg), mientras que en la parte inferior (azul), se observa el registro del flujo de calor total liberado (en mV), que se empleará para el cálculo de Ht (en mW).



Figura 15: Registro original de la respuesta mecánico-calorimétrica del ventrículo izquierdo de un corazón aislado de rata estimulado a una frecuencia de 3 Hz y expuesto al modelo de l/Rm (Isquemia por corte de flujo durante 20 minutos, y reperfusión de 45 minutos). Arriba (rojo) se muestra el registro contráctil de presión intraventricular (LVP, en mmHg) y abajo (azul) el registro calorimétrico (en mV). Observar que durante la isquemia se produce la caída de la contractilidad y el flujo de calor, seguido por una contractura diastólica que se acentúa al inicio de la reperfusión, a pesar de la considerable recuperación contráctil.

Cuando los corazones aislados de **ratas eutiroideas** fueron expuestos al modelo de isquemia/reperfusión moderada (I/Rm) desarrollaron una presión intraventricular (P) inicial de 94.8 \pm 5.6 mmHg en corazones de rata hembra (n= 7) y 64.6 \pm 2.7 mmHg en corazones de rata macho (n= 3) (NS). Simultáneamente, mostraron un flujo de calor total (Ht) de 21.7 \pm 1.5 mW/g en corazones de rata hembra y 16.9 \pm 2.6 mW/g en corazones de rata macho (NS). Ambos grupos de corazones fueron expuestos al modelo de I/Rm (isquemia global durante 20 min y reperfusión durante 45 min con solución Krebs-C). Los corazones eutiroideos sin tratamiento (EuT-Cm) mostraron una reducción moderada en la recuperación contráctil postisquémica (RCPI) que alcanzó, a los 45 minutos de R, 69.6 \pm 6.2 % de la P pre-isquémica en hembras vs 59.9 \pm 7.5 % del valor pre-I en machos (NS) (Fig. 16 a y c). También tuvieron una recuperación parcial de la economía muscular total calculada como el cociente P/Ht (alcanzando 3.7 \pm 0.6 mmHg.g/mW en hembras vs 2.5 \pm 0.7 mmHg.g/mW en machos a los 45 minutos de R, NS) (Fig. 16 e). Dado que no se hallaron diferencias significativas entre ambos sexos,

en los parámetros medidos entre corazones eutiroideos, se conformó un único grupo por unificación de sus datos (EuT-Cm, n=10).

Los corazones de **ratas hipotiroideas** (HipoT-Cm) expuestos al mismo modelo de I/Rm desarrollaron una presión intraventricular (P) inicial de 73.7 ± 4.1 mmHg (grupo hembras, n=3) y 71.9 ± 15.7 mmHg (grupo machos, n=3) (NS), con un flujo de calor total (Ht) de 13.5 ± 1.6 mW/g (grupo hembras) y 15.1 ± 1.6 mW/g (grupo machos) (NS). Durante la reperfusión con solución Krebs-C, los corazones HipoT-Cm mostraron una recuperación contráctil postisquémica (RCPI) que alcanzó hasta un 94.1 ± 8.5 % del valor pre I de P en hembras a los 45 minutos R, y una recuperación parcial de la economía muscular total (P/Ht) desde 5.7 ±I 1.1 mmHg.g/mW preisquémico hasta 4.0 ± 0.6 mmHg.g/mW al final de R (Fig 16 b y f). En los corazones HipoT-Cm de ratas macho la RCPI fue de 91.9 ± 4.7 % de la P pre-I (NS vs hembras), con un leve aumento de la P/Ht a los 45 minutos R (desde 4.7 ± 0.6 mmHg.g/mW en la pre-I a 6.0 ± 1.0 mmHg.g/mW al final de R, NS vs hembras) (Fig. 16 b y f). Dado que no se hallaron diferencias significativas entre géneros se trabajó con el promedio de todos los corazones de HipoT-Cm (n=6).



Figura 16: Efectos de la I/R moderada en corazones de ratas eutiroideas e hipotiroideas de ambos sexos (EuT-Cm Hembras y EuT-Cm Machos; HipoT-Cm Hembras e HipoT-Cm Machos). Se muestran los valores de máxima presión desarrollada (P, % del pre-I, en a y b), flujo de calor total (Ht, % del pre-I, en c y d), y economía muscular total (P/Ht, en mmHg.g/mW, en e-f). ANOVA de dos vías: por género: p<0.05 en d y otros NS * p<0.05 vs HipoT-Cm-Machos por Tukey post-tests (d).

Entonces, en promedio los **corazones EuT-Cm** desarrollaron una P inicial de 85.7 \pm 6.0 mmHg con un Ht de 20.3 \pm 1.4 mW/g (n=10). Luego durante la isquemia, la P cayó a cero rápidamente, mientras el Ht disminuyó hasta un 15.6 \pm 3.6 % del valor pre-isquémico de Ht a los 20 minutos de I, lo cual corresponde a un metabolismo basal

hipóxico. Durante la reperfusión, los corazones EuT-Cm recuperaron valores de P y Ht algo inferiores a los preisquémicos (hasta un 66.7 ± 5.8 % de la P pre-l y un 88.9 ± 7.2 % del Ht pre-l, a los 45 min de R) (Fig. 17 a-b). También se observó una caída simultánea de la economía muscular total (P/Ht) (desde 4.3 ± 0.5 mmHg.g/mW previo a la isquemia hasta 3.3 ± 0.5 mmHg.g/mW, a los 45 min de R, Fig. 17 c). Además, se evidenció un aumento en el tono diastólico que resultó significativo en los primeros 5 minutos de la reperfusión (hasta Δ LVEDP= 8.3 ± 1.8 mmHg, * p<0.05 vs 0) y revirtió a los 45 min de R (Δ LVEDP= 0.1 ± 1.8 mmHg, NS vs cero) (Fig. 17 d).

En el grupo unificado de los **corazones HipoT-Cm** se obtuvo P de 72.8 \pm 7.3 mmHg y Ht de 14.3 \pm 1.1 mW/g, previo a la isquemia. Al final de la reperfusión, la RCPI y la recuperación del Ht fueron similares a los valores pre isquémicos (93.0 \pm 4.3 % de P y 107.9 \pm 19.0 % respectivamente, a los 45 minutos de R) (Fig. 17 a y b). Por lo tanto, los resultados muestran que los corazones de ratas hipotiroideas recuperaron más que los de ratas eutiroideas. Además, la P/Ht alcanzó un valor de 5.0 \pm 0.7 mmHg.g/mW a los 45 min de R en HipoT-Cm, aunque este valor no fue significativamente diferente al de los corazones EuT-Cm (Fig. 17 c). Por otra parte, el tono diastólico (Δ LVEDP) durante el ciclo I/R no se modificó significativamente respecto de cero, y por lo tanto el HipoT previno la contractura obtenida al inicio de R en los corazones EuT-Cm (Fig 17 d).



Figura 17: Efectos de I/Rm en EuT-Cm versus HipoT-Cm: P (% de pre I) (a); Ht (% de pre I) (b); Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c); Δ LVEDP a los 5 y a los 20 min de I, y a los 5 y a los 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 3; *p < 0.001 vs EuT-Cm en a (por Tukey Post Test.) y * p<0.05 vs cero (en d, por t-Test).

Variables del ANOVA de 2 víse	I/R m		
Variables del ANOVA de 2 vias	P%	P/Ht	ΔLVEDP
Por Tratamiento	F = 6.33	F = 2.267	F = 50.88
	DF = 6	DF = 6	DF = 6
	P < 0.0001	P < 0.05	P < 0.0001
Por tiempo	F = 290.3	F = 124.9	F = 33.91
	DF = 29	DF = 29	DF = 3
	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
Interacción	F = 3.367	F = 3.026	F = 6.122
	DF =232	DF = 232	DF = 18
	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
DF residual	DF = 957	DF = 1189	DF = 140

Tabla 3. Resultados estadísticos del test de comparaciones múltiples de P (%), P/Ht (mmHg.g/mW) y Δ LVEDP (mmHg) para los grupos experimentales expuestos a l/R moderada en ratas eutiroideas (EuT) e hipotiroideas (HipoT) y todos sus tratamientos. Los resultados y los post-tests se muestran en las figuras 17 y 19 a 23.

El área de infarto en los corazones EuT-Cm e HipoT-Cm expuestos al modelo de I/Rm después de 45 minutos de R (ver apartado 6 de Materiales y Métodos) resultó pequeña, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos por t-test (5.2 \pm 1.3%, n = 4 en EuT-Cm, frente a 3.05 \pm 0.7%, n = 4, en HipoT-Cm) (Fig. 18).



Figura 18: Área de infarto como porcentaje del área cardíaca total (AI/VI%), en corazones eutiroideos (EuT-Cm) y en corazones hipotiroideos (HipoT-Cm) al final del protocolo de I/Rm (a); y fotografías representativas de secciones de corazones de las respectivas condiciones (b). Los resultados fueron expresados como promedio ± ESM y los datos individuales.

i) Evaluación de la participación del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (mNCX) en el modelo de l/Rm

Para evaluar el rol del mNCX, los corazones eutiroideos fueron perfundidos con

clonazepam (Clzp) 10 µM, que es un bloqueante selectivo del mNCX (EuT-m-Clzp). La

Fig. 19 muestra que Clzp 10 µM mejoró la recuperación contráctil hasta el 106.1 ± 28.4

% de la P pre-l a los 45 minutos de R (vs 66.7 \pm 5.8 % en EuT-Cm) (Fig. 19 a) y la economía muscular P/Ht a 5.8 \pm 1.0 mmHg.g/mW (vs 3.7 \pm 0.6 mmHg.g/mW en EuT-Cm). (Fig. 19 b). Sin embargo, Clzp no modificó significativamente la contractura diastólica durante la reperfusión (Δ LVEDP, respecto al control EuT-Cm) (Fig. 19 c).



Figura 19: Efectos de Clzp en EuT-Cm (EuT-m-Clzp): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 20 min de l, y a 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 3, y * p<0.05 vs EuT-Cm por Tukey post-tests (a y b). * p<0.05 vs cero (por t-Test) (c).

En corazones de rata hipotiroidea, el pretratamiento con Clzp 10 μ M (HipoT-m-Clzp) redujo significativamente la RCPI hasta 36.6 ± 6.8 % de la P pre-I a los 45 minutos de R (p<0.05 vs. 93.0 ± 4.3 % en HipoT-Cm) (Fig. 20 a). Simultáneamente, Clzp redujo la economía muscular (P/Ht) durante la reperfusión hasta 2.8 ± 0.7 mmHg.g/mW al final de R contrariamente a la recuperación completa (a 5.0 ± 0.7 mmHg.g/mW) en corazones HipoT-Cm (Fig. 20 b). Además, Clzp indujo un aumento significativo de la contractura diastólica durante toda la reperfusión (Fig. 20 c). Estos resultados sugieren que el bloqueo del intercambiador mNCX por Clzp evita la cardioprotección por el hipotiroidismo.



Figura 20: Efectos del bloqueo del mNCX con clonazepam (Clzp) en corazones de ratas hipotiroideas expuestas al modelo de l/Rm (HipoT-m-Clzp): (a) P (% de pre l), (b) Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) y (c) Δ LVEDP a 5 y 20 min de l, y a 5 y 45 min de R. ANOVA de dos vías en Tabla 3. *p<0.05 vs HipoT-Cm por Tukey Post Tests (a y b). En (c): * p<0.05 vs cero (por t-Test), y # p<0.05 vs HipoT-Cm por Tukey post-tests.

Para evaluar si la disfunción contráctil y energética inducida por el bloqueo del eflujo de calcio mitocondrial mediante el mNCX en corazones HipoT es debida a la apertura del mPTP, otro grupo de corazones HipoT fueron perfundidos con ciclosporina A (Cys-A) 0.2 µM (bloqueante de los canales mPTP) antes y durante la perfusión de Clzp 10 µM (HipoT-m-Clzp-Cys-A). Luego de 20 minutos de isquemia, los corazones fueron reperfundidos durante 45 min con solución Krebs conteniendo CysA 0.2 µM ya que el mPTP se abre durante los primeros minutos de la reperfusión. Los resultados en la Fig. 21 muestran que Cys-A indujo un aumento de la recuperación contráctil

postisquémica desde $36.6 \pm 6.8\%$ hasta $66.7 \pm 4.9\%$ de la P pre-l (p<0.05 vs HipoT-m-Clzp) a los 45 minutos de R (Fig. 21 a) sin cambios en la economía muscular (Fig. 21 b). Además, la contractura diastólica (Δ LVEDP) se redujo significativamente en el final de la isquemia (a 4.8 ± 3.5 mmHg) y en toda la reperfusión respecto al grupo HipoT-Clzp (Fig. 21 c).

Los resultados sugieren que la activación del mNCX contribuye a prevenir la apertura del mPTP en corazones HipoT expuestos a I/Rm a través de la mayor extrusión de Ca²⁺ mitocondrial, dado que su bloqueo induce disfunción contráctil y energética, reduciendo la RCPI y acentuando la contractura diastólica.



Figura 21: Efectos del bloqueo del mPTP con Cys-A en corazones de ratas HipoT perfundidos con clonazepam (Clzp) y expuestos a l/Rm (HipoT-m-Clzp-Cys-A): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 20 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 3. En a): * p<0.05 vs HipoT-m-Clzp por Tukey Post Tests. En c): # p<0.05 vs HipoT-m-Clzp por Tukey Post Tests. * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Con el fin de evaluar la participación de los canales mKATP en corazones eutiroideos e hipotiroideos expuestos a I/Rm, los corazones fueron perfundidos con 100 μ M de 5-hidroxidecanoato (5-HD) para bloquear los canales mKATP antes de la isquemia.

5-HD no modificó significativamente la recuperación contráctil y energética en los corazones EuT (EuT-m-5-HD) (Fig. 22 a y b). Sin embargo, 5-HD elevó la contractura diastólica durante toda la isquemia (hasta +59.7 \pm 6.3 mmHg) respecto al grupo de corazones EuT-Cm (Fig. 22 c).



Figura 22: Efectos del bloqueo de los canales mKATP con 5-HD en corazones eutiroideos expuestos a l/Rm. (EuT-m—5-HD): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 20 min de l, y a 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 3. En c): # p<0.05 vs EuT-Cm porTukey Post Tests. * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por otra parte, cuando corazones HipoT fueron perfundidos con 5-HD 100 μ M (HipoT-m—5-HD) previo a I, tampoco hubo cambios en la recuperación contráctil respecto al grupo HipoT-m-5-HD (Fig. 23 a). Sin embargo, aumentó levemente la economía P/Ht (hasta 6.9 ± 0.9 mmHg.g/mW, NS) (Fig. 23 b). Además, 5-HD aumentó la contractura diastólica (Δ LVEDP) durante los primeros 5 minutos de la reperfusión, revirtiendo este valor a los 45 min de R (Fig. 23 c).

Los resultados obtenidos sugieren que los canales mKATP sólo contribuyen a regular el nivel diastólico de Ca²⁺ durante la I/Rm, tanto en corazones EuT como HipoT, dado que su bloqueo modificó el tono diastólico sin afectar la RCPI.



Figura 23: Efectos del bloqueo de los canales mKATP con 5-HD en corazones de ratas hipotiroideas expuestos a l/Rm (HipoT-m—5-HD): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 20 min de l, y a 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 3. # p<0.05 vs HipoT-Cm porTukey Post Tests. * p<0.05 vs cero (por t-Test).

iii) Rol del retículo sarcoplásmico en la I/Rm y efecto del hipotiroidismo

Para evaluar el efecto sobre la liberación de Ca²⁺ del RS luego de la isquemia moderada, se trabajó con corazones aislados de ratas EuT e HipoT, a los cuales despues de la isquemia de 20 minutos se los reperfundió con la solución conteniendo cafeína 10 mM y 36 mM Na⁺ (Krebs-bajo Na⁺-caff). En esa condición, el pico de la contractura es proporcional a la cantidad de Ca²⁺ liberado del RS, y la velocidad de caída de dicha contracción (y su área) dependen de la captación mitocondrial de Ca²⁺, ya que el RS y el NCX no están funcionales (Ragone y Consolini, 2009; Consolini y col., 2017). Los corazones de ratas HipoT mostraron un pico de presión ventricular izquierda (LVP) menor en comparación con los corazones EuT y resultó más lenta la relajación de dicha contractura (Fig. 24). Esto sugiere que los corazones HipoT tienen una menor cantidad de calcio disponible para ser liberado desde el RS, durante la reperfusión, y se recapta más lentamente (y/o menos) a las mitocondrias. Esto explicaría que en los corazones que se contraen se genera una menor contractura diastólica por I/R en corazones HipoT respecto a los EuT y hay menor disfunción contráctil de origen mitocondrial.



Figura 24. Liberación y ciclos de Ca⁺² sarcorreticular en corazones de ratas hipotiroideas (HipoT, izquierda, a) y eutiroideas (EuT, derecha, b) expuestas a isquemia moderada (20 minutos) y reperfusión con Krebs- 10 mM cafeína -36 mM Na⁺ (R-caff 10- Na⁺ 36) sobre los cambios en la presión intraventricular izquierda (Δ LVP) y el flujo de calor (Ht). Los resultados están expresados en media y error estándar de la media (SEM) (n).

<u>5. Estudio mecano-energético de corazones aislados de ratas eutiroideas (EuT)</u> <u>e hipotiroideas (HipoT) expuestos a isquemia severa y reperfusión (I/Rs)</u>

En la figura 25 se observa un registro típico de un corazón de rata eutiroidea expuesto a isquemia de 30 minutos y a 45 minutos de reperfusión con solución Krebs.



Figura 25: Registro original de corazón aislado de rata EuT expuesto al protocolo de Isquemia por corte de flujo de 30 minutos, y reperfusión de 45 minutos. En rojo la presión intraventricular desarrollada por el corazón mientras latía a frecuencia de 3 Hz (en mmHg). En azul, la medida del flujo de calor total liberado (en mV).

Antes de exponer los corazones de ratas Wistar eutiroideas hembras y machos a isquemia global por corte de flujo durante 30 min y luego reperfundirlos con solución Krebs-C durante 45 min (EuT-C), se compararon los parámetros contráctiles y energéticos de ambos géneros. Los corazones de ratas eutiroideas hembra desarrollaron una P inicial de 64.4 ± 15.8 mmHg y *Ht* inicial de 13.7 ± 2.2 mW/g (n=5) mientras que los corazones de ratas eutiroideas machos desarrollaron una P inicial de 106.0 ± 6.1 mmHg y un *Ht* inicial de 19.2 ± 1.8 mW/g (n= 6), siendo estos valores estadísticamente diferentes. No hubo diferencias significativas entre géneros cuando se comparó la recuperación contráctil postisquémica y el Ht en % del respectivo valor prel (23.7 ± 6.5 % de P y 68.5 ± 4.3 % de Ht en hembras vs 14.2 ± 2.5 % de P y 82.6 ± 9.7 % de Ht en machos, NS) (Fig. 26 a y c). Tampoco encontramos diferencias según el género en la economía muscular a los 45 minutos de R (P/Ht =1.7 \pm 0.5 mmHg.g/mW en hembras vs 1.2 \pm 0.4 mmHg.g/mW en machos, NS) (Fig. 26 e).



Figura 26: Efectos de la I/R severa en corazones de ratas eutiroideas e hipotiroideas de ambos sexos (EuT-C Hembras y EuT-C Machos; HipoT-C Hembras e HipoT-C Machos) y expuestos al modelo de isquemia/reperfusión severa (I/Rs). Se muestran los valores de máxima presión desarrollada (P, % del pre-I, en a y b), flujo de calor total (Ht, % del pre-I, en c y d), y economía muscular total (P/Ht, en mmHg.g/mW, en e-f). Anova de dos vías: por género: NS tanto en EuT-C como en HipoT-C.

Para evaluar la influencia del HipoT en la injuria por isquemia/reperfusión severa, corazones de ratas hipotiroideas hembras (HipoT-C Hembras, n=3) y machos (HipoT-C Machos, n=5) fueron expuestas al mismo protocolo de I/Rs. Durante la estabilización se obtuvieron valores de P inicial de 78.7 \pm 4.6 mmHg en HipoT-C Hembras vs 79.5 \pm 2.79

mmHg en HipoT-C Machos (NS) y Ht inicial de 17.2 \pm 2.9 mW/g vs 17.7 \pm 2.9 mW/g en HipoT-C Machos, (NS). Durante la isquemia, la contractilidad cesó por completo (Fig. 26 b) y el Ht cayó hasta un 10.3 \pm 2.3 % del valor pre-l en hembras y 14.8 \pm 1.8 % del pre-l en machos (Fig. 26 d). Luego durante la R, los corazones de ratas HipoT-C Hembras alcanzaron una P de 57.5 \pm 3.5 % y un Ht de 89.3 \pm 3.0 % del valor pre-l a los 45 min de R (Fig. 26 b y d). Los corazones de ratas HipoT-C Machos no mostraron diferencias significativas respecto a los de hembras, alcanzando un 53.6 \pm 4.8 % de la P pre-l y 79.0 \pm 8.0 % de Ht también a los 45 min de R (Fig. 26 b y d). Similarmente, la P/Ht alcanzó 3.1 \pm 0.3 mmHg.g/mW en HipoT-C Hembras y 3.2 \pm 0.5 mmHg.g/mW en HipoT-C Machos (NS) (Fig. 26 f).

Tanto los corazones eutiroideos como los corazones hipotiroideos expuestos a I/R severa fueron unificados dado que no se encontraron diferencias en los parámetros medidos según el género (EuT-C, n=12; HipoT-C, n=8, Fig. 27).

La figura 27 muestra la comparación de los efectos de I/Rs en los grupos unificados por género de ratas eutiroideas e hipotiroideas, tanto en P como en P/Ht y en el incremento de la contractura diastólica (Δ LVEDP), la cual fue más evidente en los corazones eutiroideos. Durante la reperfusión, los corazones HipoT-C mostraron una recuperación contráctil postisquémica significativamente mayor que los corazones EuT-C (hasta un 55.0 ± 3.2 % de la P pre-isquémica vs 18.9 ± 3.6 % de P en EuT-C a los 45 min de R, * p<0.005) (Fig. 27 a). Simultáneamente, el calor total liberado (Ht) disminuyó durante la R tanto en HipoT-C como en EuT-C (82.9 ± 5.2 % vs 75.6 ± 5.5 % del valor pre isquémico de Ht a los 45 minutos de R respectivamente, NS) (Fig. 27 b) mientras que la P/Ht tendió a incrementarse en los corazones HipoT-C durante la R (hasta 3.2 ± 0.3 mmHg.g/mW en HipoT-C vs 1.5 ± 0.3 mmHg.g/mW en EuT-C) (Fig. 27 c). Además, el hipotiroidismo redujo la contractura diastólica en comparación con los corazones EuT-C durante toda la reperfusión (Fig. 27 d).



Figura 27: Efectos de I/Rs en corazones de ratas EuT (negro) e HipoT (rojo): P (% de pre I) (a), Ht (% de pre I) (b), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a y c, por Tukey Post Tests). En d): # p<0.05 vs EuT-C por Tukey Post Test.y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Variables del	I/R severa			
ANOVA de 2 vías	P%	P/Ht	ΔLVEDP	
Por Tratamiento	F = 78.85	F =34.13	F =19.76	
	DF = 17	DF = 17	DF =17	
	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	
Por tiempo	F = 1074	F = 245.6	F = 86.03	
	DF = 31	DF = 31	DF = 3	
	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	
Interacción	F = 5.195	F = 2.214	F = 4.445	
	DF = 527	DF = 527	DF =51	
	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	
DF residual	DF = 2784	DF = 2784	DF = 340	

Tabla 4. Resultados estadísticos del test de comparaciones múltiples de P (%), P/Ht (mmHg.g/mW) y Δ LVEDP (mmHg) para todos los grupos experimentales expuestos a l/R severa en ratas eutiroideas (EuT) e hipotiroideas (HipoT). Los resultados se muestran en las figuras 27 a 43.

i. Evaluación de la participación del mPTP (poro de transición de permeabilidad mitocondrial) en la disfunción por I/Rs e influencia del hipotiroidismo.

Para evaluar si la disfunción isquémica observada en los corazones EuT-C es debida a la activación de mPTP, se perfundió ciclosporina A (Cys-A) 0.2μ M, (bloqueante selectivo del mPTP) durante 20 minutos previos a la I y durante toda la R (EuT-Cys-A). Cys-A 0.2μ M, aumentó la recuperación contráctil postisquémica durante la reperfusión respecto a los corazones EuT-C (Fig. 28 a). También indujo un aumento significativo de la economía muscular total (P/Ht) (Fig. 28 b). Además, Cys-A 0.2μ M redujo la contractura diastólica durante toda la reperfusión (Fig. 28 c).



Figura 28: Rol del mPTP en I/Rs. Efectos de ciclosporina A (Cys-A) 0.2 μ M en corazones de rata eutiroidea (EuT-Cys-A): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs EuT-C por Tukey Post Test.y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Estos resultados sugieren que la disfunción de los corazones EuT en la I/Rs depende de la activación del mPTP, dado que su bloqueo con Cys-A mejoró la recuperación post-isquémica.

ii. Evaluación de la influencia de las ROS en la disfunción por I/R en corazones EuT.

Dado que los corazones EuT mostraron disfunción isquémica durante la reperfusión, interesó conocer si la misma se debía a la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Para ello se perfundió el *scavenger* de ROS (MPG, 2 mmol/L) durante 10 minutos antes de la isquemia y en toda la reperfusión. La perfusión inicial de MPG durante la pre isquemia redujo la contractilidad y la P/Ht. Durante la reperfusión, MPG mejoró la RCPI (Fig. 29 a) y la recuperación de la P/Ht (Fig. 29 b) respecto a los corazones de ratas EuT-C. Sin embargo, MPG tendió a aumentar la contractura diastólica durante la I y la incrementó significativamente durante los primeros minutos de R, respecto de los corazones EuT-C (Fig. 29 c).

Los resultados indican que la sobreproducción de ROS está muy involucrada en la disfunción contráctil producida por la I/Rs en ratas eutiroideas.



Figura 29: Rol de ROS en I/Rs. Efectos de MPG 2 mM en corazones de rata eutiroidea (EuT-MPG): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs EuT-C por Tukey Post Test, y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

iii. Evaluación de la participación del óxido nítrico en la disfunción por I/Rs y en la cardioprotección del Hipotiroidismo

Para evaluar el rol de la vía del óxido nítrico (NO), los corazones eutiroideos e hipotiroideos fueron pretratados con L-NAME 30 µM antes de la isquemia global, para inhibir inespecíficamente a las óxido nítrico-sintasas (NOS).

El pretratamiento con L-NAME en los corazones EuT (EuT-LNAME), mejoró significativamente la recuperación contráctil postisquémica (Fig. 30 a) con un aumento leve en P/Ht respecto de EuT-C (Fig. 30 b). Simultáneamente, el tono diastólico fue inicialmente reducido por L-NAME durante la isquemia, pero se mantuvo incrementado durante toda la reperfusión sin diferencias significativas con el grupo EuT-C (Fig. 30 c).



Figura 30: Rol de las NOS en I/Rs. Efectos de L-NAME 30 μ M en corazones de rata eutiroidea (EuT-LNAME): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a por Tukey Post Tests). En c): NS vs EuT-C (por Tukey post Test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Con el objetivo de profundizar el estudio sobre la influencia de las distintas isoformas de las NOS, se perfundió aminoguanidina 100 μ M (AG), un inhibidor selectivo de la óxido nítrico-sintasa inducible (iNOS), previo a la isquemia severa en los corazones de animales eutiroideos. La perfusión de AG también mejoró la RCPI durante los últimos minutos de la reperfusión respecto de los corazones control (Fig. 31 a), aunque no modificó significativamente la P/Ht (Fig. 31 b). Incrementó la contractura diastólica (Δ LVEDP) durante la isquemia, pero la mantuvo durante la R (Fig. 31 c).

Los resultados sugieren un rol perjudicial de la iNOS en la I/Rs de corazones de rata EuT, contribuyendo a la reducida recuperación contráctil post-isquémica. Por otro lado, la iNOS contribuye poco a prevenir la contractura diastólica en la Isquemia, pero no en la Reperfusión.



Figura 31: Rol de iNOS en I/Rs. Efectos de aminoguanidina (AG) 100 μ M en corazones de rata eutiroidea expuestos a I/Rs (EuT-AG): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs EuT-C por Tukey Post Tests, y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

En los **corazones hipotiroideos**, la perfusión de L-NAME 30 µM, previo a l y durante los primeros 5 minutos de R (HipoT-L-NAME), indujo un aumento de la recuperación contráctil durante la reperfusión en comparación con los corazones HipoT-C (Fig. 32 a). Sin embargo, no modificó la P/Ht respecto de la condición control (Fig. 32 b), pero produjo un gran aumento de la contractura diastólica durante todo el protocolo (Fig. 32 c).

Comparando con el efecto en corazones EuT, se aprecia que el HipoT genera un rol más importante de las NOS en la prevención de la contractura diastólica y de la disfunción contráctil.



Figura 32: Rol de NOS en corazones hipotiroideos en I/Rs. Efectos de L-NAME 30 μ M (HipoT-LNAME): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a por Tukey Post Tests). En c): * p<0.05 vs HipoT-C (por Tukey post Tests); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Cuando se perfundió aminoguanidina 100 μ M (AG), inhibidor selectivo de la óxido nítrico-sintasa inducible (iNOS), previo a la isquemia, los corazones hipotiroideos (HipoT-AG) mostraron una fuerte caída de la recuperación contráctil postisquémica durante toda la R en comparación a los corazones HipoT-C (Fig. 33 a). El mismo comportamiento fue observado en la recuperación de la economía (P/Ht) (Fig. 33 c). Además, AG provocó un pronunciado aumento de la contractura diastólica por I/Rs que se diferenció de la de los corazones HipoT-C al final de I y durante toda la R (Fig. 33 c).

Estos resultados sugieren que el HipoT induce la activación de la iNOS a niveles en que ejerce un rol cardioprotector, mejorando la recuperación contráctil y previniendo la contractura diastólica; mientras otras NOS aportan un rol negativo a la recuperación contráctil.



Figura 33: Rol de iNOS en corazones de ratas HipoT en I/Rs. Efectos de aminoguanidina (AG) 100 μ M en corazones hipotiroideos expuestos a I/Rs (HipoT-AG): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs HipoT-C por Tukey Post Tests y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Además, se evaluó si la perfusión de un donor de óxido nítrico (Nitroprusiato sódico 10 µM), que aumenta la disponibilidad del NO, previo a la isquemia de I/Rs, desarrollaba un efecto opuesto a L-NAME. La liberación de NO en corazones hipotiroideos (HipoT-Nitrop), disminuyó la recuperación contráctil significativamente durante los primeros minutos de la R, alcanzando valores similares a los de HipoT-C al final de R (Fig. 34 a). Por otra parte, no modificó significativamente la P/Ht durante R (Fig. 34 b), ni la contractura diastólica durante I/R (Fig. 34 c).

Los resultados sugieren que el aporte de óxido nítrico por nitroprusiato no mejora la cardioprotección por el hipotiroidismo, y su efecto no es opuesto al de L-NAME.



Figura 34: Efectos de nitroprusiato (Nitrop) 10 μ M en corazones hipotiroideos (HipoT-Nitrop) en I/Rs: P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs HipoT-C (en a, por Tukey Post Test). En c): NS vs HipoT-C (por Tukey post Test); *p<0.05 vs cero (por t-Test).

iii. Evaluación de la participación de las vías antiapoptóticas PI3K/Akt y PKC en la disfunción por isquemia/reperfusión (I/Rs) de corazones de ratas hipotiroideas.

Para evaluar la participación de la vía antiapoptótica de PI3K/Akt en la cardioprotección por hipotiroidismo frente a la injuria isquémica por I/Rs, corazones de rata HipoT fueron perfundidos previo a la isquemia con wortmanina (Wrt, 100 μ M, un inhibidor selectivo de la PI3K). La perfusión de Wrt redujo drásticamente la recuperación contráctil postisquémica (hasta el 6.8 ± 0.6 % de la P pre-I vs 55.0 ± 3.2 % en HipoT-C, *p<0.05) (Fig. 35 a), así como la economía muscular (0.5 ± 0.1 mmHg.g/mW vs 3.2 ± 0.3 mmHg.g/mW en HipoT-C, *p<0.05) (Fig. 35 b). Además, Wrt indujo un aumento en

el tono diastólico significativo hacia el final de la reperfusión, respecto a corazones HipoT.

Estos resultados sugieren que la vía antiapoptótica PI3K/Akt participa en la cardioprotección en I/Rs por hipotiroidismo.



Figura 35: Rol de la vía de PI3K en corazones HipoT en I/Rs. Efectos de Wortmanina (Wrt) 100 μ M en corazones HipoT expuestos a I/Rs (HipoT-Wrt): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs HipoT-C (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs HipoT-C (por Tukey post Test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por otro lado, se trataron corazones hipotiroideos con celeritrina 100 μ M (Che, inhibidor selectivo de PKC) antes de la isquemia (HipoT-Che). La recuperación contráctil postisquémica y la P/Ht se redujeron significativamente respecto de los corazones HipoT-C sobre el final de la R (hasta 7.7 ± 2.8 % de la P pre I y 0.8 ± 0.4 mmHg.g/mW, respectivamente) (Fig. 36 a y b). Adicionalmente, la contractura diastólica aumentó

fuertemente durante el final de la reperfusión (hasta Δ LVEDP de +42.6 ± 16.2 mmHg a los 45 min R) (Fig. 36 c).

En conclusión, la perfusión de celeritrina evidenció el rol cardioprotector de la vía de la PKC en los efectos benéficos del hipotiroidismo en corazones expuestos a I/Rs.



Figura 36: Rol de la PKC. Efectos de celeritrina (Che) 100 μ M en corazones de rata hipotiroidea (HipoT-Che) expuestos a l/Rs: P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs HipoT-C (en a y b, por Tukey Post Test). En c): # p<0.05 vs HipoT-C por Tukey Post Test.y *p<0.05 vs cero (por t-Test).

iv. Evaluación de la participación de los canales mitocondriales de potasio-ATP dependientes (mKATP) en la disfunción por I/Rs y en la cardioprotección del hipotiroidismo
Para evaluar el rol de los mKATP en los corazones de rata **eutiroideos** expuestos al modelo de I/Rs, se perfundió 5-HD 100 µM (bloqueante de los mKATP) previo a la isquemia (EuT—5-HD). Esto no modificó significativamente la baja recuperación contráctil (Fig. 37 a) ni la recuperación de la economía muscular total (P/Ht) (Fig. 37 b). Tampoco modificó significativamente los cambios en la LVEDP durante la R, respecto de los corazones EuT-C (Fig. 37 c).



Figura 37: Rol de canales mKATP en corazones EuT en l/Rs. Efectos de 5-HD 100 μ M en corazones eutiroideos expuestos a l/Rs (EuT—5-HD): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs EuT-C (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs EuT-C (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Para evaluar la participación de los mKATP en la cardioprotección del **hipotiroidismo**, corazones HipoT fueron perfundidos con 5-HD 100 μM previo a la I/Rs (HipoT—5-HD). El pretratamiento con 5-HD redujo marcadamente la recuperación contráctil (hasta el 9.4 \pm 3.2 % de la P pre I al final de R) (Fig. 38 a) y de la economía muscular (P/Ht) durante toda la reperfusión (hasta 0.4 \pm 0.2 mmHg.g/mW a los 45 minutos de R) (Fig. 38 b) respecto de la condición control HipoT-C. Además, si bien 5-HD redujo el tono diastólico durante los primeros minutos de la isquemia, mantuvo la contractura diastólica durante toda la reperfusión similar al grupo HipoT-C (Fig. 38 c).

Los resultados sugieren que los mKATP juegan un rol central en la cardioprotección del hipotiroidismo, probablemente por disminuir la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial. Contrariamente, el bloqueo de los mKATP no modificó el daño por isquemia/reperfusión en corazones eutiroideos demostrando que no se activan en la *I/*Rs.



Figura 38: Rol de canales mKATP en ratas HipoT. Efectos de 5-HD 100 μ M en corazones hipotiroideos expuestos a l/Rs (HipoT—5-HD): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs HipoT-C (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs HipoT-C (por Tukey post Test) y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

v. Evaluación de la participación del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (mNCX) en la cardioprotección del hipotiroidismo en I/Rs

Para evaluar el rol del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (mNCX) en la recuperación contráctil y energética de **corazones eutiroideos** expuestos al modelo de I/Rs, se perfundieron con 10 µM de Clonazepam (Clzp, un bloqueante del mNCX) (Cox y Matlib, 1993) previo a la isquemia (EuT-Clzp). Esto no modificó significativamente la recuperación contráctil postisquémica (Fig. 39 a) ni la P/Ht (Fig. 39 b). Sin embargo, Clzp incrementó el tono diastólico durante la reperfusión (Fig. 39 c).



Figura 39: Rol del mNCX en corazones EuT en I/Rs. Efectos de clonazepam (Clzp) 10 μ M en corazones eutiroideos expuestos a I/Rs (EuT-Clzp): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; NS vs EuT-C (en a y b, por Tukey Post Test). En c): # p<0.05 vs EuT-C por Tukey Post Test).

Por otra parte, para evaluar si el hipotiroidismo estimula el eflujo de Ca²⁺ por mNCX en la cardioprotección, los corazones de rata HipoT se perfundieron con 10 μ M de clonazepam (HipoT-Clzp) antes de la isquemia. Clzp redujo la recuperación contráctil de los corazones HipoT hasta un 29.4 ± 7.7 % de la P inicial al final de la reperfusión (Fig. 40 a). La economía muscular (P/Ht) también tendió a reducirse, aunque no fue estadísticamente significativa versus el HipoT-C (hasta P/Ht de 1.4 ± 0.4 mmHg.g/mW vs 3.2 ± 0.3 mmHg.g/mW en HipoT-C, NS) (Fig. 40 b). Además, Clzp incrementó significativamente la contractura diastólica durante los primeros minutos de la R (Δ LVEDP) (Fig. 40 c).



Figura 40: Rol del mNCX en corazones HipoT en I/Rs. Efectos de clonazepam (Clzp) 10 μM en HipoT (HipoT-Clzp): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; * p<0.05 vs HipoT-C (en a, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs HipoT-C por Tukey Post Test, y *p<0.05 vs cero (por t-Test).

Estos resultados sugieren que la activación del intercambiador mNCX protege a los corazones de ratas hipotiroideas de la disfunción mecánico-calorimétrica por sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial, mientras en corazones eutiroideos sólo previene la contractura diastólica.

vi. Evaluación de la influencia adrenérgica en los efectos del hipotiroidismo en la isquemia severa y reperfusión

Si bien en nuestros experimentos los corazones aislados de rata hipotiroidea mostraron una mejora en la recuperación contráctil postisquémica y en la economía muscular, estos resultados no coinciden con los reportes clínicos de riesgo cardíaco en pacientes hipotiroideos (Dhital y col., 2017). Se evaluó entonces si la presencia de adrenalina "in vivo" podría cambiar la respuesta al hipotiroidismo, mimetizando la concentración fisiológica plasmática.

En corazones EuT expuestos a I/Rs, la perfusión de adrenalina 10 nM (EuT-Adre), no modificó la recuperación de P (Fig. 41 a) ni la de P/Ht (Fig. 41 b). La contractura diastólica durante la I/Rs tampoco se diferenció de la condición control EuT-C durante la I ni durante la R (Fig. 41 c).



Figura 41: Efectos de Adrenalina (Adre) 10 nM en corazones de rata eutiroidea (EuT-Adre): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; NS vs EuT-C (en a y b, por Tukey Post Test). En c): NS vs EuT-C (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

En los corazones de ratas HipoT perfundidos con adrenalina 30 nM previo a la I/Rs (HipoT-Adre), se redujo significativamente la recuperación de P (hasta un 20.3 ± 7.7 % del pre-I). La recuperación de P/Ht también se redujo, especialmente durante los primeros minutos de la reperfusión (Fig. 42 a y b). En presencia de Adre, la contractura diastólica aumentó durante la reperfusión (Fig. 42 c).



Figura 42: Efectos de Adrenalina (Adre) 10 nM en corazones de rata hipotiroidea (HipoT-Adre): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; *p < 0.05 vs HipoT-C (en a y b, por Tukey Post Test). En c): *p< 0.05 vs HipoT-C (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por otra parte, se evaluó si la sensibilidad a adrenalina podía prevenirse por el tratamiento oral subagudo con un beta-bloqueante. Cuando se perfundieron con Adrenalina 10 nM los corazones aislados de ratas hipotiroideas que habían recibido 20 mg/kg/día carvedilol (un β-bloqueante de tercera generación) oral durante 1 semana (HipoT-Adre-Cvd), se restauró la función cardiaca propia de los corazones hipotiroideos (P hasta 50.3 ± 8.3 % del pre-I, *p<0.05 vs HipoT-Adre, NS vs HipoT-C). Los resultados fueron más dispersos en los valores absolutos de P/Ht perdiendo la significación vs HipoT-Adre (Fig. 43 b). Sin embargo, cuando se expresó en %P/Ht inicial se observa una recuperación significativamente mayor que en los corazones HipoT-Adre (Fig 43 c).

Por otra parte, se mantuvo la misma contractura diastólica durante todo el protocolo (Fig. 43 d).



Figura 43: Efectos de Carvedilol (Cvd) 20 mg/kg/día por 7 días en ratas hipotiroideas cuyos corazones se perfundieron con adrenalina previo a la I/Rs (HipoT-Adre-Cvd): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 4; *p < 0.05 vs HipoT-Adre (en a, por Tukey Post Tests), *p < 0.05 vs HipoT-Adre (en c, por Tukey Post Tests). En d): NS vs HipoT-Adre (por Tukey post Test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

6. Evaluación de los efectos mecánico-calorimétricos en corazones de ratas

tratadas vía oral subagudo con amiodarona y expuestos a I/R severa (I/Rs)

i. Efectos de la administración oral subaguda de amiodarona 30 mg/Kg/día en corazones

de rata en l/Rs

Para evaluar los efectos cardioprotectores del antiarrítmico amiodarona (Amd), corazones de ratas EuT e HipoT recibieron Amd oral en dosis de 30 mg/Kg/día durante 7 días previo a ser aislados y expuestos a I/R severa. Los corazones eutiroideos (Amd-EuT, n=9) desarrollaron una P inicial de 87.5 \pm 12.1 mmHg, un *Ht* de 20.9 \pm 2.8 mW/g y una P/*Ht* de 4.1 \pm 1.4 mmHg.g/mW. Durante la I, la contractilidad cesó por completo (Fig. 44 a), el *Ht* cayó hasta un valor de 13.9 \pm 4.4 % del valor pre-I (Fig. 44 b) y la Δ LVEDP aumentó (Fig. 44 d). Una vez restablecido el flujo de perfusión con Krebs en la Reperfusión de 45 minutos, se observó una recuperación de la contractilidad mayor a la de los corazones de ratas EuT-C. La recuperación contráctil postisquémica y el calor total liberado, a los 45 minutos de R, alcanzaron un valor de 53.6 \pm 6.2 % del valor pre isquémico de P (Fig. 44 a) y 64.9 \pm 6.9 % del valor pre-isquémico de Ht (Fig. 44 c), respectivamente. Conjuntamente, la P/Ht alcanzó un valor de 3.3 \pm 1.1 mmHg.g/mW al final de R (Fig. 44 b), mientras que el tono diastólico se elevó durante el principio de la R y disminuyó levemente sobre el final de este período (Fig. 44 d).

Los resultados muestran que la recuperación post-isquémica de los corazones EuT-Amd fue mayor que la de los corazones EuT-C, tanto en P como en P/Ht sin alterar la contractura diastólica. Esto demuestra un efecto cardioprotector de amiodarona.



Figura 44: Efectos de Amiodarona 30 mg/Kg/día oral por 7 días en corazones de rata eutiroidea (Amd-EuT) en comparación con los corazones EuT-C: P (% de pre l) (a), Ht (% de pre l) (b), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c), ΔLVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs EuT-C (en a y c, por Tukey Post Test). En d): NS vs EuT-C por Tukey Post Test; *p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por otra parte, el efecto observado en **corazones de ratas HipoT** que recibieron Amd oral subagudo durante 7 días (Amd-HipoT, n=8), fue diferente al observado en corazones EuT que recibieron Amd. Los valores iniciales de P, Ht y P/Ht en Amd-HipoT fueron de 82.1 ± 13.2 mmHg, 17.2 ± 2.7 mW/g y 4.8 ± 0.2 mmHg.g/mW, respectivamente (Fig. 45). Con el corte de perfusión (I de 30 minutos), la contractilidad cayó por completo, el Ht % cayó hasta 25.8 ± 6.4 % del valor pre-l y se produjo un incremento de la contractura diastólica durante toda la I (Fig. 45 d). Una vez restablecido el flujo de perfusión, la recuperación contráctil fue significativamente menor en comparación a los valores de los controles HipoT-C durante toda la R (hasta 26.4 ± 4.9 % de la P pre-l a los 45 minutos de R) (Fig. 45 a), tendencia que fue acompañada por la P/Ht (1.7 ± 0.5 mmHg.g/mW *p<0.005 vs HipoT-C, a los 45 minutos de R) (Fig. 45 c). Por otro lado, Amd agravó significativamente la contractura diastólica durante la I/R, llevando los valores de ΔLVEDP hasta +77.9 ± 5.3 mmHg en los primeros 5 minutos R (Fig. 45 d).

Variables del ANOVA de 2 vías	EuT-Amd			HipoT-Amd		
	P%	P/Ht	ΔLVEDP	P%	P/Ht	ΔLVEDP
Por Tratamiento	F = 52.48	F = 57.79	F = 9.138	F = 130.5	F = 62.02	F = 35.07
	DF = 7	DF = 7	DF = 7	DF = 5	DF = 5	DF = 5
	P < 0.0001					
Por tiempo	F = 611.3	F = 167.7	F = 42.59	F = 653.3	F = 161.0	F = 46.96
	DF = 30	DF = 30	DF = 3	DF = 30	DF = 30	DF = 3
	P < 0.0001					
Interacción	F = 3.619	F = 3.011	F = 2.936	F = 10.53	F = 3.407	F = 3.849
	DF = 210	DF = 210	DF = 21	DF = 150	DF = 150	DF = 15
	P < 0.0001					
DF residual	DF =1364	DF = 1364	DF = 176	DF = 837	DF = 837	DF = 104

Tabla 5: Resultados estadísticos del test de comparaciones múltiples de P (%), P/Ht y ΔLVEDP para los grupos experimentales expuestos a I/R severa en ratas que recibieron amiodarona oral eutiroideas (Amd-EuT) e hipotiroideas (Amd-HipoT). Los resultados se muestran en las figuras 44, 45 y 47 a 56.



Figura 45: Efectos de Amiodarona 30 mg/Kg/día oral durante 7 días en corazones de rata hipotiroidea (Amd-HipoT) en comparación con los corazones de rata HipoT-C: P (% de pre I) (a), Ht (% de pre I) (b), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs HipoT-C (en a y c, por Tukey Post Test). En d): # p<0.05 vs HipoT-C por Tukey Post Test *p<0.05 vs cero (por t-Test).

Se estudió además si el tratamiento con amiodarona oral durante 7 días tenía efectos sobre el área de infarto al final de la reperfusión en el modelo de I/Rs. El área de infarto en los corazones Amd-EuT resultó ser similar al de los EuT, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos (19.5 \pm 2.3%, n = 5 en Amd-EuT, frente a 16.7 \pm 1.4%, n = 5, en EuT) (Fig. 46).



Figura 46: Área de infarto como porcentaje del área cardíaca total (AI/VI%), en corazones eutiroideos (EuT) y en corazones eutiroideos que recibieron amiodarona oral (Amd-EuT) al final del protocolo de I/Rs (a); y fotografías representativas de secciones de los mismos corazones EuT y EuT-Amd (b). Los resultados fueron expresados como promedio ± ESM y los datos individuales.

Los resultados indican que el tratamiento oral con Amd resultó benéfico en corazones EuT, aunque no redujo el área de infarto. En corazones HipoT, el tratamiento con Amd oral, no mejoró la recuperación post-isquémica, por lo cual no se evaluó el infarto.

ii. Evaluación de la participación de la vía PKC y los canales mitocondriales de potasio ATP dependientes (mKATP) en los efectos cardioprotectores de amiodarona en I/Rs en corazones EuT e HipoT.

Para evaluar si la vía de la PKC interviene en los efectos cardioprotectores del tratamiento con Amd en corazones de ratas EuT, los corazones aislados de ratas EuT-Amd fueron perfundidos con celeritrina 100 μ M (Amd-EuT-Che, n=4) antes de la isquemia. Celeritrina indujo una disminución de la presión desarrollada (P) inicial respecto al grupo de Amd-EuT (Fig. 47 a). Durante la I/Rs, la contractura diastólica se incrementó, siendo mayor que en EuT-Amd al final de R (Fig. 47 c). Durante R, la recuperación contráctil de los corazones Amd-Che llegó hasta un 9.9 ± 4.1 % del valor pre-Che, considerablemente inferior a la RCPI del grupo Amd-EuT (Fig. 47 a), al igual que disminuyó la recuperación de P/*Ht* (hasta 0.6 ± 0.2 mmHg.g/mW al final de R) (Fig. 47 b).

Los resultados sugieren que PKC está involucrada en los efectos benéficos inducidos por la administración oral de Amd en corazones de rata EuT, ya que la perfusión de Che los impidió, empeorando aún más la contractura diastólica.



Figura 47: Rol de la PKC en la cardioprotección de amiodarona oral en ratas eutiroideas. Efectos de Celeritrina (Che) 100 μ M en corazones de rata Amd-EuT (Amd-Che): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Test). En c): # p<0.05 vs Amd-EuT por Tukey Post Test. y *p<0.05 vs cero (por t-Test).

Dado que existen reportes de la regulación de la PKC sobre los canales mKATP (Costa y col., 2008), se evaluó si estos canales participan en el efecto cardioprotector de amiodarona oral en los corazones eutiroideos. Para ello, corazones de rata EuT tratadas con Amd oral subaguda fueron perfundidos con 5-HD 100 μ M antes de la I/Rs (Amd-EuT-5-HD, n=6). La perfusión de 5-HD no modificó significativamente P, Ht ni la presión diastólica antes de I/R (Fig. 48 c). Durante la reperfusión, la recuperación contráctil postisquémica disminuyó significativamente respecto a la obtenida en el grupo de Amd-EuT (hasta un 32.1 ± 9.4 % de la P pre-I) (Fig. 48 c) mientras que la P/*Ht* también cayó hasta un valor de 1.1 ± 0.3 mmHg.g/mW a los 45 minutos de la R (Fig. 48 b). Durante la I/Rs, 5-HD indujo un aumento de la contractura diastólica, que a los 5 minutos de R fue mayor al obtenido en corazones Amd-EuT (Fig. 48 c).



Figura 48: Rol de mKATP en efecto cardioprotector de amiodarona oral. Efectos de 100 μ M de 5-hidroxidecanoato (5-HD) en corazones de rata eutiroidea con tratamiento de amiodarona oral (Amd-EuT—5-HD): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs Amd-EuT por Tukey Post Tests, y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Adicionalmente, y para evaluar la contribución de los canales mKATP en los efectos de la administración de Amd oral en animales HipoT, se perfundió 5-HD 100 µM antes de la I/Rs (Amd-HipoT—5-HD, n=5). 5-HD no modificó la recuperación contráctil ni energética post isquémica con respecto a la condición control (Amd-HipoT) (Fig. 49 a y b) sin cambios significativos en la contractura diastólica (Fig. 49 c).

La perfusión de 5-HD (inhibidor selectivo de los canales mKATP) evidenció que la apertura de los canales mKATP participa parcialmente en la protección de Amd en corazones de rata eutiroidea, pero no participa en corazones de rata hipotiroidea.



Figura 49: Rol de mKATP en corazones HipoT–Amd en I/Rs. Efectos de 5-Hidroxidecanoato (5-HD) 100 μ M en corazones de rata eutiroideos con tratamiento oral de amiodarona (Amd-HipoT—5-HD): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; NS vs Amd-HipoT (a y b, por Tukey Post Test). En c): NS vs Amd-HipoT (por Tukey post Test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

 iii. Evaluación de la participación de la vía del óxido nítrico en los efectos de amiodarona frente a la disfunción por isquemia y reperfusión en corazones EuT e HipoT.

Para profundizar el estudio de los mecanismos involucrados en los efectos protectores de Amd oral en corazones EuT, se evaluó la participación de la vía del NO a través de la inhibición no-selectiva de las varias isoenzimas de óxido nítrico-sintasas (NOS) con perfusión de L-NAME 30 µM. Luego se evaluó el rol de la isoforma inducible (iNOS) utilizando el inhibidor selectivo aminoguanidina (AG, 100 µM).

Los corazones de ratas EuT que recibieron Amd y fueron perfundidos con L-NAME mostraron una reducción en la recuperación durante la reperfusión de P y de P/*Ht* en

comparación al grupo de corazones Amd-EuT (Fig. 50 a y b). La contractura diastólica fue significativamente mayor a la desarrollada por Amd-EuT al final de la R (Fig. 50 c).



Figura 50: Rol de las NOS en la cardioprotección de amiodarona en corazones eutiroideos en I/Rs. Efectos de L-NAME 30 μ M (Amd-EuT-LNAME): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b) , Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). (ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs Amd-EuT por Tukey Post Tests, y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

El pretratamiento con AG 100 μ M redujo significativamente la contractilidad durante su perfusión (P de 75.5 ± 5.9 % del valor pre-l, * p<0.005 vs Amd-EuT) (Fig. 51 a). Durante la R, la recuperación contráctil post-l y de la P/Ht fueron drásticamente menores a las de los corazones Amd-EuT (P hasta 10.7 ± 3.1 % de P pre-l y P/Ht de 0.4 ± 0.1 mmHg.g/mW) a los 45 minutos de R (Fig. 51 a y b). La contractura diastólica fue mayor a la del grupo Amd-EuT a los 45 minutos de R (Fig. 51 c).



Figura 51: Rol de la iNOS en la cardioprotección de amiodarona en corazones de rata eutiroideos. Efectos de Aminoguanidina (AG) 100 μ M (Amd-EuT-AG): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): # p<0.05 vs Amd-EuT por Tukey Post Tests, y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Los resultados sugieren que la vía del óxido nítrico interviene activamente en la cardioprotección de amiodarona en corazones de rata eutiroidea, principalmente por activación de la iNOS.

Por otra parte, en corazones HipoT-Amd, L-NAME solo disminuyó la P durante su perfusión en la pre-l pero no modificó la recuperación post-isquémica de la contractilidad, ni de P/Ht en la R (Fig. 52 a y b). Tampoco se evidenciaron cambios significativos en la contractura diastólica respecto al grupo de Amd-HipoT (Fig. 52 c).



Figura 52: Rol de NOS en el efecto de amiodarona oral en corazones de rata HipoT en I/Rs. Efectos de L-NAME 30 μ M en Amd-HipoT (Amd-HipoT-LNAME): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; NS vs Amd-HipoT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs Amd-HipoT (por Tukey post Tests); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

En corazones HipoT-Amd, AG disminuyó la contractilidad durante su perfusión en la pre-l y no modificó significativamente la contractilidad ni la P/Ht durante la R (Fig. 53 a y b). Respecto del ΔLVEDP, AG mostró una tendencia a disminuir la contractura durante la isquemia, pero no hubo diferencia significativa respecto al grupo de Amd-HipoT (Fig. 53 c).

Los resultados sugieren que las NOS no ejercen un rol en la recuperación postisquémica de corazones de rata hipotiroidea tratadas con amiodarona oral.



Figura 53: Rol de la iNOS en la recuperación post-isquémica de corazones hipotiroideos tratados con amiodarona. Efectos de Aminoguanidina (AG) 30µM (Amd-HipoT-AG): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; NS vs Amd-HipoT (en ay b, por Tukey Post Test). En c): NS vs Amd-HipoT (por Tukey post Test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

iv. Evaluación de la participación de las vías antiapoptóticas PI3K/Akt en los efectos de amiodarona en corazones Eut en la disfunción por isquemia/reperfusión.

Dado que la vía PI3K/Akt participa en la cardioprotección del HipoT en corazones expuestos a I/Rs, se evaluó la participación de esta vía cardioprotectora en el efecto de amiodarona oral subaguda en corazones de ratas EuT expuestos a I/Rs. Para ello, se perfundió wortmanina 100 μ M (Wrt) a un grupo de corazones de ratas EuT-Amd previo a la I. Los resultados muestran que se modificó la contractilidad durante los primeros 5 minutos de perfusión previos a la isquemia. Durante la R, disminuyó significativamente la recuperación contractil (hasta P del 29.4 ± 10.3 % de la P pre-I) respecto al grupo de Amd-EuT (Fig. 54 a). Similarmente, se redujo la P/Ht (hasta 1.4 ± 0.4 mmHg.g/mW) (Fig.

54 b). Por otra parte, hubo una tendencia NS a incrementar la contractura diastólica durante la I y la R respecto al grupo Amd-EuT (Fig. 54 c).

Por lo tanto, los resultados sugieren que la vía PI3K/Akt está involucrada en los efectos cardioprotectores de Amd oral subaguda en ratas eutiroideas.



Figura 54: Rol de PI3K en la cardioprotección de amiodarona oral en corazones eutiroideos. Efectos de wortmanina (Wrt) 100 μ M en Amd-EuT (Amd-EuT-Wrt): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b) , Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs Amd-EuT (por Tukey post Tests); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

v. Evaluación de la participación de las ROS en los efectos de amiodarona oral en corazones EuT e HipoT expuestos a isquemia/reperfusión.

Para evaluar si la producción de ROS participa en el efecto cardioprotector de amiodarona, se perfundió 2 mM N-(-2-mercaptopropionil) glicina (MPG, un scavenger de ROS) durante 10 minutos antes de la I y durante toda la R.

MPG redujo la contractilidad en la pre I (P de 65.5 \pm 3.2 % del valor pre-I, * p<0.005 vs Amd-EuT) (Fig. 55 a). En cambio, MPG no modificó la RCPI (Fig. 55 a) ni la P/Ht durante R (Fig. 55 b) respecto de los corazones de rata Amd-EuT. Tampoco se observaron diferencias en la contractura diastólica durante I/R (Fig. 55 c).



Figura 55: Efectos de N-(-2-mercaptopropionil) glicina (MPG) 2 mM en corazones Amd-EuT (Amd-EuT-MPG) en I/Rs: P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). (ANOVA de dos vías en Tabla 5; NS vs Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs Amd-EuT (por Tukey post Tests); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por el contrario, en corazones de rata hipotiroidea tratada con amiodarona oral subaguda, la perfusión de MPG redujo la contractilidad antes de la isquemia (P hasta el $64.2 \pm 1.6 \%$ del valor pre-l, * p<0.005 vs Amd-HipoT) (Fig. 56 a), pero la aumentó

durante la reperfusión hasta el 65.9 \pm 6.6 %, significativamente mayor al grupo de Amd-HipoT (Fig. 56 a). En concordancia, aumentó la recuperación de P/Ht (hasta 3.8 \pm 0.3 mmHg.g/mW a los 45 minutos de R) (Fig. 56 b) y redujo la contractura diastólica durante toda la reperfusión (Fig. 56 c).



Figura 56: Efectos de N-(-2-mercaptopropionil) glicina (MPG) 2 mM en corazones Amd-HipoT (Amd-HipoT-MPG) en I/Rs: P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 5; * p<0.05 vs Amd-HipoT (en a y b, por Tukey Post Test). En c): # p<0.05 vs Amd-HipoT por Tukey Post Test y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la pérdida de cardioprotección en

los corazones de ratas HipoT que recibieron Amiodarona oral se debería, al menos en

parte, a la sobreproducción de ROS.

7. Expresión de proteínas relacionadas con ROS y NO en los corazones

reperfundidos de ratas EuT, HipoT y tratadas con Amd.

Para profundizar el estudio de los resultados obtenidos por la técnica mecanocalorimétrica, algunos corazones EuT, HipoT, Amd-EuT y Amd-HipoT fueron congelados y procesados para realizar un análisis de la expresión de proteínas por la técnica de Western-blot.

Se estudió la expresión de las distintas isoformas de las NOS en los corazones mencionados. Los resultados indican que después de la I/R, las expresiones de NOS endotelial (eNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS neuronal (nNOS) no fueron modificadas significativamente por el hipotiroidismo ni por Amiodarona (Fig. 57).

Sin embargo, se observó una tendencia a aumentar la expresión de nNOS en corazones HipoT en comparación con corazones EuT. Además, al evaluar las proporciones eNOS/iNOS y nNOS/iNOS, se observaron tendencias crecientes en ambas proporciones para corazones HipoT postisquémicos (Fig. 57). El tratamiento con Amd tampoco afectó la expresión de iNOS, pero aumentó ligeramente la expresión de eNOS y nNOS en corazones EuT al final de R. En ratas HipoT, el tratamiento con Amd no tuvo efectos adicionales en las expresiones de NOS (Fig. 57).

Con respecto a la expresión de Akt, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, quizás debido a la variabilidad de los datos actuales. Sin embargo, el grupo de EuT pareció presentar niveles elevados de esta quinasa, tanto tratada como no tratada con Amd (Fig. 58 a y d).



Figura 57: Expresión miocárdica de la NO-sintasa endotelial (eNOS) (a), de la NO-sintasa neuronal (nNOS) (c), de la NO-sintasa inducible (iNOS) (d) en muestras de ratas eutiroideas (EuT-C), hipotiroideas (HipoT-C) eutiroideas que recibieron amiodarona oral (Amd-EuT) e hipotiroideas que recibieron amiodarona oral (HipoT-Amd). Propoción eNOS/ iNOS (e), proporción nNOS/iNOS (f). La imagen superior (b) muestra un análisis Western Blot representativo. Los resultados se muestran como media ± DE y valores individuales.

Además, se evaluaron las superóxido dismutasas mitocondriales y citosólicas (Mn SOD y CuZn SOD, respectivamente) (Fig. 58 c y d). Se encontró un ligero aumento (NS) en la expresión de Mn SOD en corazones HipoT, mientras que el tratamiento con Amd no la alteró (Fig. 58 c).



Figura 58: Expresión miocárdica de Akt (a) la superóxido dismutasa Cu-Zn citosólica (CuZn SOD) (c) y de la super oxido dismutasa Mn mitocondrial (MnSOD) (d), en muestras de ratas eutiroideas (EuT-C), hipotiroideas (HipoT-C), eutiroideas que recibieron amiodarona oral (Amd-EuT) e hipotiroideas que recibieron amiodarona oral (HipoT-Amd). La imagen superior (b) muestra un análisis Western Blot representativo. Los resultados se muestran como media ± DE y valores individuales.

8. Efectos directos por perfusión de amiodarona 5 µg/ml previo a I/Rs

i. Efectos directos por perfusión de amiodarona en corazones eutiroideos (EuT) e hipotiroideos (HipoT) expuestos a I/Rs.

Para evaluar los efectos directos o inmediatos de amiodarona, se realizó la perfusión de dicho antiarrítmico (p-Amd) en corazones de ratas EuT e HipoT antes de exponerlos al protocolo de I/R severa (I/Rs). La perfusión de amiodarona 5 µg/ml no alteró la

contractilidad ni el Ht respecto de los controles EuT-C antes de la I/R. Luego, durante la isquemia, el Ht alcanzó un valor de 7.6 \pm 3.4 % del pre-I a los 30 minutos de I. Durante la R, la recuperación contráctil postiquémica fue similar a la obtenida en los corazones control EuT-C (hasta el 23.8 \pm 10.5 % del valor pre I en P para el grupo p-Amd-EuT) (Fig. 59 a). El mismo comportamiento se observó en Ht (recuperó hasta el 93.9 \pm 11.4 % del pre I, en p-Amd-EuT; Fig. 59 b) y en P/Ht (hasta 1.1 \pm 0.5 mmHg.g/mW en p-Amd-EuT; Fig. 59 c). Además, la perfusión de Amd no produjo contractura diastólica significativa durante todo el protocolo (Fig. 59 d).



Figura 59: Efectos de Amiodarona (Amd) 5 µg/ml en perfusión en corazones EuT-C (p-Amd-EuT) en I/Rs: P (% de pre I) (a), Ht (% de pre I) (b), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c), y ALVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 6. NS vs EuT-C (en a y b por Tukey post Test); En d) NS vs EuT-C (por Tukey post Test); *p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por otra parte, la perfusión de Amd redujo la cardioprotección en corazones HipoT expuestos a I/Rs. Amd redujo la contractilidad durante su perfusión previo a I, resultado compatible con su capacidad bloqueante de canales de calcio (Fig. 60 a).

Durante la I, el Ht cayó hasta 20.3 ± 7.0 % del pre I a los 30 minutos; y durante la reperfusión la recuperación contráctil posiquémica fue fuertemente reducida respecto de la de corazones HipoT-C, alcanzando un 20.5 ± 4.1 % de la P pre I, mientras que la P/Ht alcanzó 1.2 ± 0.2 mmHg.g/mW. (Fig. 60 c). Adicionalmente, en contraste con el grupo de corazones hipotiroideos (HipoT-C) la perfusión de Amd produjo un marcado aumento del tono diastólico, en especial durante la R (Fig. 60 d).

Los resultados indican que la perfusión de Amd no mejora la recuperación contráctil ni energética de corazones EuT. En corazones HipoT, los efectos directos e inmediatos de Amd, abolieron por completo la cardioprotección inducida por el hipotiroidismo.



Figura 60: Efectos directos de Amiodarona (Amd) 5 μ g/ml en perfusión en HipoT (p-Amd-HipoT): P (% de pre l) (a), Ht (% de pre l) (b), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c), y Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 6. * p<0.05 vs HipoT-C (en a y c, por Tukey Post Test). En d): # p<0.05 vs HipoT-C por Tukey Post Test.y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Variables del ANOVA de 2 vías	EuT			НіроТ		
	P%	P/Ht	ΔLVEDP	P%	P/Ht	ΔLVEDP
Por Tratamiento	F =53.03	F = 40.82	F = 7.744	F = 65.7	F = 58.30	F = 24.85
	DF = 7	DF = 7	DF = 7	DF = 3	DF = 3	DF = 3
	P < 0.0001					
Por tiempo	F = 381.6	F = 125.2	F = 26.94	F = 112.3	F = 44.45	F = 5.894
	DF = 30	DF = 30	DF = 3	DF = 30	DF = 30	DF = 3
	P < 0.0001	P = 0.0011				
Interacción	F = 4.495	F = 2.191	F = 1.337	F = 2.499	F = 1.528	F = 1.213
	DF = 210	DF = 210	DF = 21	DF = 90	DF = 90	DF = 9
	P < 0.0001	P < 0.0001	P = 0.1617	P < 0.0001	P = 0.0023	P = 0.2995
DF residual	DF = 1085	DF = 1085	DF = 140	DF = 620	DF = 620	DF = 76

Tabla 6. Resultados estadísticos del test de comparaciones múltiples de P (%), P/Ht y Δ LVEDP para los grupos experimentales expuestos a l/Rs en ratas eutiroideas (EuT) e hipotiroideas (HipoT) que recibieron amiodarona o dronedarona por perfusión antes del período de isquemia. Los resultados se muestran en las figuras 59 a 68.

ii. Influencia de las ROS en los efectos de la perfusión de Amd en corazones EuT.

Se utilizó MPG para estudiar si la sobreproducción de ROS estaba produciendo la reducida recuperación contráctil y de P/Ht en los corazones EuT que recibieron Amd en perfusión. Al igual que en experimentos anteriores, la perfusión de MPG durante la pre-l redujo la contractilidad (P). Durante la reperfusión, los corazones que recibieron MPG antes y durante la perfusión de Amd y en R, mostraron una mejora en la RCPI (hasta el 62.2 ± 3.7 % de la P inicial) (Fig. 61 a), y de la P/Ht en parte de R (hasta 3.9 ± 0.5 mmHg.g/mW) respecto del grupo p-Amd-EuT (Fig. 61 b). Por otro lado, se evidenció una tendencia NS a incrementar la contractura diastólica (Δ LVEDP) durante toda la R (Fig. 61 c).

Los resultados sugieren un rol perjudicial de las ROS en la I/Rs posterior a la perfusión de amiodarona, en grado similar al que tenpian en los corazones EuT sin perfundir el antiarrítmico.



Figura 61: Efectos de Amiodarona (Amd) 5 μg/ml en presencia de MPG en EuT (p-Amd-EuT-MPG) en I/Rs: P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), y ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 6; * p<0.05 vs p-Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs p-Amd-EuT (por Tukey post Tests); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

iii. Influencia de la producción de NO en los efectos de la perfusión de Amiodarona en corazones EuT expuestos a I/Rs.

Dado que la sobreproducción de NO enzimático juega un rol importante en la disfunción posiquémica (Yu y Pang, 2018), pero la iNOS contribuía a la cardioprotección de amiodarona administrada en modo oral y subagudo (punto 6.iii), se evaluó el rol de las NOS en los efectos de la perfusión de Amd en corazones EuT. La perfusión de L-NAME antes y durante la perfusión de Amd (p-Amd-L-NAME) redujo la contractilidad (P) previo a la isquemia, acompañado de un leve aumento de la contractura diastólica durante la I. Durante la R, L-NAME no modificó los resultados producidos por la

perfusión de Amd (hasta un 17.9 \pm 9.3 % de P, y P/Ht de 0.8 \pm 0.4 mmHg.g/mW) (Fig. 62 a y b). Sin embargo, L-NAME indujo un incremento de la contractura diastólica a los 5 y a los 45 minutos de la R (Δ LVEDP) (Fig. 62 c).



Figura 62: Efectos de Amiodarona perfundida (p-Amd) 5 μ g/ml y L-NAME 30 μ M en perfusión en EuT (p-Amd-LNAME): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 6; NS vs p-Amd-EuT (en a y b, por Tukey Post Test). En c): # p<0.05 vs p-Amd-EuT por Tukey Post Test y * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Los resultados sugieren que el NO, proveniente de las distintas isoformas de las NOS, no participa en el efecto generado por la perfusión de Amd en la recuperación mecánico-energética, pero contribuye a prevenir la contractura diastólica.

9. Efectos directos de la perfusión de dronedarona 1 µg/ml previo a I/Rs.

i. Efectos de la perfusión de Dronedarona y su interacción con el hipotiroidismo.

Para evaluar los efectos del antiarrítmico dronedarona (Drd) se perfundió 1 μ g/ml de Drd previo a la I/R severa en corazones EuT (Drd-EuT). Durante la isquemia, el Ht disminuyó alcanzando un valor del 13.4 ± 8.4 % del Ht pre-isquémico a los 30 minutos de I, similar al control. Durante la R, Drd aumentó la recuperación contráctil hasta un 62.6 ± 6.6 % de la P pre-I, superior al de los corazones EuT-C (Fig. 63 a). P/Ht acompañó el comportamiento de P y alcanzó un valor de 4.4 ± 0.8 mmHg.g/mW superior al del grupo EuT-C (Fig. 63 b). La contractura diastólica fue similar a la del grupo control EuT-C (Fig. 63 c).



Figura 63: Efectos directos de Dronedarona (Drd) 1 μg/ml en perfusión en EuT-C (Drd-EuT): P (% de pre I) (a), Ht (% de pre I) (b), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (c), y ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 6. * p<0.05 vs EuT-C (en a y c, por Tukey Post Test). En d): NS vs EuT-C (por Tukey post Test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Por otra parte, Drd no modificó los efectos benéficos del hipotiroidismo ya que no alteró la recuperación contráctil ni la de P/Ht posiquémica en corazones HipoT (hasta $55.6 \pm 5.9 \%$ de P pre I y P/Ht de 2.0 ± 0.4 mmHg.g/Mw) (Fig. 64 a y c). Drd aumentó el *Ht* sobre el final de la R respecto de los valores pre-I (hasta $130.0 \pm 16.3 \%$) (Fig. 64 b) y mostró un leve aumento NS del tono diastólico durante la I/R (Fig. 64 d).



Figura 64: Efectos directos de Dronedarona (Drd) 1 μg/ml en perfusión en HipoT (Drd-HipoT): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Ht (% de pre I) (c), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (d). ANOVA de dos vías en Tabla 6: en (b), * p<0.05 vs HipoT-C por Tukey post test. En (d): NS vs HipoT-C (por Tukey post test); * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Los resultados sugieren que Drd tiene efectos cardioprotectores directos cuando se administra en perfusión en corazones EuT, pero no modifica la cardioprotección otorgada por el HipoT.

ii. Evaluación de los canales mitocondriales de potasio ATP-dependientes (mKATP), en

los efectos directos de Dronedarona en I/R en corazones EuT.

Para evaluar si la apertura de los mKATP participa de los efectos cardioprotectores de la perfusión de Drd, se perfundieron los corazones con 5-HD 100 μ M, previo y en simultáneo con Drd antes de la isquemia. 5-HD atenuó la mejora en la P/Ht inducida por Drd durante la pre I (4.3 ± 0.3 mmHg.g/mW vs 8.2 ± 0.8 mmHg.g/mW en Drd EuT, Fig. 65 b). Durante la reperfusión, la recuperación contráctil disminuyó durante la mayor parte de la R (excepto al final) (Fig. 65 a). 5-HD también atenuó la mejoría producida por Drd durante toda la R, pero no se observaron cambios significativos en la contractura diastólica (Fig. 65 c). *Los resultados comprueban que Drd activa a los canales mKATP*.



Figura 65: Efectos de Dronedarona (Drd) 1 μg/ml perfundida en ausencia y presencia de 5-HD 100 μM en corazones de rata EuT (Drd-EuT-LNAME): P (% de pre I) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de I, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 6; * p<0.05 vs Drd-EuT (en a y b, por Tukey Post Test). En c): NS vs Drd-EuT (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

 iii. Evaluación de la participación de la vía del óxido nítrico en los efectos de Dronedarona en perfusión frente a la disfunción por I/Rs en corazones de rata EuT e HipoT.

Para evaluar la participación de las NOS en los efectos de Drd, corazones de rata EuT fueron perfundidos con L-NAME 30 μ M previo y durante la perfusión de Drd antes de la I/Rs. L-NAME disminuyó la contractilidad (P) y la economía muscular (P/Ht) previo a la isquemia en los corazones EuT. Durante la R, el efecto cardioprotector de Drd fue totalmente abolido por L-NAME (hasta 6.0 ± 3.8 % de la P pre I y P/Ht de 0.2 ± 0.2 mmHg.g/mW a los 45 minutos de R) respecto al grupo Drd-EuT (Fig. 66 a y b), mientras que no hubo cambios en la contractura diastólica (Δ LVEDP) (Fig. 66c).



Figura 66: Efectos de la perfusión de Dronedarona (Drd) 1 μg/ml en ausencia y presencia de LNAME 30 μM en corazones de rata EuT (Drd-EuT-LNAME): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 6; * p<0.05 vs Drd-EuT (en a y b, por Tukey Post Test). En c): NS vs Drd-EuT (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

En los corazones HipoT, la perfusión de L-NAME 30 µM antes y durante Drd previo a I, no modificó significativamente la recuperación contráctil ni de la economía muscular total (Fig. 67 a y b) respecto al grupo Drd-HipoT, como tampoco modificó la contractura diastólica (Fig. 67 c).



Figura 67: Efectos de L-NAME 30 μM en la perfusión de Dronedarona (Drd) 1 μg/ml en ratas HipoT (Drd-HipoT-LNAME): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), ΔLVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 6; NS vs Drd-HipoT (en a y b, por Tukey Post Test). En c): NS vs Drd-HipoT (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Se evaluó además si la producción de NO por la iNOS estaba involucrada en los efectos directos de Dronedarona. Para ello, se perfundió AG 30 mM antes y en conjunto con Drd. Durante su perfusión, AG redujo la contractilidad y la P/Ht. Durante la isquemia, los corazones que recibieron el antiarrítmico y AG, mostraron un incremento de la
LVEDP durante el final de este período. Una vez en reperfusión, se redujo la RCPI y la P/Ht (hasta el 23.0 ± 6.7 % de la P pre-I y hasta 1.4 ± 0.4 mmHg.g/mW respectivamente) respecto al grupo de Drd-EuT (Fig. 68 a y b). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la contractura diastólica durante la reperfusión (Fig. 68 c).



Figura 68: Rol de iNOS en los efectos de la perfusión de AG 30 μ M con Dronedarona (Drd) 1 μ g/ml en corazones de rata EuT (Drd-EuT-AG): P (% de pre l) (a), Eco=P/Ht (mmHg.g/mW) (b), Δ LVEDP a 5 y 30 min de l, y 5 y 45 min de R (c). ANOVA de dos vías en Tabla 6; *p < 0.05 vs Drd-EuT (en a y b, por Tukey Post Tests). En c): NS vs Drd-EuT (por Tukey post Test), * p<0.05 vs cero (por t-Test).

Los resultados muestran que la vía del óxido nítrico está involucrada en la protección otorgada por la perfusión de Drd cuando los corazones provienen de animales EuT, particularmente por activación de la iNOS. En cambio, en los corazones HipoT, las NOS no participan del efecto directo producido por el antiarrítmico.

DISCUSIÓN

Efectos del Hipotiroidismo en la I/R

Este trabajo de Tesis demuestra que los mecanismos mitocondriales como los canales mKATP y el mNCX son fundamentales para regular la concentración de Ca2+ mitocondrial en corazones de rata hipotiroideos de manera que previenen la sobrecarga de Ca²⁺ y la disfunción severa durante la I/R. Aunque el hipotiroidismo es considerado un factor de riesgo cardíaco que induce disfunción diastólica, disminuye el metabolismo cardíaco y reduce el trabajo cardíaco (Klein y Danzhi, 2007; Udovcic y col., 2017), su rol protector podría parecer contradictorio en el contexto clínico. En este sentido, existen estudios clínicos que muestran una menor tasa de infarto miocárdico en pacientes hipotiroideos hospitalizados con angor (Dhital y col., 2017). Nuestros resultados muestran que, en presencia de concentraciones fisiológicas de adrenalina, la cardioprotección del hipotiroidismo desapareció, sugiriendo que la estimulación betaadrenérgica acentúa la disfunción. De acuerdo con ello, el tratamiento oral con el alfa- y beta-bloqueante carvedilol restableció la cardioprotección en corazones hipotiroideos perfundidos con adrenalina. Los resultados sugieren que la sobrecarga de Ca²⁺ citosólica y mitocondrial característica de la estimulación beta-adrenérgica reduciría la cardioprotección intrínseca de los pacientes hipotiroideos. Esto abre la posibilidad de utilizar carvedilol como terapia preventiva en pacientes hipotiroideos que además padecen angor. A continuación, se discuten en detalle los resultados experimentales del hipotiroidismo en los dos modelos de I/R, moderado y severo.

Como se describió en la Introducción, la medición simultánea de la contractilidad y la calorimetría empleadas en esta Tesis permite evaluar cambios mínimos en el metabolismo y la función mitocondrial durante los estados de reposo y activo.

Previo a la I/R, la presión contráctil desarrollada (P), las velocidades de contracción y relajación (dP/dt/P), y la economía muscular total (P/Ht) no fueron modificadas en los corazones aislados de ratas HipoT con respecto al grupo EuT (Tabla

1). Sin embargo, los cardiomiocitos HipoT en reposo redujeron su liberación citosólica de Ca^{2+} (señal de Fluo-4) cuando se perfundió una solución Krebs con 36 mM Na⁺ y 10 mM cafeína para liberar el Ca^{2+} del RS evitando su remoción por el NCX. Simultáneamente, la Fig. 14 muestra que se aceleró la remoción de Ca^{2+} citosólica y se redujo el aumento consecuente en la $[Ca^{2+}]m$ mitocondrial (señal de Rhod-2). Este comportamiento sugiere que el hipotiroidismo optimizó la recaptación de Ca^{2+} por la SERCA-2 y redujo el pasaje de Ca^{2+} desde el RS a las mitocondrias. Esto podría contribuir a una menor sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial durante la I/R.

Efectos del HipoT en el modelo de I/R moderado:

En el modelo de I/Rm los corazones HipoT mejoraron la recuperación contráctil respecto a los corazones EuT, sin cambios significativos en la economía muscular P/Ht y atenuando la contractura diastólica al inicio de R (Fig. 17). Estos resultados sugieren que el consumo energético fue proporcional a la actividad miocárdica contráctil.

El metabolismo mitocondrial está relacionado principalmente con la [Ca²⁺], que depende de la captación por el uniporter (UCam) y la extrusión en intercambio con Na⁺ (mNCX) en respuesta a las oscilaciones citosólicas de Ca²⁺ (Gunter y col., 2004). Es bien conocido que el Ca²⁺ es la señal que indirectamente adapta la actividad metabólica mitocondrial a la demanda cardíaca, y las alteraciones en este ciclo ocurren durante la isquemia y reperfusión, promoviendo el aumento peligroso en la [Ca²⁺]m (Piper y col., 2008). Los resultados de la Fig. 24 donde corazones de rata EuT e HipoT se reperfundieron con la solución conteniendo 10 mM cafeína y baja [Na⁺] (liberando Ca²⁺ del RS sin eflujo a través del NCX) sugieren que el HipoT redujo la liberación de Ca del RS en la reperfusión y lentificó la captación de Ca²⁺ en las mitocondrias. Estos resultados concuerdan con los efectos del hipotiroidismo vistos en los niveles de Ca²⁺ citosólico y mitocondrial en cardiomiocitos aislados no isquémicos, discutido en el punto

anterior. Además, los efectos del hipotiroidismo descriptos sobre la interacción funcional RS-mitocondrias en los corazones post-isquémicos (evidenciados por cafeína y baja [Na⁺]) contribuirían a optimizar los transitorios de Ca²⁺ en la reperfusión con Krebs-C, evitando el leak que genera contractura diastólica, y evitando la sobrecarga de Ca2+ mitocondrial que conduce a la disfunción en corazones de rata EuT. Por otro lado, los resultados en corazones expuestos al modelo de I/R de aturdimiento moderado, demuestran que después de bloquear el mNCX selectivamente con clonazepam (Clzp) (Cox y Matlib, 1993), la RCPI se redujo en corazones HipoT, pero aumentó en EuT, con cambios proporcionales en la economía muscular (P/Ht) (Fig. 19 y 20). El efecto producido por Clzp en corazones EuT sugiere que el bloqueo parcial de la extrusión vía mNCX estaría aumentando la [Ca2+]m a niveles óptimos para incrementar el metabolismo mitocondrial y la fosforilación oxidativa, lo cual mejora la recuperación postisquémica. En cambio, la reducción de la RCPI y P/Ht y el aumento de la contractura diastólica (ΔLVEDP) obtenidas por Clzp en corazones HipoT expuestos a I/Rm sugiere que se habría elevado la [Ca2+]m a niveles disparadores de disfunción mitocondrial. De hecho, la disfunción postisquémica inducida por Clzp en corazones HipoT fue atenuada por ciclosporina-A (Cys-A), un inhibidor conocido de la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), ya que se incrementó la RCPI. Se sabe que estos poros se abren en respuesta a la sobrecarga de Ca2+, con pérdida de contenido mitocondrial y disfunción o apoptosis. Por lo tanto, los resultados demuestran que el hipotiroidismo induce la extrusión de Ca²⁺ mitocondrial a través del mNCX en corazones impidiendo la sobrecarga de Ca2+ y la apertura del mPTP durante la I/Rm. Además, la reducida contractura diastólica (ΔLVEDP) y la P/Ht alta durante la I/R en corazones HipoT sugieren que el Ca2+ citosólico se removió de manera eficiente por los transportadores sarcolemales (NCX y Ca-ATPasas) y sarcorreticulares (SERCA). Esta eficiencia en la remoción de Ca²⁺ contribuye a mejorar la recuperación postisquémica de la síntesis de ATP con un menor desacoplamiento energético, debido a que se impide la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial. En consecuencia, el HipoT induce una mayor carga y liberación de Ca²⁺ sarcorreticular y una mejor recuperación contráctil y energética respecto a los corazones EuT, preservando la óptima [Ca²⁺]m y el tono diastólico.

Por otra parte, se evaluó si en la cardioprotección del HipoT en I/Rm participa la activación de los canales mKATP, los cuales reducen el gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial, y en consecuencia reducen la captación de Ca²⁺ por el UCam (Garlid y col., 1997). Sin embargo, los corazones HipoT y EuT expuestos al bloqueante selectivo de los mKATP, 5-HD, antes de la exposición a la I/R moderada no afectaron la recuperación de P ni P/Ht, pero generaron un importante aumento de la contractura diastólica. Estos resultados sugieren que la activación de los mKATP participa en el mantenimiento de los niveles de Ca²⁺ diastólico en la recuperación postisquémica del corazón aturdido. Este mecanismo participa tanto en corazones EuT como en HipoT, aunque estos últimos mantienen una reducida contractura respecto a los EuT (Fig. 22 vs 23).

Efectos del HipoT en el modelo de I/R severo

Antes de la isquemia, los ventrículos de ratas HipoT y EuT no diferían en su contractilidad (P) ni en su economía muscular total (P/Ht) (Tabla 1). Sin embargo, después de la I/R severa la recuperación de P y de P/Ht aumentó en los corazones HipoT. Estos resultados sugieren que los corazones HipoT aumentaron el rendimiento contráctil postisquémico con un menor consumo energético, lo que puede estar asociado con un metabolismo reducido. Se sabe que el Ht es liberado por los procesos exotérmicos del miocardio, como el acoplamiento de actomiosina, la captación citosólica de Ca²⁺, otras bombas iónicas y el metabolismo mitocondrial en condiciones basales y activas (este último proporcional al consumo de oxígeno) (Gibbs y Chapman, 1979; Ponce-Hornos y col., 1995). Entonces, con la mayor recuperación contráctil postisquémica, los corazones HipoT tienen que liberar un calor dependiente de la

tensión más alto que los corazones EuT. En consecuencia, el Ht bajo (en relación con P) puede deberse a la reducción en el calor independiente de la tensión (TIH, una parte de la energía activa relacionada con la unión y remoción de Ca²⁺, Na⁺K⁺-ATPasa y el metabolismo mitocondrial). Estos resultados podrían estar de acuerdo con los informes que describen un metabolismo y una capacidad oxidativa reducidos en los corazones de ratones hipotiroideos con menor demanda metabólica y mayor resistencia a la I/R (Venditti y col.; 2003; Pape y col., 2022). En esta Tesis, esto se evidencia en la mejoría en la recuperación de la economía muscular ante el desafío de I/R severo. También, la mayor recuperación post-isquémica de corazones HipoT está de acuerdo con los reportes explicados en el punto 3 de Introducción referidos a diversos modelos de I/R en hipotiroidismo en rata (Mourouzis y col. 2009; Seara y col., 2018) y en ratones (Pape y col., 2022). Los resultados confirman la hipótesis formulada acerca de que en el hipotiroidismo la reducción del metabolismo celular actúa como un factor de economía muscular y protección.

Inicialmente se evaluó el origen de la reducida recuperación post-isquémica de los corazones de ratas EuT durante la I/Rs. La Fig. 28 demuestra que la perfusión de ciclosporina-A mejoró la RCPI y la P/Ht, demostrando que en el modelo de I/Rs se activan los mPTP, originando disfunción. Si bien Cys-A no redujo la contractura diastólica durante I/R, esto acuerda con reportes previos en los que esta droga aumenta el tono diastólico por unirse a otras proteínas, como calmodulina, el UCam y receptores de membrana (Griffiths y Halestrap., 1993; Ragone y Consolini, 2009). Dado que la apertura del poro mPTP depende de la sobrecarga de Ca²⁺ y/o de ROS, se evaluó el efecto del scavenger de ROS, MPG, y se encontró que mejoraron la RCPI y la P/Ht. Estos resultados confirman que en este modelo de I/R severo se acumulan ROS mitocondriales que inducen la apertura de los mPTP. Esto genera la importante disfunción mecánico-energética que permite que se recupere sólo un 15% de la P inicial, aún cuando estos corazones no desarrollaron un alto porcentaje de infarto (16.7 ± 1.4%) luego de 120 minutos de R (Fig. 46).

Por otra parte, se evaluó el rol de las NOS y particularmente de la iNOS en la disfunción por I/Rs de corazones de rata eutiroidea. Los resultados obtenidos por perfusión de L-NAME y de AG (Figs. 30 y 31) sugieren que la iNOS tiene un rol perjudicial en la I/Rs, contribuyendo a la reducida recuperación contráctil postisquémica, aunque no contribuye a la contractura diastólica. Es conocido que el NO tiene un papel bifuncional en la disfunción isquémica, dependiendo de la concentración. Este resultado acuerda con la descripción de que los altos niveles de NO producidos por la NOS inducible (iNOS) promueven la apoptosis, mientras que los bajos niveles de NO catalizados por la isoenzima endotelial (eNOS) mejoran la cardioprotección (Razavi y col., 2005).

En corazones de ratas hipotiroideas expuestos a I/Rs, la perfusión previa de L-NAME mejoró ligeramente la RCPI, pero aumentó la contractura diastólica (ΔLVEDP) (Fig. 32). En cambio, el blogueante selectivo de las iNOS, AG, redujo mucho la recuperación contráctil sin cambios en P/Ht durante la reperfusión, y también provocó un gran aumento de la contractura diastólica (Δ LVEDP) durante la I/Rs (Fig. 33). Estos resultados sugieren que en corazones de rata HipoT se activa la iNOS a niveles que aportan beneficios para enfrentar el desafío de la I/Rs, previniendo la disfunción tanto en la contracción como en el tono diastólico, pero manteniendo el balance energético. En cambio, otras isoenzimas como eNOS y/o nNOS tendrían un rol negativo en la RCPI, que en parte supera al beneficio de la iNOS. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con el trabajo de Jeddi y col. (2016) que muestra que el hipotiroidismo fetal, seguido por I/R en los corazones de las mismas ratas adultas incrementaron la expresion de iNOS, pero también la relación Bax–Bcl2, y la apoptosis con respecto a los corazones de ratas EuT, y todo ello fue revertido por la inhibición de la iNOS. En los presentes resultados de I/Rs en corazones HipoT hay una participación de la iNOS, pero como responsable de un efecto protector. Es importante considerar que la iNOS puede tener un rol dual (Yu y col. 2018). La función depende de los niveles de NO producidos, siendo protectora a bajas [NO] (Tsibulnikov y col., 2018). La producción de bajas [NO]

puede inducir la vía de señalización para cGMP, PKG y canales mKATP, lo cual conduce a la reducción de la sobrecarga de calcio mitocondrial. Así, se previene la apertura de los mPTP, y ello conduce a una mejora de la tolerancia cardíaca a la isquemia/reperfusión (Costa y col., 2008). Los resultados sugieren que esta vía se activaría en los corazones HipoT expuestos a I/Rs. Por otro lado, se ha reportado que la iNOS junto al estrés oxidativo elevado (altos niveles de ROS) desacoplan a la eNOS hacia la producción de alta [NO] y de superóxido que forman peroxinitrito (ONOO-) el cual genera importante daño durante el inicio de la reperfusión (Amrani y col, 1995; Mercanoglu y col., 2015). Esta vía parece contribuir a la menor recuperación postisquémica en los corazones de rata EuT expuestos a I/Rs. Por otra parte, el donador de NO endotelial nitroprusiato redujo P solo en los primeros tiempos de R en corazones de rata HipoT (Fig. 34), como un efecto no espejo al de L-NAME, lo que sugiere que el efecto de NO es realmente diferente dependiendo de su concentración y de la localización celular.

Por lo tanto, los resultados actuales sugieren que la activación de iNOS es benéfica para evitar la contractura diastólica en I/Rs, pero la activación del conjunto de otras NOS's es negativa para la recuperación contráctil de los corazones HipoT. Sin embargo, la mayor RCPI de corazones HipoT respecto a los de ratas EuT sugiere que la influencia de las NOS fue minimizada por otros mecanismos cardioprotectores, que se discutirán a continuación.

La disfunción mitocondrial después de la isquemia se asoció con cambios en las vías celulares, como un nivel bajo de Akt fosforilada y de proteínas quinasas activadas por redox como vías de señalización de PKCɛ (Chen y col., 2013). Estos cambios contribuyen indirectamente a la apertura del mPTP e hinchazón mitocondrial, sobrecarga de Ca²⁺ y de especies reactivas de oxígeno (ROS) y apoptosis. Por el contrario, la fosforilación de la vía PI3K/Akt conduce a la cardioprotección, mientras que buenos niveles de PKCɛ estimulan la apertura de mKATP (Wang y col., 2015). Otros autores están de acuerdo con la secuencia cardioprotectora de la fosforilación de

PI3K/Akt, la producción de NO y la activación de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ en los corazones isquémicos (Ogita y col., 2004). Además, la fosforilación de PI3K/Akt estimula la eNOS y la S-nitrosilación de proteínas, que finalmente activan los canales mKATP (Deschamps y col., 2010). En nuestros resultados, tanto el bloqueo de la fosforilación de PI3K/Akt con la wortmanina (Wrt) como el de la PKC con celeritrina (Che) redujeron fuertemente la P postisquémica y la economía muscular de los corazones HipoT expuestos a I/R severa, y también aumentaron la contractura diastólica (LVEDP) (Figs. 35 y 36). Por lo tanto, los resultados sugieren firmemente que la activación de las vías de PI3K y PKC contribuyen a la cardioprotección en los corazones HipoT. En concordancia, otro estudio mostró que la PKCE está sobreexpresada en corazones de ratas HipoT (Pantos y col., 2003). Otros trabajos involucraron diversas vías proteicas en la resistencia de los corazones de ratas HipoT a la lesión por I/R, como la reducción en la fosforilación de las proteínas guinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de la quinasa N-terminal jun (JNK) (Mourouzis y col., 2009). Además, los corazones de ratas HipoT mostraron una mayor expresión de conexina-43 (Cx43) y sus formas fosforiladas, así como un aumento de PKCE que fosforila a Cx43, en comparación con los controles EuT, de manera que este hecho explicó la resistencia a las arritmias malignas (Baĉová y col., 2016). Otro trabajo relacionó que la cardioprotección del HipoT podría asociarse a una mayor síntesis de enzimas antioxidantes, como la SOD (Seara y col., 2018). El mantenimiento de un bajo nivel de ROS y las vías antiapoptóticas de PKC y PI3K podrían contribuir a activar los canales mKATP y proteger las mitocondrias contra la sobrecarga de Ca²⁺ y el desacoplamiento energético. De hecho, los resultados de la Fig. 38 muestran que el bloqueo de los mKATP con 5-HD previo a la I/Rs, redujo la RCPI y P/Ht durante R, y aumentó la contractura diastólica. Esto demuestra que en el modelo de I/Rs ocurre la activación de los canales mKATP, lo cual contribuye a prevenir la sobrecarga mitocondrial de Ca2+ en corazones HipoT. Se sabe que el diazóxido abre los canales mKATP y reduce la carga mitocondrial de Ca2+ debido a la caída en el gradiente eléctrico de la membrana interna ($\Delta \Psi m$) y la activación de la respiración mitocondrial

(Murata y col., 2001). Los resultados muestran que 5-HD, inhibidor selectivo de los canales mKATP, redujo fuertemente la P postisquémica en corazones HipoT expuestos a I/R severa pero no en los corazones EuT. Por lo tanto, la apertura de los canales mKATP contribuye a la cardioprotección sólo en los corazones HipoT bajo I/Rs, previniendo la sobrecarga mitocondrial de Ca2+. Ésta se genera en los corazones EuT en los cuales este modelo activa al poro mPTP, según demostró la reversión de la disfunción inducida por Cys-A (Fig. 28). La apertura de los canales mKATP por el HipoT en este modelo de I/Rs podría ser consecuencia de la activación de la vía de PKC₂, según fue reportado en otras situaciones (Wang y col., 2015). Alternativamente, podría provenir de la activación por bajas [NO] de la vía cGMP/PKG/mKATP (Costa y col. 2008), según se discutió anteriormente. Otro mecanismo del HipoT que demostró prevenir la sobrecarga de Ca2+ mitocondrial y la disfunción post-isquémica es el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (mNCX), ya gue su participación se evidenció mediante el bloqueo con clonazepam que es un bloqueante selectivo en corazón (Cox y Matlib, 1993; Ragone y Consolini, 2009). Este bloqueo redujo la recuperación contráctil y aumentó la contractura diastólica en corazones de rata HipoT, pero no en los de ratas EuT (Fig. 40 y 39, respectivamente), demostrando que el mNCX se activa por el hipotiroidismo. Como se describió antes, este mecanismo cardioprotector del hipotiroidismo, de estimulación del mNCX, está presente en ambos modelos de I/R, moderado y severo.

Como se mencionó anteriormente, los resultados encontrados en los corazones aislados de ratas hipotiroideas, que mostraron una mejora en la recuperación contráctil postisquémica y en la economía muscular están de acuerdo con reportes preclínicos (Bobadilla y col., 2001; Seara y col., 2018; Pape y col., 2022), que mencionan que el hipotiroidismo aumenta la resistencia al daño isquémico. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los reportes clínicos de riesgo cardíaco en pacientes hipotiroideos (Nyirenda y col., 2005; Jabbar y col., 2015). Se hipotetizó entonces que en la condición fisiológica podría modificarse la respuesta por la presencia de adrenalina. Cuando se

perfundió ésta a la concentración plasmática fisiológica, todos esos mecanismos cardioprotectores de los corazones hipotiroideos expuestos a I/R fueron atenuados. Como se ha descrito, la estimulación de los receptores beta-adrenérgicos de corazones HipoT aumenta tanto el influjo de Ca²⁺ por los canales L como la remoción citosólica por el RS y las mitocondrias, aumentando la disponibilidad de Ca²⁺ para la contracción (inotropismo positivo), pero también la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial típica de la I/R (Montalvo y col., 2018). Con este alto nivel de Ca2+ citosólico, los mecanismos mitocondriales cardioprotectores del hipotiroidismo se minimizarían, explicando así que tanto la RCPI como la P/Ht se redujeran con una fuerte contractura diastólica, así como sucedió con los corazones EuT con o sin perfusión de adrenalina (Fig. 41). Las consecuencias obtenidas con concentraciones fisiológicas de Adre explican por qué el hipotiroidismo es un factor de riesgo en pacientes con enfermedad coronaria (Klein y Danzhi, 2007). Sin embargo, se ha descrito que el HipoT reduce la incidencia de episodios agudos de síndrome coronario en pacientes HipoT hospitalizados por angor (Dhital y col., 2017). La diferencia podría deberse al control clínico de la estimulación adrenérgica por los beta-bloqueantes con que suelen estar tratados los pacientes. De hecho, cuando tratamos por vía oral ratas HipoT con carvedilol, los corazones postisquémicos mejoraron la recuperación contráctil con un gasto energético proporcional, a pesar de mantener la contractura diastólica (Fig. 43). Este efecto del carvedilol podría estar asociado a la reducción de las vías beta-adrenérgicas y a la actividad antioxidante sobre las mitocondrias cardíacas (Oliveira y col., 2005).

Efectos de Amiodarona

Efectos de la administración oral subaguda de Amiodarona

Este trabajo de Tesis demuestra que Amd tiene efectos cardioprotectores bajo tratamiento oral subagudo, previniendo la disfunción post-isquémica tanto en la

recuperación contráctil (P) como en la economía (P/Ht) durante la reperfusión (Fig. 44). La medición simultánea de la liberación de calor permite evaluar cambios en el metabolismo y la función antes y durante los períodos de I/R, y la relación P/Ht proporciona una estimación de la economía muscular (Ponce-Hornos y col., 1982; Consolini y col., 2017; Ragone y col., 2020). Sin embargo, la cardioprotección de la Amd oral subaguda observada en corazones de ratas eutiroideas se perdió en las ratas hipotiroideas. A continuación, se analizan y discuten los mecanismos subyacentes a tales comportamientos tan diferentes.

Si bien antes de la I/R el tratamiento subagudo con amiodarona oral no modificó significativamente la presión desarrollada en la contracción (P) ni la economía muscular total (P/Ht) en corazones eutiroideos, aumentó la velocidad relativa de contracción (+dP/dt/P) y de relajación (-dP/dt/P) (Tabla 2). Estos efectos están de acuerdo con los resultados reportados para amiodarona en un modelo de potenciación post-extrasistólica en papilar de rata, que fueron interpretados como una mayor disponibilidad de Ca²⁺ en retículo sarcoplásmico para la contracción, y mayor recaptación de Ca²⁺ por la SERCA-2 (De Afanas'ev y col., 2002). Al aumentar la cantidad de calcio disponible para la contracción y facilitar su recaptación, la amiodarona influye en las velocidades de contracción y relajación del músculo cardíaco.

Por otra parte, los resultados demuestran la ventaja de medir la calorimetría (Ht y P/Ht) sobre la única medición de los cambios contráctiles en los corazones de las ratas eutiroideas tratadas con amiodarona oral. Esto se evidencia en que el Ht post-isquémico resultó más bajo que el preisquémico, mientras que ocurrió lo opuesto con los corazones de ratas eutiroideas (Fig. 44 b). En consecuencia, la economía P/Ht recuperó más que la contractilidad (P%) (Fig. 44 c). Estos resultados sugieren que amiodarona protegió a los corazones del daño energético aún más que de la disfunción contráctil.

En cuanto a los mecanismos subyacentes al efecto de amiodarona en la I/Rs, los resultados demuestran que la cardioprotección de Amd en corazones EuT depende de la activación de PKC y de los canales mKATP, ya que la celeritrina y el 5-HD

redujeron fuertemente la recuperación contráctil y P/Ht aumentando la contractura diastólica en la reperfusión (Fig. 47 y 48). Dado que en la baja recuperación contráctil y de la economía en corazones de rata EuT expuestos a I/Rs no participan los canales mKATP (Fig. 37), dicho mecanismo resulta propio del tratamiento subagudo con amiodarona oral. Además, cuando en los corazones eutiroideos tratados con amiodarona se bloquearon los canales mK_{ATP} con 5-HD, el Ht post-isquémico se incrementó con respecto al Ht inicial. Esto demuestra que dicho bloqueo indujo la disfunción mitocondrial con excesivo gasto energético para recuperar su gradiente electroquímico, por lo cual P/Ht se recuperó en menor porcentaje que la contractilidad (Fig. 48).

Como se explicó anteriormente, estos mecanismos son parte de una vía de cardioprotección en la que la PKC tiene un papel crucial, como ocurre también en el precondicionamiento (Kawamura y col., 1998; Chen y col., 2021). Uno de los objetivos de la PKCε mitocondrial es la activación de los mKATP; la consecuente entrada de K⁺ reduce el gradiente eléctrico para la captación mitocondrial de Ca⁺² y así previene la sobrecarga y la disfunción (Penna y col., 2006; Wang y col., 2015).

Otra vía que se evaluó si participa en la cardioprotección de la amiodarona oral en corazones EuT fue la vía RISK (PI3K/Akt), bloqueando la activación de PI3K con wortmanina. La reducción de la RCPI y la P/Ht después de perfundir wortmanina sugiere que la vía PI3K/Akt también es parcialmente responsable de la cardioprotección de Amd en ratas EuT (Fig. 54). Si bien la expresión de Akt reflejó sólo una tendencia al aumento (Fig. 58) en corazones EuT-Amd al final de la I/Rs, los cambios farmacológicos observados demuestran un aumento en la funcionalidad de PI3K independiente de no encontrar un aumento significativo en la expresión de proteínas. Se sabe que la activación de la vía PI3K/Akt conduce a la cardioprotección con la consecuente producción de NO y S-nitrosilación de proteínas, que finalmente activan a los canales mKATP (Deschamps y col., 2010). Por lo cual, los resultados muestran la confluencia de las vías de PI3K/Akt y de PKC en la activación de los canales mKATP para generar

cardioprotección por amiodarona. Estas vías también tienen otros múltiples objetivos, como la activación de mTOR y BCL2 (una proteína antiapoptótica inducida por Akt/mTOR) que reducen la disfunción por I/R (Deng y col., 2013; Potz y col., 2018).

Por otro lado, las isoenzimas de NOS (eNOS, iNOS o nNOS) contribuyen a regular el funcionamiento mitocondrial, pero niveles elevados de NO podrían causar disfunción durante la I/R (Andreadou y col., 2020). La eNOS endotelial se ha asociado frecuentemente con una vasodilatación coronaria beneficiosa (Razavi y col., 2005). Sin embargo, la I/R podría inducir el desacoplamiento de eNOS en los cardiomiocitos, de manera que la combinación de altos niveles de NO y superóxido puede producir peroxinitrito, que es tóxico para las mitocondrias (Khadour y col., 2002, Förstermann y Li, 2011). Cuando se perfundieron los corazones de ratas Amd-EuT con L-NAME, para bloquear de forma no selectiva las isoenzimas NOS, se redujo la RCPI y la P/Ht (Fig. 50), sugiriendo que Amd indujo un bajo nivel protector de NO. El hecho de que la aminoguanidina (AG) también haya reducido la cardioprotección de Amd (Fig. 51) permite concluir que es la activación de iNOS la que contribuye a los efectos beneficiosos de Amd. Adicionalmente, el hecho de que el MPG no cambió la recuperación postisquémica de los corazones de ratas Amd-EuT (Fig. 55) sugiere que Amd previene la acumulación de ROS durante la I/R.

Por el contrario, en corazones de rata EuT tanto L-NAME y AG como MPG aumentaron la RCPI (Fig. 52, 53 y 56, respectivamente), lo que sugiere que la activación de iNOS y la producción de ROS contribuyen a la disfunción post-isquémica, posiblemente mediante la formación de peroxinitrito, con consecuencias que incluyen la activación de la apertura del mPTP, ruptura o necrosis mitocondrial, alteración del potencial de membrana mitocondrial y finalmente apoptosis (Förstermann y Li, 2011; Bugger y col., 2020).

En conjunto, los resultados sugieren que Amd cambió el papel de iNOS durante la I/R, de perjudicial a beneficioso, lo cual podría deberse a la actividad antioxidante de Amd como eliminador de radicales hidroxilos (Ide y col., 1999). A pesar de la activación

de iNOS, su expresión no fue alterada por Amd ni por el HipoT, como así tampoco las expresiones de eNOS o nNOS (Fig. 57). Sin embargo, las tendencias a aumentar tanto nNOS como eNOS en Amd-EuT sugieren una posible regulación positiva de las NOS protectoras. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que nNOS y Mn SOD presentan una distribución celular que se colocaliza con las mitocondrias (Brahmajothi y col., 1999), esto contribuye a explicar los efectos beneficiosos de Amd en corazones de rata EuT. Algunas vías cardioprotectoras dependen del NO, entre ellas la PKCε (Ping y col. 1999; Xuan y col., 2007). La PKC está involucrada en el efecto de Amd, como se discutió anteriormente.

A pesar de estos beneficios, Amd no redujo el tamaño del infarto después de 2 horas de reperfusión, lo que concuerda con informes anteriores (Kolettis y col., 2007). Aunque la determinación del tamaño del infarto se considera un índice predictivo de cardioprotección (Lecour y col., 2021), es importante que Amd reduce el aturdimiento. Es decir, el tratamiento subagudo con Amd oral protegió al corazón de la disfunción en los primeros tiempos de reperfusión, lo que supone un buen indicio si estos resultados pudieran extrapolarse a la clínica. En conclusión, los efectos cardioprotectores de Amd oral subaguda en corazones de rata EuT "con aturdimiento" implicaron la activación de iNOS y atrapamiento de radical hidroxilo, así como la activación de PKC, de los canales mKATP y de la vía antiapoptótica de PI3K/Akt (Fig. 69).



Figura 69. Mecanismos involucrados en los efectos del tratamiento subagudo con amiodarona oral (Amd) en corazones eutiroideos (EuT) e hipotiroideos (HipoT) expuestos a l/R.

Por otro lado, la administración oral subaguda de Amd en ratas HipoT redujo la cardioprotección, con una menor recuperación de P y P/Ht respecto a la obtenida en corazones de ratas HipoT sin tratar (Fig. 45). En la primera parte de esta Tesis se demostró que los corazones de rata HipoT exhiben por sí solos cardioprotección, asociada principalmente a la activación de las vías PI3K/Akt y PKC, canales mKATP y mNCX, que reducen la $[Ca^{2+}]m$ (punto 5 de Resultados). Sin embargo, en corazones de ratas HipoT tratadas con Amd oral, la Fig. 49 mostró que los canales mKATP no se activaron, ya que 5-HD no cambió la RCPI ni la recuperación de la P/Ht. Además, la iNOS tampoco se activó bajo el tratamiento con HipoT-Amd, ya que las perfusiones de L-NAME y de AG no afectaron las recuperaciones post-isquémicas de P y P/Ht (Fig. 52 y 53), y además la expresión de iNOS permaneció sin cambios (Fig. 57). Por el contrario, como se describió en el punto 5.iii, en corazones de ratas HipoT bajo I/Rs, L-NAME y AG permitieron demostrar que la iNOS contribuye a la cardioprotección, mientras otras NOS contrarrestan el efecto protector. Entonces, la combinación de Amd en ratas HipoT podría estar activando un mecanismo que minimiza el papel de iNOS y previene la apertura de los canales mKATP. Éste podría ser una producción excesiva de ROS no eliminadas por la amiodarona, como lo es el radical ⁻OH (Ide y col., 1999). Por lo tanto,

es posible pensar que la Amd oral en ratas HipoT estimularía la producción de un exceso de superóxido y/o H₂O₂. De hecho, los resultados de la Fig. 56 muestran que la perfusión del "atrapador de ROS" MPG mejoró las recuperaciones de P y P/Ht en corazones de ratas Amd-HipoT, lo que demuestra que la disfunción postisquémica estaba relacionada con un exceso de ROS. Se sabe que la producción mitocondrial de ROS proviene del metabolismo aeróbico normal, e incluso concentraciones bajas de ROS pueden actuar como mediadores en muchas vías de señalización celular en condiciones fisiológicas. El superóxido se genera por reacción de electrones en exceso con oxígeno molecular de la cadena respiratoria. Es considerado un ROS inicial pero muy reactivo y de corta duración que puede comenzar la formación de otros, como el H_2O_2 y el -OH (Bugger y col., 2020). El H_2O_2 sale de las mitocondrias y activa varios factores de transcripción, receptores acoplados a proteína G, como las proteínas reguladoras de homeostasis de calcio (canales de Ca⁺² tipo L, receptores de rianodina, calmodulina, SERCA2a) y la PKC. A niveles bajos de H₂O₂, estas reacciones apoyan efectos beneficiosos como en el precondicionamiento isquémico, el poscondicionamiento y el condicionamiento remoto, que resisten la disfunción (Moris y col., 2017; Das y col., 1999, Bugger y col., 2020). El superóxido se convierte principalmente en H₂O₂ por la catálisis de la enzima manganeso-superóxido dismutasa (MnSOD), presente en las mitocondrias cardíacas en grandes cantidades, que luego es metabolizado por la catalasa y otros sistemas desintoxicantes. Durante la I/R, el exceso de ROS es consecuencia de la acumulación de succinato, aumento de la producción de H₂O₂ y alteración de la degradación de superóxido (por inhibición de MnSOD) (Bugger y col., 2020). El hecho de que el MPG, como eliminador de ROS, mejoró la recuperación postisquémica de los corazones de ratas Amd-HipoT (Fig. 56) sugiere que la disfunción depende de altos niveles de superóxido. Este resultado concuerda con reportes previos de que MPG reduce la oxidación de CAMKII y RyR2 durante la I/R (Becerra y col., 2016). Sin embargo, MPG no modificó la recuperación de corazones de ratas Amd-EuT, como se discutió anteriormente, y aumentó la recuperación contráctil y de P/Ht en corazones de ratas

EuT no tratadas, pero esa mejoría fue menor que en los corazones de ratas Amd-HipoT (Fig. 29). Esto demuestra que la producción excesiva de ROS durante I/R ocurre solo cuando Amd se administró en condiciones de HipoT. Además, dado que L-NAME no afectó la RCPI de corazones de ratas Amd-HipoT (Fig. 52), no habría activación de las NOS, sugiriendo que el exceso de especies reactivas en corazones de rata Amd-HipoT corresponde a ROS, pero no a especies reactivas de nitrógeno (RNS, como peroxinitrito). Aunque no hubo cambios significativos en la expresión de MnSOD con el tratamiento de Amd en ambos tipos de corazones de rata, la leve tendencia al aumento de MnSOD en los corazones HipoT podría sugerir una posible participación de acuerdo a los datos obtenidos en los experimentos mecano-calorimétricos. Por otra parte, en el trabajo de Seara y col. (2018) se demostró que la cardioprotección del hipotiroidismo se asociaba con una mayor síntesis de enzimas antioxidantes, como la SOD. En conclusión, estos resultados sugieren que una alta producción de superóxido sería la causa de la reducción en la recuperación post-isquémica de los corazones de ratas HipoT tratadas con Amd oral.

La pregunta es porqué la combinación de dos condiciones independientemente cardioprotectoras, amiodarona e hipotiroidismo, generan una reducción en la cardioprotección. Si bien en esta Tesis no se investigó ese punto, los efectos benéficos del MPG sugieren la excesiva producción de superóxido, y ello podría asociarse a un sinergismo sobre la producción de ROS en la cadena respiratoria mitocondrial, al considerar los siguientes reportes bibliográficos. El hipotiroidismo redujo la capacidad oxidativa mitocondrial de sustratos en los complejos I, II y IV, y la respiración mitocondrial (Athéa y col., 2007). Venditti y col. (2019) mostraron que el hipotiroidismo afecta la capacidad antioxidante de las mitocondrias cardíacas debido a que se reduce la remoción del H₂O₂ porque disminuyen los niveles de citocromo C. Además, recientemente Romão y col. (2024) demostraron que el hipotiroidismo aumenta la maquinaria de la fisión mitocondrial y el estrés oxidativo, induciendo el daño mitocondrial y anulando la señal de mitofagia. Por otra parte, amiodarona demostró diferentes efectos

sobre la respiración mitocondrial, dependientes de la concentración en mitocondrias cardíacas aisladas de rata: sin efecto hasta 6 µM, desacoplamiento entre 6 y 30 µM, e inhibición de la cadena respiratoria a mayores concentraciones (Varbiro y col., 2003b). Moreau y col. (1999) también reportaron que amiodarona redujo la respiración mitocondrial, inhibió los complejos I y III, y la fosforilación oxidativa. A pesar de que las concentraciones plasmáticas de amiodarona son de alrededor de 2 µM, ésta puede concentrarse en tejidos, formando cuerpos de inclusión multilamelar intralisosomal en muchos órganos, tales como pulmón, hígado, corazón, piel, epitelio corneal y fibras nerviosas periféricas (Betiu y col., 2021). Estos mecanismos fueron reportados para la toxicidad de amiodarona en pacientes geriátricos y a nivel de la fibrosos pulmonar (Betiu y col., 2021). Entonces, el sinergismo entre estos mecanismos podría también explicar la baja cardioprotección que se encontró en los corazones de ratas hipotiroideas tratadas oralmente con amiodarona, como una aditiva reducción de la respiración mitocondrial y baja síntesis de ATP, con el consecuente aumento en la producción de ROS. Además, a la disfunción en dichos corazones podría contribuir un sinergismo en atenuar la función de la SERCA2, reportada tanto para el hipotiroidismo (Montalvo y col., 2018) como para la amiodarona (Eskes y Wiersinga, 2009). Este mecanismo incrementaría el leak citosólico de Ca²⁺, con la disfunción contráctil y la sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺ y de ROS.

Efectos directos en I/Rs por perfusión de amiodarona

Durante la reperfusión de los corazones EuT que fueron perfundidos con Amd 5 µg/ml (Xing y col., 2014), no mejoró la recuperación post-isquémica de la contractilidad ni de la economía muscular, pero se redujo la contractura diastólica (Fig. 59). En cambio, en los corazones de ratas HipoT, la perfusión de Amd abolió por completo la cardioprotección inducida por el hipotiroidismo (Fig. 60). Esto sugiere que el mecanismo

de bloqueo de los canales de Ca²⁺ ya conocido de amiodarona podría ser responsable del efecto en corazones de rata HipoT. La falta de efecto de amiodarona en corazones EuT sugiere que la disfunción post-isquémica en EuT es menos dependiente del influjo de Ca²⁺ que la de corazones HipoT. De hecho, según se discutió anteriormente, en la I/Rs de corazones de rata EuT la disfunción se asoció a excesiva pérdida de Ca²⁺ del RS y sobrecarga de Ca²⁺ y ROS mitocondrial con apertura del mPTP. En cambio, en corazones de rata HipoT se optimizó el transitorio de Ca²⁺ por un mejor funcionamiento mitocondrial sin sobrecargas, y se activó la vía de PKC que entre otros "targets" fosforila y activa a los canales de Ca²⁺ tipo L.

Por otra parte, la Fig. 61 muestra que la pérdida de cardioprotección de Amd en corazones de ratas EuT está acompañada por alta producción de ROS, debido a que MPG incrementó la recuperación. Sin embargo, el efecto de MPG fue similar al obtenido con los corazones EuT-C sin tratamiento (Fig. 29), sugiriendo que la perfusión de Amd no alteró la producción de ROS propia de la I/Rs. Además, los resultados sugieren que las NOS sólo contribuyen a prevenir la contractura diastólica en el efecto directo de la perfusión de Amd en corazones de rata EuT, ya que ésta fue incrementada por L-NAME (Fig. 62). La Fig. 70 resume esquemáticamente los mecanismos de la perfusión de amiodarona involucrados en corazones de ratas EuT e HipoT.

Comparando estos resultados de Amd perfundida con los de Amd oral previamente discutidos, hipotetizamos que la cardioprotección por Amd oral dependería de mecanismos que se activan en la administración subaguda. En este sentido, Moreau y col. (1999) mostraron que la administración de amiodarona durante 5 días a concentraciones de 100 mg/kg/día (vía intraperitoneal) ejerció efectos cardioprotectores. Este efecto se asoció al incremento de la eficiencia metabólica cardíaca y reducción de arritmias ventriculares graves durante la reperfusión, así como la protección contra el daño inducido por la sobrecarga de Ca⁺² y la isquemia (Moreau y col., 1999).

Sería posible también que un metabolito de Amd, como la desetilamiodarona (DEA) (Gill y col., 1992) fuera responsable de la mayor recuperación mecánico-

calorimétrica de los corazones de ratas EuT tratadas con Amd oral. Sin embargo, esta hipótesis fue desestimada dado que ha sido demostrado que este metabolito no contribuye al efecto cardioprotector cuando se administró en dosis de 20 mg/kg por vía intravenosa 30 minutos previo a la extracción de los corazones (Varbiro y col., 2003a). Sin embargo, otros metabolitos menos conocidos podrían participar en la cardioprotección de amiodarona por vía oral subaguda.

Efectos de Dronedarona

La perfusión de dronedarona 1 µg/ml o 1.7 µmol/L (Kondratieva y col., 2018) mejoró la RCPI y la economía muscular en corazones EuT expuestos a l/Rs (Fig. 63). El resultado concuerda con lo reportado por Pantos y col. (2002) quienes evaluaron el efecto de la administración oral de dronedarona 30 mg/kg/dia durante dos semanas a ratas Wistar macho cuyos corazones fueron expuestos a 30 minutos de isquemia y 45 minutos de reperfusión encontrando un aumento en la recuperación contráctil postisquémica.

Además, la cardioprotección encontrada concuerda con los reportes de Skyschally y col. (2011) que demostraron que la infusión de dronedarona 2.5 mg/kg en infusión directa en corazones de cerdo anestesiado otorgaba cardioprotección frente a isquemia por hipoperfusión coronaria de 90 minutos y 120 minutos de reperfusión, reduciendo el tamaño de infarto en un 10%.

Los resultados de esta Tesis avanzan en la determinación del mecanismo cardioprotector, encontrando que la cardioprotección inducida por perfusión de dronedarona involucra la vía del óxido nítrico por activación de la iNOS, y la apertura de los canales mKATP, dado que tanto L-NAME como AG y 5-HD disminuyeron significativamente la recuperación post-isquémica contráctil y energética, impidiendo los efectos benéficos de dronedarona (Fig. 65, 66 y 68). La Fig. 70 resume

esquemáticamente los mecanismos de la perfusión de dronedarona involucrados en corazones de rata EuT.



Figura 70. Mecanismos involucrados en los efectos directos de dronedarona (Drd) perfundida y de amiodarona (Amd) perfundida en corazones eutiroideos (EuT) expuestos a I/R.

Por el contrario, dronedarona no adicionó cardioprotección en corazones HipoT en I/Rs, pero tampoco la perjudicó (Fig. 64). Si bien no hay antecedentes del efecto de dronedarona en individuos hipotiroideos, Pantos y col. (2005) demostraron que la dronedarona (administrada durante 2 semanas a razón de 90 mg/Kg a ratas eutiroideas) disminuyó la contractilidad y la frecuencia cardíaca, aumentó el glucógeno miocárdico, alteró la expresión de isoformas de miosina y actuó como antagonista del receptor TR α 1 aunque no se indica si estas ratas llegaron a desarrollar hipotiroidismo con el tratamiento (Pantos y col., 2005).

Además, nuestros resultados muestran que la inhibición de las NOS con L-NAME no modificó la recuperación de los corazones de ratas Drd-HipoT (Fig. 67). Considerando que los corazones HipoT-C aumentaban su recuperación con L-NAME (Fig. 32), la comparación de estos resultados sugiere que el antiarrítmico Drd estaría atenuando el efecto deletéreo del conjunto de las NOS, quizás balanceando el grado de participación de las diversas isoformas. Por lo tanto, aunque la dronedarona comparte mecanismos antiarrítmicos similares a los de la amiodarona, sus efectos preventivos sobre la disfunción postisquémica son significativamente mayores en corazones eutiroideos y tienen menor impacto perjudicial que los de la perfusión de Amd en los corazones hipotiroideos. Este hallazgo no solo enriquece el conocimiento farmacodinámico de ambos medicamentos, sino que también podría tener implicancias significativas en la práctica clínica, especialmente en la selección y administración intravenosa de estos antiarrítmicos.

Fortalezas de esta Tesis

El uso de corazones aislados perfundidos permite reproducir la condición de obstrucción coronaria y reperfusión, evitando otras metodologías más simples y alejadas del cuadro de isquemia/reperfusión como es el uso de venenos mitocondriales que simulan hipoxia en cardiomiocitos.

La metodología mecánico-calorimétrica permite la continua evaluación de la energética, que puede ser más sensible a la I/R que la contractilidad como única medición.

Limitaciones del estudio

Los mecanismos de acción se evaluaron *in situ* mediante el uso de herramientas farmacológicas selectivas, y el modelo de I/R se realizó en una preparación de corazón aislado ("ex vivo").

CONCLUSIONES

- Esta Tesis empleó un modelo de corazones aislados perfundidos con mediciones de contractilidad y de flujo de calor para estimar las consecuencias de un desafío de Isquemia y Reperfusión. Esto permite un análisis energético de los corazones, que en algunos casos es más sensible que los cambios en contractilidad, para detectar protección o disfunción.
- Se encontró que el hipotiroidismo es cardioprotector contra la I/R, excepto en presencia de adrenalina, y que los tratamientos subagudos por vía oral de carvedilol y de amiodarona resultaron preventivos de la disfunción isquémica. Por otra parte, a diferencia de amiodarona, la administración por vía arterial de dronedarona también fue cardioprotectora en ratas eutiroideas.

A continuación, se describen las conclusiones particulares acerca de los mecanismos subyacentes:

- El hipotiroidismo (HipoT) mejoró la recuperación contráctil post-isquémica en el modelo de I/R moderada (I/Rm, de aturdimiento cardíaco), sin cambios en la economía muscular (P/Ht) y atenuando la contractura diastólica al inicio de R. Este efecto protector se asoció a la activación del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ para la extrusión de Ca²⁺ mitocondrial (mNCX). En consecuencia, el HipoT indujo una mayor carga y liberación de Ca²⁺ sarcorreticular y una mejor recuperación contráctil y energética respecto a los corazones eutiroideos (EuT), preservando la óptima [Ca²⁺]m. Además, a esto último contribuyó la activación de los canales mKATP, que participan sólo en la reducida contractura diastólica durante la I/Rm.
- En el modelo de I/R severa (I/Rs), el HipoT mejoró aún más la recuperación contráctil post-isquémica y de la economía miocárdica (P/Ht) evitando la contractura diastólica en todo el período de I/Rs. En corazones EuT la disfunción de este modelo de I/Rs involucra la activación del mPTP por sobrecarga de ROS y de NO. En cambio, el HipoT previno esa disfunción contráctil y energética por estimular la activación de las proteínas antiapoptóticas PI3K y PKC, de la iNOS

a niveles benéficos, de los canales mKATP y del mNCX, que reducen la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial.

- La cardioprotección del hipotiroidismo se pierde en presencia de las concentraciones fisiológicas de adrenalina, mimetizando la condición clínica. Este efecto perjudicial está asociado a la activación beta-adrenérgica que promueve la carga de Ca²⁺ miocárdica y mitocondrial. Esta disfunción se previno con la administración oral de carvedilol, un beta-bloqueante de tercera generación con propiedades antioxidantes.
- El tratamiento oral subagudo de amiodarona 30 mg/kg/día fue cardioprotector en la I/Rs de ratas eutiroideas, pero no en ratas hipotiroideas. En corazones EuT, la mejor recuperación mecánico-energética promovida por amiodarona oral involucró la activación de las vías de PKC, PI3K, los canales mKATP, activación de iNOS y atrapamiento de radicales hidroxilos. En cambio, la pérdida de cardioprotección de amiodarona en corazones HipoT se debería a la excesiva producción de ROS como superóxido y peróxido de hidrógeno.
- La perfusión de amiodarona 5 µg/ml no fue cardioprotectora en la I/Rs de ratas eutiroideas y redujo la recuperación de corazones de ratas hipotiroideas. Dichos efectos se relacionaron a la producción de ROS en I/R y a baja activación de NOS (excepto en la regulación del tono diastólico), y posiblemente la inhibición de canales de Ca²⁺. Estos efectos directos de Amd perfundida confirman que la cardioprotección de amiodarona oral es activada por su administración repetida (subaguda) y/o su metabolismo.
- La perfusión de dronedarona (Drd) fue cardioprotectora en corazones eutiroideos en I/Rs, mientras que no afectó la cardioprotección del hipotiroidismo.
 El efecto cardioprotector de Drd está relacionado con la activación de los canales mKATP y de la iNOS. En cambio, en corazones de rata HipoT, Drd no activó a las NOS.

Proyección para la traslación a la clínica

Estos resultados preclínicos alientan la necesidad de que se evalúe clínicamente un posible efecto preventivo del tratamiento oral de amiodarona en la insuficiencia coronaria, y su posible pérdida en el hipotiroidismo.

En cambio, los resultados preclínicos no alientan la posibilidad de encontrar efecto protector en isquemia cuando la amiodarona se administre como antiarrítmico vía IV en urgencia, pero dronedarona podría brindar ese efecto agudo, exceptuando en el hipotiroidismo. Debería evaluarse clínicamente esta diferencia entre los dos antiarrítmicos.

BIBLIOGRAFÍA

• Alpert, N. R., Blanchard, E. M., & Mulieri, L. A. (1989). Tension-independent heat in rabbit papillary muscle. The Journal of Physiology, 414(1), 433-453.

Amrani, M., Chester, A. H., Jayakumar, J., Schyns, C. J., & Yacoub, M. H. (1995).
L-arginine reverses low coronary reflow and enhances postischaemic recovery of cardiac mechanical function. Cardiovascular research, 30(2): 200-204.

• Andreadou, I.; Schulz, R.; Papapetropoulos, A.; Turan, B.; Ytrehus, K.; Ferdinandy, P.; Daiber, A.; & Di Lisa, F. (2020) The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H2S in ischaemia/ reperfusion injury and cardioprotection. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24: 6510-6522.

• Athéa, Y., Garnier, A., Fortin, D., Bahi, L., Veksler, V., Ventura-Clapier, R. (2007). Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat. Relevance to heart failure. Pflugers Archives 455: 431–442.

Bačová, B. S., Beňová, T., Viczenczová, C., Soukup, T., Rauchová, H., Pavelka,
S., Knezl V., Barancik M., & Tribulová, N. (2016). Cardiac connexin-43 and PKC signaling in rats with altered thyroid status without and with omega-3 fatty acids intake.
Physiological Research, 65: S77-S90.

• Bagchi, N., Brown, T. R., Schneider, D. S., & Banerjee, S. K. (1987). Effect of amiodarone on rat heart myosin isoenzymes. Circulation research, 60(4): 621-625.

• Baines, C.P. (2003). Protein kinase c epsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. Circulation Research, 92: 873-880.

• Baines, C. P. (2009). The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. Basic Research in Cardiology, 104: 181-188.

• Basaria, S., & Cooper, D. S. (2005). Amiodarone and the thyroid. The American Journal of Medicine, 118(7): 706-714.

Baxter, G. F., Mocanu, M. M., Brar, B. K., Latchman, D. S., & Yellon, D. M. (2001).
Cardioprotective effects of transforming growth factor-β1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 38(6): 930-939.

Becerra, R., Román, B., Di Carlo, M. N., Mariangelo, J. I., Salas, M., Sanchez, G., Donoso P., Schinella G., Vittone L., Wehrens X., Mundiña-Weilenmann C., & Said, M. (2016). Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 311(3): H713-H724.

Belevych, A. E., Sansom, S. E., Terentyeva, R., Ho, H. T., Nishijima, Y., Martin,
M. M., Jindal H.K., Rochira J.J.A., Kunitomo Y., Abdellatif M., Carnes C.A., Elton T.S.,
Györke S., & Terentyev, D. (2011). MicroRNA-1 and-133 increase arrhythmogenesis in
heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. PloS One, 6(12):
e28324.

• Bernardi, P., & Di Lisa, F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 78: 100-106.

• Bers, D. (2001). Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force (Vol. 237). Springer Science & Business Media.

• Bețiu, A.M., Chamkha, I., Gustafsson, E., Meijer, E., Avram, V.F., Åsander Frostner, E., Ehinger, J.K., Petrescu, L., Muntean, D.M., Elmer, E. (2021). Cellpermeable succinate rescues mitochondrial respiration in cellular models of amiodarone toxicity. International Journal of Molecular Sciences 22, 11786.

• Bobadilla, I., Franco, M., Cruz, D., Zamora, J., Robles, S. G., & Chávez, E. (2001). HipoThyroidism provides resistance to reperfusion injury following myocardium ischemia. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 33(5): 499-506.

 Bolli, R., & Marbán, E. (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. Physiological Reviews, 79(2): 609-634.

• Bonazzola, P., & Takara, D. (2010). Cardiac basal metabolism: energetic cost of calcium withdrawal in the adult rat heart. Acta Physiologica, 199(3): 293-304.

• Brahmajothi, M. V., & Campbell, D. L. (1999). Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart:

implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide–related effects. Circulation Research, 85(7): 575-587.

• Brar, B. K., Jonassen, A. K., Stephanou, A., Santilli, G., Railson, J., Knight, R. A., Yellon D.M., & Latchman, D. S. (2000). Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. Journal of Biological Chemistry, 275(12): 8508-8514.

• Bugger, H., & Pfeil, K. (2020). Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1866(7): 165768.

• Burwell, L. S., & Brookes, P. S. (2008). Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia–reperfusion injury. Antioxidants & Redox Signaling, 10(3): 579-600.

• Canton, M., Neverova, I., Menabò, R., Van Eyk, J., & Di Lisa, F. (2004). Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 286(3): H870-H877.

• Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch S., & Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science, 282(5392): 1318-1321.

• Caricati-Neto, A., Errante, P. R., & Menezes-Rodrigues, F. S. (2019). Recent advances in pharmacological and non-pharmacological strategies of cardioprotection. International Journal of Molecular Sciences, 20(16): 4002.

 Carreira, R. S., Facundo, H. T. F., & Kowaltowski, A. J. (2005). Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 345-352.

Chaker, L., Bianco, A. C., Jonklaas, J., & Peeters, R. P. (2017). Hipothyroidism.
The Lancet, 390(10101): 1550–1562.

Chapman, J. B., & Gibbs, C. L. (1972). An energetic model of muscle contraction.
Biophysical Journal, 12(3): 227-236.

 Chatelain, P., Meysmans, L., Matteazzi, J. R., Beaufort, P. H., & Clinet, M. (1995).
Interaction of the antiarrhythmic agents SR 33589 and amiodarone with the βadrenoceptor and adenylate cyclase in rat heart. British Journal of Pharmacology, 116(3): 1949-1956.

• Chen, C., Hu, L. X., Dong, T., Wang, G. Q., Wang, L. H., Zhou, X. P., Jiang Y., Murao K., Lu S., Chen J., & Zhang, G. X. (2013). Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia–reperfusion induced injury in rats. Life Sciences, 93(7): 265-270.

• Chen, X., Gao, C., Gong, N., Wang, Y., & Tian, L. (2018). The change of left ventricular function in rats with subclinical HipoThyroid and the effects of thyroxine replacement. International Journal of Endocrinology, 2018(1): 8682765.

Chen, L., Shi, D., & Guo, M. (2021). The roles of PKC-δ and PKC-ε in myocardial ischemia/reperfusion injury. Pharmacological Research, 170: 105716.

 Ciocci Pardo, A., González Arbeláez, L. F., Fantinelli, J. C., Álvarez, B. V., Mosca, S. M., & Swenson, E. R. (2021). Myocardial and mitochondrial effects of the anhydrase carbonic inhibitor ethoxzolamide in ischemia-reperfusion. Physiological Reports, 9(22): e15093.

Ciocci Pardo, A., Diaz Zegarra, L.A., González Arbeláez, L.F., Ibáñez, A.M.,
Díaz, R.G., Aiello, E.A., & Mosca, S.M. (2022) Cardioprotective effects of N methylacetazolamide mediated by inhibition of L-type Ca²⁺ channel current. Biochimica
et Biophysica Acta (BBA), Gen Subj, 1866(5):130098.

 Cole, W. C., McPherson, C. D., & Sontag, D. (1991). ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. Circulation Research, 69(3): 571-581.

• Consolini, A. E., Márquez, M. T., & Ponce-Hornos, J. E. (1997). Energetics of heart muscle contraction under high K perfusion: verapamil and Ca effects. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 273(5): H2343-H2350.

• Consolini, A. E., Marquez, M. T., & Ponce-Hornos, J. E. (2001). A comparison of no-flow and low-flow ischemia in the rat heart: an energetic study. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 79(7): 551-558.

• Consolini, A. E., Quiroga, P., Yuln, G., & Volonté, M. G. (2004). Participation of Na/Ca-exchanger and sarcoplasmic reticulum in the high [K] o-protection against ischaemia-reperfusion dysfunction in rat hearts. Acta Physiologica Scandinavica, 182(2): 121-132.

Consolini, A. E., Ragone, M. I., Conforti, P., & Volonté, M. G. (2007).
Mitochondrial role in ischemia–reperfusion of rat hearts exposed to high-K+ cardioplegia and clonazepam: energetic and contractile consequences. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 85(5): 483-496.

• Consolini, A. E., Ragone, M. I., & Bonazzola, P. (2011). Mitochondrial and cytosolic calcium in rat hearts under high-K+ cardioplegia and pyruvate: mechanoenergetic performance. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 89(7): 485-496.

• Consolini, A. E., Ragone, M. I., Colareda, G. A., & Bonazzola, P. (2017). Calorimetry of isolated hearts (II) energetic of Ca²⁺ homeostasis in different animal models and during ischemia–reperfusion. Physiological Mini Reviews vol 10 (3): 26-36.

Costa, A. D., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., Downey, J. M., Cohen, M.
V., & Critz, S. D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. Circulation Research, 97(4): 329-336.

• Costa, A. D., Pierre, S. V., Cohen, M. V., Downey, J. M., & Garlid, K. D. (2008). cGMP signalling: 344-352.

Costa, A. D., Quinlan, C. L., Andrukhiv, A., West, I. C., Jaburek, M., & Garlid, K.
D. (2006). The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart

mitochondria. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 290(1): H406-H415.

• Cox, D.A., & Matlib MA (1993). Modulation of intramitochondrial free Ca2+ concentration by antagonists of the Na⁺-Ca²⁺ exchange. Trends in Pharmacological Sciences, 14(11): 408-413.

• Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochemical Journal, 341(2): 233-249.

• Crompton, M., Costi, A., & Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. Biochemical Journal, 245(3): 915-918.

• Csonka, C., Szilvássy, Z., Fülöp, F., Páli, T., Blasig, I. E., Tosaki, A., Schulz R., Ferdinandy, P. (1999). Classic preconditioning decreases the harmful accumulation of nitric oxide during ischemia and reperfusion in rat hearts. Circulation, 100(22): 2260-2266.

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla
T., Mannella C.A., Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. The Journal of Cell Biology, 174(7): 915-921.

• Csordás, G., Thomas, A. P., & Hajnóczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission Wiedemann, D., Schachner, T., Bonaros, N., Dorn, M., Andreas, M., Kocher, A., & Kuznetsov, A. V. (2013). Impact of cold ischemia on mitochondrial function in porcine hearts and blood vessels. International Journal of Molecular Sciences, 14(11): 22042-22051.

• Damy, T., Ratajczak, P., Shah, A. M., Camors, E., Marty, I., Hasenfuss, G., Marotte J.S., Samuel F., Heymes, C. (2004). Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. The Lancet, 363(9418): 1365-1367.

• Das, D. K., Maulik, N., Sato, M., & Ray, P. S. (1999). Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. Molecular and Cellular Biochemistry, 196: 59-67.

• Daut, J., & Elzinga, G. (1988). Heat production of quiescent ventricular trabeculae isolated from guinea-pig heart. The Journal of Physiology, 398(1): 259-275.

• De Afanas' ev, S. A., Lukavskaya, I. A., Kandinskii, M. L., & Medvedev, M. A. (2002). Effect of amiodarone on functional state of sarcoplasmic reticulum in rat myocardium. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 133: 205-207.

 Deschamps, A. M., Murphy, E., & Sun, J. (2010). Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. Trends in Cardiovascular Medicine, 20(3): 73-78.

Deng, C.; Sun, Z.; Tong, G.; Yi, W.; Ma, L.; Zhao B, Cheng L, Zhang J, Cao F, Yi
D. (2013) 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.

• Dhein, S., & Mohr, F. W. (2005). The Langendorff Heart. In: Practical methods in cardiovascular research (p. 1010). M. Delmar (Ed.). Berlin Heidelberg: Springer: 155-173.

• Dhital, R., Basnet, S., & Poudel, D. R. (2017). Impact of HipoThyroidism on occurrence and outcome of acute coronary syndrome from the national inpatient sample. The American Journal of Cardiology, 120(12): 2160-2163.

• Di Matola, T., D'Ascoli, F., Fenzi, G., Rossi, G., Martino, E., Bogazzi, F., & Vitale, M. (2000). Amiodarone induces cytochrome c release and apoptosis through an iodineindependent mechanism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 85(11): 4323-4330.

 Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2012). The atypical PKCs in inflammation: NFκB and beyond. Immunological Reviews, 246(1): 154-167.
Díaz, R.G., Escudero, D.S., Brea, M.S., Morgan, P.E., & Pérez, N.G. (2019) p38
 mitogen activated protein kinase mediates cardiac Na/H exchanger inhibition induced by
 Sildenafil. European Journal of Pharmacology, 849: 96–105.

 Dos Santos, P., Kowaltowski, A. J., Laclau, M. N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo J.B., Tariosse L., Garlid, K. D. (2002). Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 283(1): H284-H295.

• Eskes, S.A., Wiersinga, W.M. (2009). Amiodarone and thyroid. Best Practice Research in Clinical Endocrinology Metabolism 23: 735-751.

• Ferdinandy, P., Schulz, R., & Baxter, G. F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. Pharmacological Reviews, 59(4): 418-458.

• Feron, O., Dessy, C., Opel, D. J., Arstall, M. A., Kelly, R. A., & Michel, T. (1998). Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes: implications for the autonomic regulation of heart rate. Journal of Biological Chemistry, 273(46): 30249-30254.

• Forbes, R. A., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2001). Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. Circulation Research, 88(8): 802-809.

• Förstermann, U., & Li, H. (2011). Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. British Journal of Pharmacology, 164(2): 213-223.

Franklyn, J. A., Green, N. K., Gammage, M. D., Ahlquist, J. A. O., & Sheppard,
 M. C. (1989). Regulation of α-and β-myosin heavy chain messenger RNAs in the rat
 myocardium by amiodarone and by thyroid status. Clinical Science, 76(5): 463-467.

Gao, X., Liu, M., Qu, A., Chen, Z., Jia, Y., Yang, N., Feng X., Liu J., Xu Y., Yang
 X., Wang, G. (2016). Native magnetic resonance T1-mapping identifies diffuse
 myocardial injury in HipoThyroidism. PLoS One, 11(3): e0151266.

• Garlid, K. D. (2000). Opening mitochondrial K ATP in the heart–what happens, and what does not happen. Basic Research in Cardiology, 95: 275-279.

• Garlid, K. D., & Paucek, P. (2003). Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1606(1-3): 23-41.

• Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H.N., Darbenzio, R.B., D'Alonzo, A.J., Lodge, N.J., Smith, M.A., & Grover, G.J. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. Circulation Research, 81(6):1072-1082.

• Ghaffari, S., Kazemi, B., Toluey, M., & Sepehrvand, N. (2013). The effect of prethrombolytic cyclosporine-A injection on clinical outcome of acute anterior ST-elevation myocardial infarction. Cardiovascular Therapeutics, 31(4): e34-e39.

• Gibbs, C. L. (1967). Role of catecholamines in heat production in the myocardium. Circulation Research, 21(Suppl III): 223-230.

• Gibbs, C. L., Mommaerts, W. F. H. M., & Ricchiuti, N. V. (1967). Energetics of cardiac contractions. The Journal of Physiology, 191(1): 25-46.

• Gibbs, C. L., & Chapman, J. B. (1979). Cardiac heat production. Annual Review of Physiology, 41: 507-519.

• Gibbs, C. L., Loiselle, D. S., & Wendt, I. R. (1988). Activation heat in rabbit cardiac muscle. The Journal of Physiology, 395(1): 115-130.

• Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. The Journal Biological Chemistry: 375-388.

• Gill, J., Heel, R. C., & Fitton, A. (1992). Amiodarone: an overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutic use in cardiac arrhythmias. Drugs, 43: 69-110.

• Gluvic, Z. M., Obradovic, M. M., Sudar-Milovanovic, E. M., Zafirovic, S. S., Radak, D. J., Essack, M. M., Bajic V.B., Gojobori T., Isenovic, E. R. (2020). Regulation of nitric oxide production in HipoThyroidism. Biomedicine & Pharmacotherapy, 124: 109881.

 Graier, W. F., Frieden, M., & Malli, R. (2007). Mitochondria and Ca²⁺ signaling:
 old guests, new functions. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 455: 375-396.

• Griffiths, E.J. & Halestrap, A.P. (1993). Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 25(12): 1461-1469.

• Grover, G. J. (1997). Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (KATP) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 75(4): 309-315.

• Gunter T.E., Yule D.I., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.E. (2004) Calcium and mitochondria. FEBS Letters, 567(1): 96-102.

• Ha, H. R., Stieger, B., Grassi, G., Altorfer, H. R., & Follath, F. (2000). Structure– effect relationships of amiodarone analogues on the inhibition of thyroxine deiodination. European Journal of Clinical Pharmacology, 55: 807-814.

• Halestrap, A. P., & Davidson, A. M. (1990). Inhibition of Ca2+-induced largeamplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. Biochemical Journal, 268(1): 153-160.

• Halestrap, A. P. (2009). Mitochondria and reperfusion injury of the heart—a holey death but not beyond salvation. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 41: 113-121.

• Halestrap, A. P., Clarke, S. J., & Javadov, S. A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. Cardiovascular Research, 61(3): 372-385.

• Halestrap, A. P., Clarke, S. J., & Khaliulin, I. (2007). The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1767(8): 1007-1031.

Han, J. C., Taberner, A. J., Kirton, R. S., Nielsen, P. M., Smith, N. P., & Loiselle,
 D. S. (2009). A unique micromechanocalorimeter for simultaneous measurement of heat rate and force production of cardiac trabeculae carneae. Journal of Applied Physiology, 107(3): 946-951.

• Harb, I. A., Ashour, H., Mostafa, A., El Hanbuli, H. M., & Nadwa, E. H. (2022). Cardioprotective effects of amiodarone in a rat model of epilepsy-induced cardiac dysfunction. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 49(3): 406-418.

• Hauser, T. H., Pinto, D. S., Josephson, M. E., & Zimetbaum, P. (2004). Early recurrence of arrhythmia in patients taking amiodarone or class 1C agents for treatment of atrial fibrillation or atrial flutter. The American Journal of Cardiology, 93(9), 1173-1176.

• He, L. M., Zhang, A., & Xiong, B. (2022). Effectiveness of amiodarone in preventing the occurrence of reperfusion ventricular fibrillation after the release of aortic cross-clamp in open-heart surgery patients: A meta-analysis. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 9: 821938.

• Hidalgo, C., Donoso, P., & Carrasco, M. A. (2005). The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? IUBMB Life Journal, 57(4-5): 315-322.

• Hill, A. V. (1966). Trails and Trials in Physiology: a Bibliography, 1909-1964; with reviews of certain topics and methods and a reconnaissance for further research. (No Title).

• Hohnloser, S. H. (2004, August). EURIDIS and ADONIS: maintenance of sinus rhythm with dronedarone in patients with atrial fibrillation or flutter. In Hot Line II: Acute

coronary syndromes/medical treatment II. Program and abstracts from the European Society of Cardiology Congress, (Vol. 28).

• Hool, L. C., & Corry, B. (2007). Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants and Redox Signaling, 9(4): 409-435.

• Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., & Takeshita, A. (1999). Amiodarone protects cardiac myocytes against oxidative injury by its free radical scavenging action. Circulation, 100(7): 690-692.

• Ishida, H., Hirota, Y., Genka, C., Nakazawa, H., Nakaya, H., & Sato, T. (2001). Opening of mitochondrial KATP channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. Circulation Research, 89(10): 856-858.

• Jabbar, A., Ingoe, L., Pearce, S., Zaman, A., & Razvi, S. (2015). Thyroxine in acute myocardial infarction (ThyrAMI)-levothyroxine in subclinical hypothyroidism post-acute myocardial infarction: study protocol for a randomised controlled trial. Trials, 16: 1-13.

• Jeddi, S., Zaman, J., Zadeh-Vakili, A., Zarkesh, M., & Ghasemi, A. (2016). Involvement of inducible nitric oxide synthase in the loss of cardioprotection by ischemic postconditioning in HipoThyroid rats. Gene, 580(2): 169-176.

• Jeddi, S., Ghasemi, A., Asgari, A., & Nezami-Asl, A. (2018). Role of inducible nitric oxide synthase in myocardial ischemia-reperfusion injury in sleep-deprived rats. Sleep and Breathing, 22: 353-359.

• Jiang, L. Q., Chen, S. J., Xu, J. J., Ran, Z., Ying, W., & Zhao, S. G. (2016). Dronedarone and amiodarone induce dyslipidemia and thyroid dysfunction in rats. Cellular Physiology and Biochemistry, 38(6): 2311-2322.

• Jonassen, A. K., Sack, M. N., Mjøs, O. D., & Yellon, D. M. (2001). Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. Circulation Research, 89(12), 1191-1198.

• Kalderon, B., Hermesh, O., & Bar-Tana, J. (1995). Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment. Endocrinology, 136(8): 3552-3556.

• Karkhanis, A., Leow, J. W. H., Hagen, T., & Chan, E. C. Y. (2018). Dronedaroneinduced cardiac mitochondrial dysfunction and its mitigation by epoxyeicosatrienoic acids. Toxicological Sciences, 163(1): 79-91.

• Kathofer, S., Thomas, D., & Karle, C. A. (2005). The novel antiarrhythmic drug dronedarone: comparison with amiodarone. Cardiovascular Drug Reviews, 23(3), 217-230.

• Kawabata, M., Hirao, K., Hachiya, H., Higuchi, K., Tanaka, Y., Yagishita, A., Inaba O., & Isobe, M. (2011). Role of oral amiodarone in patients with atrial fibrillation and congestive heart failure. Journal of Cardiology, 58(2): 108-115.

Kawakami, M., & Okabe, E. (1998). Superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel.
 Molecular Pharmacology, 53(3): 497-503.

 Kawamura, S., Yoshida, K. I., Miura, T., Mizukami, Y., & Matsuzaki, M. (1998).
 Ischemic preconditioning translocates PKC-δ and-ε, which mediate functional protection in isolated rat heart. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 275(6): H2266-H2271.

• Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1411(2-3), 273-289.

• Khadour, F. H., Panas, D., Ferdinandy, P., Schulze, C., Csont, T., Lalu, M. M., Wildhirt S.M.,& Schulz, R. (2002). Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 283(3): H1108-H1115.

• Klein, I., & Danzi, S. (2007). Thyroid disease and the heart. Circulation, 116(15), 1725-1735.

• Kloner, R. A., & Jennings, R. B. (2001). Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. Circulation, 104(24): 2981-2989.

• Kodama, I., Kamiya, K., & Toyama, J. (1997). Cellular electropharmacology of amiodarone. Cardiovascular Research, 35(1): 13-29.

• Kolettis, T. M., Agelaki, M. G., Baltogiannis, G. G., Vlahos, A. P., Mourouzis, I., Fotopoulos, A., & Pantos, C. (2007). Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. Europace, 9(11): 1099-1104.

 Kondratieva, D. S., Afanasiev, S. A., & Popov, S. V. (2018). Influence of Amiodarone and Dronedarone on the Force-Interval Dependence of Rat Myocardium.
 BioMed Research International, 2018(1): 4737489.

• Koo, E. H., Park, Y. C., Lim, S. H., & Kim, H. Z. (2006). Amiodarone offsets the cardioprotective effects of ischaemic preconditioning against ischaemia/reperfusion injury. Journal of International Medical Research, 34(2): 140-151.

Kuznetsov, A. V., Smigelskaite, J., Doblander, C., Janakiraman, M., Hermann,
 M., Wurm, M., Scheidl S.F., Sucher R., Deutschmann A., Troppmair, J. (2008). Survival signaling by C-RAF: mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ are critical targets.
 Molecular and Cellular Biology, 28(7): 2304-2313.

• Lalevée, N., Barrère-lemaire, S., Gautier, P., Nargeot, J., & Richard, S. (2003). Effects of amiodarone and dronedarone on voltage-dependent sodium current in human cardiomyocytes. Journal of Cardiovascular Electrophysiology, 14(8): 885-890.

• Lecour, S., Andreadou, I., Bøtker, H. E., Davidson, S. M., Heusch, G., Ruiz-Meana, M., Schulz R., Zuurbier C.J., Ferdinandy P., & Hausenloy, D. J. (2021). Improving preclinical assessment of cardioprotective therapies (IMPACT) criteria: guidelines of the eu-cardioprotection cost action. Basic Research in Cardiology, 116(1): 52.

Lee, H. C., Mohabir, R., Smith, N., Franz, M. R., & Clusin, W. T. (1988). Effect of ischemia on calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts containing indo
1. Correlation with monophasic action potentials and contraction. Circulation, 78(4), 1047-1059.

• Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2017). Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies. Annual review of pharmacology and toxicology, 57: 535-565.

• Lima, B., Forrester, M. T., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2010). S-nitrosylation in cardiovascular signaling. Circulation Research, 106(4): 633-646.

• Liu, T., & O'Rourke, B. (2008). Enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. Circulation Research, 103(3): 279-288.

• Loiselle, D. S. (1987). Cardiac basal and activation metabolism. In Cardiac Energetics: Basic Mechanisms and Clinical Implications. Heidelberg: Steinkopff: 37-50.

• Loiselle, D. S., & Gibbs, C. L. (1979). Species differences in cardiac energetics. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 237(1): H90-H98.

• Ludwig, L. M., Weihrauch, D., Kersten, J. R., Pagel, P. S., & Warltier, D. C. (2004). Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. Anesthesiology, 100(3): 532-539.

 Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B., & Wymann, M. P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase—moving towards therapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1784(1): 159-185.

• Márquez, M. T., Consolini, A., Bonazzola, P., & Ponce-Hornos, J. E. (1997). The energetics of the quiescent heart muscle: high potassium cardioplegic solution and the influence of calcium and hypoxia on the rat heart. Acta Physiologica Scandinavica, 160(3): 229-233.

• Martin, W.J., & Howard, D.M. (1985) Amiodarone-induced lung toxicity. In vitro evidence for the direct toxicity of the drug. The American Journal of Pathology, 120: 344-350.

• McDonald Jr, R. H. (1971). Myocardial heat production: its relationship to tension development. American Journal of Physiology-Legacy Content, 220(4): 894-900.

• Melmed, S., Nademanee, K., Reed, A. W., Hendrickson, J. A., Singh, B. N., & Hershman, J. M. (1981). Hyperthyroxinemia with bradycardia and normal thyrotropin secretion after chronic amiodarone administration. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 53(5): 997-1001.

Mercanoğlu, G., Safran, N., Ahishali, B., Uzun, H., Yalçın, A., & Mercanoğlu, F. (2015). Nitric oxide mediated effects of nebivolol in myocardial infarction: the source of nitric oxide. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 19(24): 4872-4889.

• Misra, M. K., Sarwat, M., Bhakuni, P., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. Medical Science Monitor, 15(10): 209-219.

Montalvo, D., Pérez-Treviño, P., Madrazo-Aguirre, K., González-Mondellini, F.
 A., Miranda-Roblero, H. O., Ramonfaur-Gracia, D., Jacobo-Antonio M., Mayorga-Luna
 M., Gómez-Víquez N.L., García N.,& Altamirano, J. (2018). Underlying mechanism of
 the contractile dysfunction in atrophied ventricular myocytes from a murine model of
 HipoThyroidism. Cell Calcium, 72: 26-38.

• Moreau, D., Clauw, F., Martine, L., Grynberg, A., Rochette, L., & Demaison, L. (1999). Effects of amiodarone on cardiac function and mitochondrial oxidative phosphorylation during ischemia and reperfusion. Molecular and cellular Biochemistry, 194: 291-300.

• Moris, D., Spartalis, M., Tzatzaki, E., Spartalis, E., Karachaliou, G. S., Triantafyllis, A. S., Karaolanis G.I., Tsilimigras D.I.,& Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. Annals of Translational Medicine, 5(16): 324.

• Mourouzis, I., Dimopoulos, A., Saranteas, T., Tsinarakis, N., Livadarou, E., Spanou, D., Kokkinos A.D., Xinaris C., Pantos C., & Cokkinos, D. V. (2009). Ischemic preconditioning fails to confer additional protection against ischemia-reperfusion injury in the HipoThyroid rat heart. Physiological Research, 58(1): 29-38.

 Mujović, N., Dobrev, D., Marinković, M., Russo, V., & Potpara, T. S. (2020). The role of amiodarone in contemporary management of complex cardiac arrhythmias. Pharmacological Research, 151: 104521.

Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B., & Marbán, E. (2001). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. Circulation Research, 89(10): 891-898.

Murriel, C. L., Churchill, E., Inagaki, K., Szweda, L. I., & Mochly-Rosen, D. (2004).
 Protein kinase Cδ activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 279(46): 47985-47991.

• Neill, W.A., Levine, H.J., Wagman, R.J., Messer, J.V., Krasnow, N., & Gorlin, R. (1961). Left ventricular heat production measured by coronary flow and temperature gradient. Journal of Applied Physiology, 16(5): 883-890.

• Newton, A.C., Antal, C.E., & Steinberg, S.F. (2016). Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling. Clinical Science, 130(17): 1499-1510.

Niggli, E., Ullrich, N. D., Gutierrez, D., Kyrychenko, S., Poláková, E., & Shirokova,
 N. (2013). Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca²⁺ signaling
 and EC-coupling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research,
 1833(4): 866-875.

• Nyirenda, M. J., Clark, D. N., Finlayson, A. R., Read, J., Elders, A., Bain, M., Fox K.A.A., Toft, A. D. (2005). Thyroid disease and increased cardiovascular risk. Thyroid, 15(7): 718-724.

• Oliveira, P.J. (2005). Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria? Current Vascular Pharmacology, 3: 147-158.

• Ogita, H., Node, K., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Takashima, S., Minamino T., Hori M., & Kitakaze, M. (2004). Raloxifene improves coronary perfusion, cardiac contractility, and myocardial metabolism in the ischemic heart: role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 43(6): 821-829.

• Oudit, G. Y., & Penninger, J. M. (2009). Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. Cardiovascular Research, 82(2): 250-260.

• Pan, T. T., Neo, K. L., Hu, L. F., Yong, Q. C., & Bian, J. S. (2008). H2S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 294(1): C169-C177.

Pantos, C., Mourouzis, I., Delbruyère, M., Malliopoulou, V., Tzeis, S., Cokkinos, D. D., Nikos Nikitas, N., Carageorgiou H., Varonos D., Cokkinos D., & Nisato, D. (2002).
 Effects of dronedarone and amiodarone on plasma thyroid hormones and on the basal and postischemic performance of the isolated rat heart. European Journal of Pharmacology, 444(3): 191-196.

Pantos, C., Malliopoulou, V., Mourouzis, I., Sfakianoudis, K., Tzeis, S., Doumba,
 P., Xinaris C., Cokkinos A.D, Carageorgiou H., Varonos D.D., & Cokkinos, D. V. (2003).
 Propylthiouracil-induced hypothyroidism is associated with increased tolerance of the isolated rat heart to ischaemia-reperfusion. Journal of Endocrinology, 178(3): 427-436.

Pantos, C., Mourouzis, I., Malliopoulou, V., Paizis, I., Tzeis, S., Moraitis, P., Sfakianoudis K., Varonos D.D., & Cokkinos, D. V. (2005). Dronedarone administration prevents body weight gain and increases tolerance of the heart to ischemic stress: a possible involvement of thyroid hormone receptor α1. Thyroid, 15(1): 16-23.

Pantos, C., Mourouzis, I., Saranteas, T., Paizis, I., Xinaris, C., Malliopoulou, V.,
 & Cokkinos, D. V. (2005). Thyroid hormone receptors α1 and β1 are downregulated in

the post-infarcted rat heart: consequences on the response to ischaemiareperfusion. Basic Research in Cardiology, 100: 422-432.

• Pape, J., Kerp, H., Lieder, H. R., Geist, D., Hönes, G. S., Moeller, L. C., Kleinbongard P., & Führer, D. (2022). Cardioprotection by HipoThyroidism is not mediated by favorable hemodynamics—role of canonical thyroid hormone receptor alpha signaling. International Journal of Molecular Sciences, 23(21): 13340.

Pardo, A. C., Zegarra, L. A. D., Arbeláez, L. F. G., Ibáñez, A. M., Díaz, R. G.,
 Aiello, E. A., & Mosca, S. M. (2022). Cardioprotective effects of N-methylacetazolamide
 mediated by inhibition of L-type Ca²⁺ channel current. Biochimica et Biophysica Acta
 (BBA)-General Subjects, 1866(5): 130098.

Pardo, A. C., Scuri, S., Arbeláez, L. F. G., Caldiz, C., Fantinelli, J., & Mosca, S.
 M. (2018). Survival kinase-dependent pathways contribute to gender difference in the response to myocardial ischemia–reperfusion and ischemic post-conditioning.
 Cardiovascular Pathology, 33: 19-26.

 Paucek, P., Mironova, G., Mahdi, F., Beavis, A. D., Woldegiorgis, G., & Garlid, K.
 D. (1992). Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATPdependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 267(36): 26062-26069.

• Penna, C., Rastaldo, R., Mancardi, D., Raimondo, S., Cappello, S., Gattullo, D., Losano G., & Pagliaro, P. (2006). Post–conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox–sensitive mechanism, mitochondrial ATP–sensitive K+ channel and protein kinase C activation. Basic Research in Cardiology, 101: 180-189.

Ping, P., Takano, H., Zhang, J., Tang, X. L., Qiu, Y., Li, R. C., Banerjee, S., Dawn,
 B., Balafonova, Z., & Bolli, R. (1999). Isoform-selective activation of protein kinase C by
 nitric oxide in the heart of conscious rabbits: A signaling mechanism for both nitric oxide induced and ischemia-induced preconditioning. Circulation Research, 84(5), 587–604.

• Piper, H. M., García-Dorado, D., & Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. Cardiovascular Research, 38(2): 291-300.

• Piper, H.M., Abdallah, Y., Kasseckert, S., & Schlüter, K.D. (2008) Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. Cardiovasc Research. 77(2): 234-236.

• Ponce-Hornos, J. E., Ricchiuti, N. V., & Langer, G. A. (1982). On-line calorimetry in the arterially perfused rabbit interventricular septum. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 243(2): H289-H295.

• Ponce-Hornos, J. E., Bonazzola, P., & Taquini, A. C. (1987). The role of extracellular sodium on heart muscle energetics. Pflügers Archiv, 409(1), 163-168.

Ponce-Hornos, J. E., Bonazzola, P., Marengo, F. D., Consolini, A. E., & Márquez,
 M. T. (1995). Tension-dependent and tension-independent energy components of heart contraction. Pfluegers Archiv, 429: 841-851.

Potz, B.A.; Scrimgeour, L.A.; Sabe, S.A.; Clements, R.T.; Sodha, N.R.; & Sellke,
 F.W. (2018) Glycogen synthase kinase 3β inhibition reduces mitochondrial oxidative stress in chronic myocardial ischemia. J. Thoracic. Cardiovasc. Surgery 155(6): 2492-2503.

• Ragone, M. I., & Consolini, A. E. (2009). Cardiac role of the mitochondrial Ca2+ transporters in the high-[K+] o cardioprotection of rat hearts under ischemia and reperfusion: a mechano-energetic study. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 54(3): 213-222.

• Ragone, M. I., Torres, N. S., & Consolini, A. E. (2013). Energetic study of cardioplegic hearts under ischaemia/reperfusion and [C a2+] changes in cardiomyocytes of guinea-pig: mitochondrial role. Acta Physiologica, 207(2): 369-384.

• Ragone, M. I., Bonazzola, P., Colareda, G. A., & Consolini, A. E. (2015). Cardioprotective effect of hyperthyroidism on the stunned rat heart during ischaemia– reperfusion: energetics and role of mitochondria. Experimental Physiology, 100(6): 680-697.

• Ragone, M. I., Bayley, M., Colareda, G. A., Bonazzola, P., & Consolini, A. E. (2020). Cardioprotective mechanisms of HipoThyroidism on ischemia/reperfusion in rats

and effects of carvedilol: energetic study. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 25(1): 72-85.

• Rao, R. H., McCready, V. R., & Spathis, G. S. (1986). Iodine kinetic studies during amiodarone treatment. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 62(3): 563-568.

• Razavi, H. M., Hamilton, J. A., & Feng, Q. (2005). Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. Pharmacology & Therapeutics, 106(2): 147-162.

• Rochetaing, A., Barbé, C., & Kreher, P. (2001). Beneficial effects of amiodarone and dronedarone (SR 33589b), when applied during low-flow ischemia, on arrhythmia and functional parameters assessed during reperfusion in isolated rat hearts. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 38(4): 500-511.

• Romão, J.S., Neto, J.G.O., Andrade, C.B.V., Carvalho, J.J., Pazos-Moura, C.C., Oliveira, K. J. (2024). Hypothyroidism modulates mitochondrial dynamics and mitophagy in the heart of rats under fed and fasting conditions. Life Sciences 359: 123254.

Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J., Boeckeler, K., & Parker,
 P. J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. Nature Reviews
 Molecular Cell Biology, 11(2): 103-112.

• Rossello, X., Riquelme, J. A., Davidson, S. M., & Yellon, D. M. (2018). Role of PI3K in myocardial ischaemic preconditioning: mapping pro-survival cascades at the trigger phase and at reperfusion. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 22(2): 926-935.

• Rowe, G. T., Manson, N. H., Caplan, M., & Hess, M. L. (1983). Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway. Circulation Research, 53(5): 584-591.

 Sato, T., O'Rourke, B., & Marbán, E. (1998). Modulation of mitochondrial ATPdependent K⁺ channels by protein kinase C. Circulation Research, 83(1): 110-114.

Schäfer, C., Ladilov, Y., Inserte, J., Schäfer, M., Haffner, S., Garcia-Dorado, D.,
 Piper, H. M. (2001). Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. Cardiovascular Research, 51(2), 241-250.

• Schulz, R., Kelm, M., & Heusch, G. (2004). Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. Cardiovascular Research, 61(3): 402-413.

Seara, F. A., Maciel, L., Barbosa, R. A., Rodrigues, N. C., Silveira, A. L., Marassi,
 M. P., Carvalho A.B., Nascimento J.H.M., & Olivares, E. L. (2018). Cardiac ischemia/reperfusion injury is inversely affected by thyroid hormones excess or deficiency in male Wistar rats. PLoS One, 13(1): e0190355.

Sears, C. E., Bryant, S. M., Ashley, E. A., Lygate, C. A., Rakovic, S., Wallis, H.
 L., Neubauer S., Terrar D.A., & Casadei, B. (2003). Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. Circulation Research, 92(5): e52-e59.

• Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., Cantley L.C., & Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. Molecular and Cellular Biology, 22(8): 2799-2809.

• Shao, Q., Fallica, J., Casin, K. M., Murphy, E., Steenbergen, C., & Kohr, M. J. (2016). Characterization of the sex-dependent myocardial S-nitrosothiol proteome. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 310(4): H505-H515.

• Singh, B. N., & Williams, E. V. (1970). A third class of anti-arrhythmic action: effects on atrial and ventricular intracellular potentials, and other pharmacological actions on cardiac muscle, of MJ 1999 and AH 3474. British Journal of Pharmacology, 39(4): 675.

• Singh, B. N., & Williams, E. V. (1970). The effect of amiodarone, a new antianginal drug, on cardiac muscle. British journal of pharmacology, 39(4): 657.

• Skyschally, A., & Heusch, G. (2011). Reduction of myocardial infarct size by dronedarone in pigs—a pleiotropic action? Cardiovascular Drugs and Therapy, 25: 197-201.

• Slodzinski, M. K., Aon, M. A., & O'Rourke, B. (2008). Glutathione oxidation as a trigger of mitochondrial depolarization and oscillation in intact hearts. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 45(5): 650-660.

• Slodzinski, M. K., Aon, M. A., & O'Rourke, B. (2008). Glutathione oxidation as a trigger of mitochondrial depolarization and oscillation in intact hearts. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 45(5): 650-660.

• Stamm, C., & Del Nido, P. J. (2004). Protein kinase C and myocardial calcium handling during ischemia and reperfusion: lessons learned using Rhod-2 spectrofluorometry. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 52(03): 127-134.

• Taberner, A. J., Hunter, I. W., Kirton, R. S., Nielsen, P. M. F., & Loiselle, D. S. (2005). Characterization of a flow-through microcalorimeter for measuring the heat production of cardiac trabeculae. Review of Scientific Instruments, 76(10): 104902.

• Tang, L., Wang, H., & Ziolo, M. T. (2014). Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. Pharmacology & Therapeutics, 142(3),:306-315.

• Tiller, D., Ittermann, T., Greiser, K. H., Meisinger, C., Agger, C., Hofman, A., Thuesen B., Linneberg A., Peeters R., Franco O., Heier M., Kluttig A., Werdan K., Stricker B., Schipf S., Markus M., Dörr M., Völzke H., & Haerting, J. (2016). Association of serum thyrotropin with anthropometric markers of obesity in the general population. Thyroid, 26(9): 1205-1214.

• Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2000). Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. Circulation Research, 87(4): 309-315.

Touboul, P., Brugada, J., Capucci, A., Crijns, H. J., Edvardsson, N., & Hohnloser,
 S. H. (2003). Dronedarone for prevention of atrial fibrillation: a dose-ranging study.
 European Heart Journal, 24(16): 1481-1487.

• Tsibulnikov, S. Y., Maslov, L. N., Naryzhnaya, N. V., Ma, H., Lishmanov, Y. B., Oeltgen, P. R., & Garlid, K. (2018). Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, KATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the

cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia. General Physiology and Biophysics, 37(5): 537-547.

• Turrell, H. E., Rodrigo, G. C., Norman, R. I., Dickens, M., & Standen, N. B. (2011). Phenylephrine preconditioning involves modulation of cardiac sarcolemmal KATP current by PKC delta, AMPK and p38 MAPK. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 51(3): 370-380.

• Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of Physiology, 552(2): 335-344.

• Udovcic, M., Pena, R. H., Patham, B., Tabatabai, L., & Kansara, A. (2017). Hypothyroidism and the heart. Methodist DeBakey Cardiovascular Journal, 13(2), 55.

Valdez, L. B., Bombicino, S. S., Iglesias, D. E., Rukavina Mikusic, I. A., & Boveris,
 A. A. (2018). Mitochondrial peroxynitrite generation is mainly driven by superoxide steady-state concentration rather than by nitric oxide steady-state concentration.
 International Journal of Molecular Biology, 3(2): 58–63.

• Varadarajan, S. G., An, J., Novalija, E., Smart, S. C., & Stowe, D. F. (2001). Changes in [Na+] i, compartmental [Ca²⁺], and NADH with dysfunction after global ischemia in intact hearts. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 280(1): H280-H293.

• Varbiro, G., Toth, A., Tapodi, A., Bognar, Z., Veres, B., Sumegi, B., & Gallyas, F. (2003a). Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 307(2): 615-625.

• Varbiro, G., Toth, A., Tapodi, A., Veres, B., Sumegi, B., & Gallyas Jr, F. (2003b). Concentration dependent mitochondrial effect of amiodarone. Biochemical Pharmacology, 65(7): 1115-1128.

Varró, A., Takács, J., Németh, M., Hála, O., Virág, L., Iost, N., Baláti B., Ágoston
 M., Vereckei A., Pastor G., Delbruyère M., Gautier P., Nisato D., Gy J., & Papp, J. G.
 (2001). Electrophysiological effects of dronedarone (SR 33589), a noniodinated

amiodarone derivative in the canine heart: comparison with amiodarone. British Journal of Pharmacology, 133(5): 625-634.

• Venditti, P., Puca, A., & Di Meo, S. (2003). Effect of thyroid state on rate and sites of H2O2 production in rat skeletal muscle mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics, 411(1): 121-128.

• Venditti, P., De Rosa, R., & Di Meo, S. (2003). Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. Free Radical Biology and Medicine, 35(5): 485-494.

• Venditti, P., De Rosa, R., Cigliano, L., Agnisola, C., & Di Meo, S. (2004). Role of nitric oxide in the functional response to ischemia-reperfusion of heart mitochondria from hyperthyroid rats. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61: 2244-2252.

Venditti, P., Napolitano, G., Fasciolo, G., Di Meo, S. (2019). Thyroid state affects
 H2O2 removal by rat heart mitochondria. Archives of Biochemistry & Biophysics, 662:
 61-67.

• Vincent, A., Sportouch, C., Covinhes, A., Barrère, C., Gallot, L., Delgado-Betancourt, V., Lattuca B., Solecki K., Boisguérin P., Piot C., Nargeot J., & Barrère-Lemaire, S. (2017). Cardiac mGluR1 metabotropic receptors in cardioprotection. Cardiovascular Research, 113(6): 644-655.

• Wang, P., & Zweier, J. L. (1996). Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart: evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. Journal of Biological Chemistry, 271(46): 29223-29230.

Wang, Y., Hirai, K., & Ashraf, M. (1999). Activation of mitochondrial ATP-sensitive
 K+ channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase
 C activity. Circulation Research, 85(8): 731-741.

• Wang, C., Hu, S. M., Xie, H., Qiao, S. G., Liu, H., & Liu, C. F. (2015). Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel-mediated PKC-ε in delayed protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of sevoflurane-preconditioned rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 48: 528-536.

• Watanabe, Y., & Kimura, J. (2008). Acute inhibitory effect of dronedarone, a noniodinated benzofuran analogue of amiodarone, on Na+/Ca 2+ exchange current in guinea pig cardiac ventricular myocytes. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 377: 371-376.

Webster, K. A. (2009). Mitochondrial death channels. American Scientist, 97(5):
384.

• Wiersinga WM. (2009). Pharmacological effects of amiodarone and dronedarone on cardiac thyroid hormone receptors. In Iervasi G & Pingitore A (eds.). Thyroid and heart failure. Italia: Springer-Verlag, pp. 89–95.

• Xing, Y., Chen, J., Wang, J., Gao, Y., Niu, W., Zhao, M., Zhu H., Guo L., Lu P., & Wang, S. (2012). The effects of allitridi and amiodarone on the conduction system and reverse use-dependence in the isolated hearts of rats with myocardial infarction. Journal of Ethnopharmacology, 141(2): 674-684.

• Xu, K. Y., Huso, D. L., Dawson, T. M., Bredt, D. S., & Becker, L. C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(2), 657-662.Xu, K. Y., Zweier, J. L., & Becker, L. C. (1997). Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. Circulation Research, 80(1): 76-81.

• Xu, M. J., Cai, Y., Qu, A., Shyy, J. Y. J., Li, W., & Wang, X. (2017). Immediate early response gene X-1 (IEX-1) mediates ischemic preconditioning-induced cardioprotection in rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017(1): 6109061.

Xuan, Y. T., Guo, Y., Zhu, Y., Wang, O. L., Rokosh, G., & Bolli, R. (2007).
 Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase Cε–p44/42 mitogen-activated protein Kinase–pSer-signal transducers and activators of Transcription1/3 pathway. Circulation, 116(5): 535-544.

• Yehuda-Shnaidman, E., Kalderon, B., & Bar-Tana, J. (2005). Modulation of mitochondrial transition pore components by thyroid hormone. Endocrinology: 146(5), 2462-2472.

• Yellon, D. M., & Downey, J. M. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiological Reviews, 83(4): 1113-1151.

• Yiu, K. H., Jim, M. H., Siu, C. W., Lee, C. H., Yuen, M., Mok, M., Shea, Y.F., Fan, K., Tse, H. F., Chow, W. H., (2009). Amiodarone-induced thyrotoxicosis is a predictor of adverse cardiovascular outcome. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 94: 109–114.

• Yong, Q. C., Lee, S. W., Foo, C. S., Neo, K. L., Chen, X., & Bian, J. S. (2008). Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 295(3): H1330-H1340.

• Yousefzadeh, N., Jeddi, S., & Ghasemi, A. (2021). Impaired cardiovascular function in male rats with hypo- and hyperthyroidism: Involvement of imbalanced nitric oxide synthase levels. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets, 21(3): 526–533.

• Yu, X., Ge, L., Niu, L., Lian, X., Ma, H., & Pang, L. (2018). The dual role of inducible nitric oxide synthase in myocardial ischemia/reperfusion injury: friend or foe?. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018(1): 8364848.

• Yuan, Z., Shioji, K., Kihara, Y., Takenaka, H., Onozawa, Y., & Kishimoto, C. (2004). Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: antiinflammatory effects associated with antioxidant property. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 286(1): H83-H90.

• Zhang, L., Parratt, J. R., Beastall, G. H., Pyne, N. J., & Furman, B. L. (2002). Streptozotocin diabetes protects against arrhythmias in rat isolated hearts: role of HipoThyroidism. European Journal of Pharmacology, 435(2-3): 269-276.

• Zhou, H., & Toan, S. (2020). Pathological roles of mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dynamics in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury. Biomolecules, 10(1): 85.

• Zhu, H. F., Dong, J. W., Zhu, W. Z., Ding, H. L., & Zhou, Z. N. (2003). ATPdependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. Life Sciences, 73(10): 1275-1287.

PUBLICACIONES DE ESTA TESIS

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de esta Tesis doctoral a las siguientes publicaciones:

• Ragone, M. I., Bayley, M., Colareda, G. A., Bonazzola, P., & Consolini, A. E. (2020). Cardioprotective mechanisms of HipoThyroidism on ischemia/reperfusion in rats and effects of carvedilol: energetic study. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 25(1), 72-85.

Premio anual 2023 de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, correspondiente a la sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas por el trabajo:
 "Efectos de amiodarona y dronedarona en el atontamiento cardíaco por isquemia y reperfusión: influencia del óxido nítrico y participación de canales mKATP".

• Bayley, M., Ragone, M. I., Diaz, R. G., & Consolini, A. E. (2025). Amiodarone oral subacute prevents cardiac dysfunction of Ischemia/reperfusion in rats: mechanisms and influence of hypothyroidism. Journal of European Pharmacology. <u>Actualmente en revisión.</u>