

Papel de la tioredoxina-1 en el atontamiento cardíaco en ratones transgénicos

Role of Thioredoxin-1 on Myocardial Stunning in Transgenic Mice

TAMARA MAZO¹, VIRGINIA PÉREZ^{§, 1, 2}, ANABELLA GÓMEZ¹, CLARA LLAMOSAS¹, LAURA VALDEZ², TAMARA ZAORBONYJ², LILIANA NICOLOSI^{MTSAC, 3}, MARÍA C. RUBIO^{MTSAC, 3}, VERÓNICA D'ANNUNZIO^{MTSAC, 1, 2}, RICARDO J. GELPI^{MTSAC, 1, 2}

RESUMEN

Introducción: La disfunción ventricular posisquémica (miocardio atontado) involucra un aumento del estrés oxidativo. En este sentido, la célula cuenta con mecanismos de defensa, como la tioredoxina-1, un antioxidante que protege al miocardio de la lesión por isquemia/reperfusión, reduciendo el tamaño del infarto.

Objetivo: Evaluar el comportamiento de la función ventricular sistólica y diastólica, particularmente estudiando la rigidez miocárdica y la relajación isovolúmica en el miocardio atontado en diferentes ratones transgénicos.

Material y métodos: Se utilizaron corazones de ratones que sobreexpresan tioredoxina-1 y de ratones transgénicos que sobreexpresan tioredoxina-1 mutada en su sitio activo (dominante negativo), comparados con los de ratones no transgénicos, los cuales fueron sometidos a 15 minutos de isquemia global y 30 minutos de reperfusión utilizando la técnica de Langendorff. Se evaluó la función ventricular sistólica y diastólica y se calculó el t63 y el t93 como índice de relajación isovolúmica.

Resultados: Las mediciones a los 30 minutos de reperfusión mostraron una mejoría significativa del estado contráctil en los ratones tioredoxina-1 ($57,4 \pm 4,9$ mm Hg; $p \leq 0,05$ vs. no transgénicos) y también en la rigidez ($11,8 \pm 2,9$ mm Hg; $p \leq 0,05$ vs. no transgénicos). Por otra parte, en los ratones dominantes negativos se observó un aumento de la rigidez ($37,7 \pm 5,5$ mm Hg; $p \leq 0,05$ vs. no transgénicos) y un enlentecimiento de la relajación a los 30 minutos de la reperfusión ($78,2 \pm 9,8$ msec; $p \leq 0,05$ vs. no transgénicos).

Conclusión: Este trabajo evidencia el rol protector de la tioredoxina-1 en el miocardio atontado y su importancia fisiopatológica en ratones que sobreexpresan este antioxidante.

Palabras clave: Aturdimiento miocárdico - Estrés oxidativo - Tiorredoxinas - Función ventricular

ABSTRACT

Background: Postischemic ventricular dysfunction (myocardial stunning) involves increased oxidative stress. In this sense, the cell has defense mechanisms, as thioredoxin-1, an antioxidant that protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury, reducing infarct size.

Objective: The aim of this study was to evaluate systolic and diastolic ventricular function, specifically analyzing myocardial stiffness and isovolumic relaxation, during myocardial stunning in different transgenic mice.

Methods: Hearts from mice overexpressing thioredoxin-1 and transgenic mice overexpressing thioredoxin-1 with gene mutation in its active site (dominant negative) were compared with hearts from non-transgenic mice after 15-minute global ischemia and 30-minute reperfusion using the Langendorff technique. Systolic and diastolic ventricular function was evaluated and t63 and t93 were calculated as ventricular relaxation index.

Results: At 30-minute reperfusion, thioredoxin-1 mice showed a significantly improved contractile state (57.4 ± 4.9 mmHg; $p \leq 0.05$ vs. non-transgenic mice) and stiffness (11.8 ± 2.9 mmHg; $p \leq 0.05$ vs. non-transgenic mice). Conversely, at the same reperfusion time, dominant negative mice exhibited increased stiffness (37.7 ± 5.5 mmHg; $p \leq 0.05$ vs. non-transgenic mice) and slower relaxation (78.2 ± 9.8 ms; $p \leq 0.05$ vs. non-transgenic mice).

Conclusion: This study reveals the protective role of thioredoxin-1 on myocardial stunning and its pathophysiological importance in mice overexpressing this antioxidant.

Key words: Myocardial Stunning - Oxidative Stress - Thioredoxins - Ventricular Function

REV ARGENT CARDIOL 2015;83:394-399. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v83.i5.6998>

Recibido: 15/07/2015 - Aceptado: 14/08/2015

Dirección para separatas: Dr. Ricardo J. Gelpi - Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina. J. E. Uruburu 950, 2.º Piso - (C1114AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina - Tel./Fax: 54-11-4962-4945 - e-mail: rgelpi@fmed.uba.ar

MTSAC Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

§ Para optar a Miembro Adherente de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (INFICA) - Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA

² Instituto de Biología y Medicina Molecular (IBIMOL), UBA-CONICET

³ División de Cardiología - Hospital Español de Buenos Aires

FUENTES DE APOYO: Subsidio de la Universidad de Buenos Aires, UBACYT 2011-2014.

Subsidio de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica PICT 0258.

Abreviaturas

+dP/dt_{máx}	Máxima derivada de la presión con respecto al tiempo	PDFVI	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
-dP/dt_{mín}	Mínima derivada de la presión con respecto al tiempo	PDVI	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
DN	Dominante negativo	PPC	Presión de perfusión coronaria
ERO	Especies reactivas del oxígeno	Trx	Tiorredoxina
I/R	Isquemia/reperfusión	TXNIP	Proteína de interacción con tiorredoxina
NTG	No transgénico		

INTRODUCCIÓN

El miocardio atontado es una disfunción ventricular posisquémica reversible que ocurre luego de un período corto de isquemia seguido de reperfusión que se caracteriza por presentar una disminución del estado contráctil acompañado de una alteración de la función diastólica. (1) Es importante destacar que esta entidad fisiopatológica está presente en varias situaciones clínico-quirúrgicas, como pacientes sometidos a terapias de reperfusión tales como tratamiento con trombolíticos, angioplastia y cirugía de *bypass* coronario. (2) Por lo tanto, resulta interesante el estudio de los mecanismos fisiopatológicos en el miocardio atontado dada la aplicación clínica de esta entidad.

Es conocido que la disfunción ventricular posisquémica que ocurre luego de un período de isquemia/reperfusión (I/R), conocido como miocardio atontado, involucra una alteración en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}), que se acompaña de un aumento del estrés y daño oxidativo. (3, 4) Una de las organelas particularmente dañadas es la mitocondria, la cual a su vez produce más estrés oxidativo. Numerosos autores han señalado que durante la reperfusión hay un marcado incremento de la producción mitocondrial del anión radical superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los que llevan a estrés y daño oxidativo y a daño celular. (5) Boveris y colaboradores habían establecido que la producción mitocondrial de O_2^- y de H_2O_2 ocurre en condiciones fisiológicas, (6, 7) reconociéndose después que esta producción de O_2^- y de H_2O_2 está aumentada en la I/R. (8, 9) Con respecto al miocardio atontado, en nuestro laboratorio demostramos, en un modelo de corazón aislado de conejo que la disfunción ventricular está asociada con una disfunción mitocondrial denominada “síndrome del complejo I”, que involucra una disminución del consumo tisular y mitocondrial de oxígeno y un aumento significativo de la producción de H_2O_2 y de peroxinitritos (ONOO^-). (10) Por lo expuesto, resulta claro que durante la lesión por I/R existe un aumento del estrés y del daño oxidativo, y que por lo tanto resulta interesante estudiar el rol que ejercen los sistemas antioxidantes frente a esta entidad fisiopatológica.

En este sentido, la célula cuenta con varios mecanismos antioxidantes de protección y entre ellos se encuentra el sistema de tiorredoxina (Trx), uno de los sistemas antioxidantes más importantes conocidos hasta la actualidad. (11) Particularmente la Trx1 (12 kDa) es

un componente importante de la defensa celular contra el daño miocárdico ejerciendo efectos antiapoptóticos, (12) antiinflamatorios (13) y protectores frente a la lesión por I/R. (14, 15) Sin embargo, no hay suficiente evidencia experimental que demuestre los efectos del sistema de Trx sobre la función ventricular haciendo hincapié en el estado contráctil y la función diastólica en un protocolo de atontamiento miocárdico. En relación con Trx y miocardio atontado, Yoshioka y colaboradores informaron que la deficiencia en la proteína de interacción con tiorredoxina (TXNIP), una proteína que se asocia e inhibe la Trx1 citosólica y la Trx2 mitocondrial, mejora la recuperación de la función mitocondrial y ventricular del miocardio atontado. (16) En cuanto a la función ventricular, observaron una clara mejoría del estado contráctil, pero no estudiaron la función diastólica en detalle ni la relación de la disfunción mecánica con la Trx1.

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de la función ventricular sistólica y diastólica, particularmente estudiando la rigidez miocárdica y la relajación isovolúmica en el miocardio atontado en ratones transgénicos que sobreexpresan Trx1 y en ratones transgénicos que sobreexpresan Trx1 mutada en su sitio activo (DN-Trx1) comparándolos con ratones no transgénicos (NTG).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratones FVB NTG y transgénicos con fondo FVB, todos ellos machos, de tres meses de edad y con un peso de $24,2 \pm 1,5$ g. Los ratones transgénicos tenían sobreexpresión específica cardíaca, mediante el promotor de la cadena pesada de α -miosina, de Trx1 y de Trx1 mutada en el sitio activo (dominantes negativos, DN-Trx1), respectivamente (Stratagene, La Jolla, California, USA). Cabe aclarar que los DN-Trx1 tenían la actividad enzimática de Trx1 casi nula.

Modelo experimental

Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de pentobarbital (150 mg/kg) y heparina sódica (500 UI/kg) vía inyección intraperitoneal. Una vez anestesiados, se les abrió el tórax, se aisló la aorta, que se canuló inmediatamente con una cánula 21 G. Luego, los corazones se montaron en un sistema de Langendorff y se perfundieron con solución de Krebs-Henseleit, compuesta por (en mM): NaCl 118,5, KCl 4,7, NaHCO_3 24,8, KH_2PO_4 1,2, MgSO_4 1,2, CaCl_2 1,5, glucosa 10. Esta solución fue burbujeada continuamente con una mezcla de gas carbónico (95% O_2 y 5% CO_2 con pH 7,4 a 37 °C) para mantener la solución oxigenada y a un pH fisiológico. Se utilizó un balón de látex, el cual se llenó con una solución acuosa y se

conectó a través de un catéter de plástico delgado (P50) a un transductor de presión (Deltram II, Utah Medical System); luego se insertó en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda. El balón se llenó para alcanzar una presión de fin de diástole de aproximadamente 10 mm Hg. En la base de las aurículas se colocaron dos electrodos conectados a un marcapasos para mantener una frecuencia cardíaca constante durante todo el experimento. También se registró la presión de perfusión coronaria (PPC) a través de un transductor de presión conectado a la línea de perfusión. Todos los corazones fueron perfundidos con flujo constante. La presión ventricular izquierda y la PPC se registraron en tiempo real usando un ordenador con *hardware* de adquisición de datos. La presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) se calculó como la diferencia entre la presión sistólica máxima y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI). También se midieron la PDFVI y la tasa máxima de aumento de la presión ventricular izquierda, o derivada de la presión con respecto al tiempo ($+dP/dt_{\text{máx}}$ y $-dP/dt_{\text{mín}}$)

Todos los corazones fueron sometidos, luego de 20 minutos (min) de estabilización a 15 min de isquemia global seguidos de 30 min de reperfusión. La PDVI y la $+dP/dt_{\text{máx}}$ se determinaron como indicadores de estado contráctil, y la PDFVI se determinó como índice de rigidez miocárdica. Se calculó el índice t63, definido como el tiempo requerido para que la presión ventricular izquierda caiga un 63% y el t93 definido como el tiempo requerido para la presión ventricular izquierda caiga un 93%, ambos como índices de relajación isovolumétrica.

Análisis estadístico

La distribución normal de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró estadísticamente significativa una $p \leq 0,05$.

Consideraciones éticas

Este estudio se realizó de acuerdo con las normativas de la American Physiological Society "Principios Rectores en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (NIH Publication 85-23, 1996). El protocolo experimental fue aprobado,

de acuerdo con las regulaciones argentinas (ANMAT) para el uso de animales de experimentación, por parte del Comité de Cuidado y Experimentación Animal de la Universidad de Buenos Aires (Expte. N° 1-47-1113-800-13-9 Julio 2013).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los valores promedio de las variables hemodinámicas en situación basal. En la Tabla 2 se presentan los promedios de función ventricular sistólica (PDVI y $+dP/dt_{\text{máx}}$) y diastólica (PDFVI, $-dP/dt_{\text{mín}}$, t63 y t93) en los ratones NTG, Trx1 y DN-Trx1 en situación basal; no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En la Figura 1 se muestra el comportamiento del estado contráctil, el cual está representado por la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, panel A) y la derivada de la presión con respecto al tiempo ($+dP/dt_{\text{máx}}$, panel B). Como puede observarse, no hay diferencias en la PDVI en los grupos estudiados en condiciones basales, pero a los 30 min de la reperfusión se observa una mejoría del estado contráctil en el grupo de animales Trx1 comparados con los grupos NTG y DN-Trx1 (Trx1 $57,4 \pm 4,9$ mm Hg, $p \leq 0,05$, vs. NTG $27,1 \pm 6,3$ y DN-Trx1 $29,2 \pm 7,1$ mm Hg). La $+dP/dt_{\text{máx}}$ muestra un comportamiento similar en cuanto al estado contráctil representado por la PDVI.

En la Figura 2 se muestra la presión diastólica final del ventrículo izquierdo como índice de rigidez miocárdica (PDFVI, panel A). Se observa un aumento significativo a los 30 min de reperfusión en el grupo NTG ($24,5 \pm 4,8$ mm Hg), mientras que los ratones Trx1 evidencian una mejoría significativa de la rigidez miocárdica a los 30 min de la reperfusión ($11,8 \pm 2,9$ mm Hg, $p \leq 0,05$, vs. NTG y DN-Trx1). A su vez, en el grupo DN-Trx1 se exacerbó el incremento de la PDFVI a los 30 min de la reperfusión ($37,7 \pm 5,5$ mm Hg, $p \leq 0,05$, vs. NTG y Trx1). Con respecto al t63 (panel B), se observó un enlentecimiento de la relajación al inicio de la reperfusión (1,5 min) en los grupos NTG y

	Flujo coronario	Frecuencia cardíaca	Presión de perfusión coronaria
Basal	$4,0 \pm 0,2$ ml/min	$472,1 \pm 30,2$ lat/min	$73,1 \pm 3,1$ mm Hg

Tabla 1. Variables hemodinámicas promedio de los ratones en estado basal

Tabla 2. Variables hemodinámicas promedio de cada uno de los grupos de ratones en estado basal

Cepas	PDVI (mm Hg)	PDFVI (mm Hg)	$+dP/dt_{\text{máx}}$ (mm Hg/seg)	$-dP/dt_{\text{mín}}$ (mm Hg/seg)	t63 (mseg)	t93 (mseg)
NTG	$92,4 \pm 6,7$	$9,1 \pm 0,8$	3.259 ± 344	2.786 ± 282	$44,5 \pm 2,1$	$62,9 \pm 2,8$
Trx1	$91,9 \pm 4,2$	$8,3 \pm 0,7$	3.234 ± 251	2.698 ± 196	$44,3 \pm 2,0$	$65,1 \pm 2,8$
DN-Trx1	$95,8 \pm 4,2$	$8,2 \pm 0,7$	3.490 ± 400	2.950 ± 370	$42,3 \pm 2,1$	$60,8 \pm 3,2$

PDVI: Presión desarrollada del ventrículo izquierdo. PDFVI: Presión diastólica final del ventrículo izquierdo. $+dP/dt_{\text{máx}}$: Máxima derivada de la presión en función del tiempo. $-dP/dt_{\text{mín}}$: Mínima derivada de la presión en función del tiempo. t63: Índice de relajación, tiempo que tarda en relajarse el ventrículo un 63%. t93: Índice de relajación, tiempo que tarda en relajarse el ventrículo un 93%. NTG: Grupo no transgénicos. Trx1: Grupo tioredoxina-1. DN-Trx1: Grupo dominantes negativos, Trx1 mutada en el sitio activo.

Fig. 1. Estado contráctil en el miocardio atontado. Panel **A**: Presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, en mm Hg). Panel **B**: Derivada de la presión en función del tiempo ($+dP/dt_{max}$ en mm Hg/seg). Se observa una mejoría de la recuperación del estado contráctil en el grupo Trx1 con respecto a los grupos NTG y DN-Trx1. * $p \leq 0,05$ vs. NTG; # $p \leq 0,05$ vs. Trx1. NTG: Grupo no transgénicos. Trx1: Grupo tiorredoxina-1. DN-Trx1: Grupo dominantes negativos, Trx1 mutada en el sitio activo.

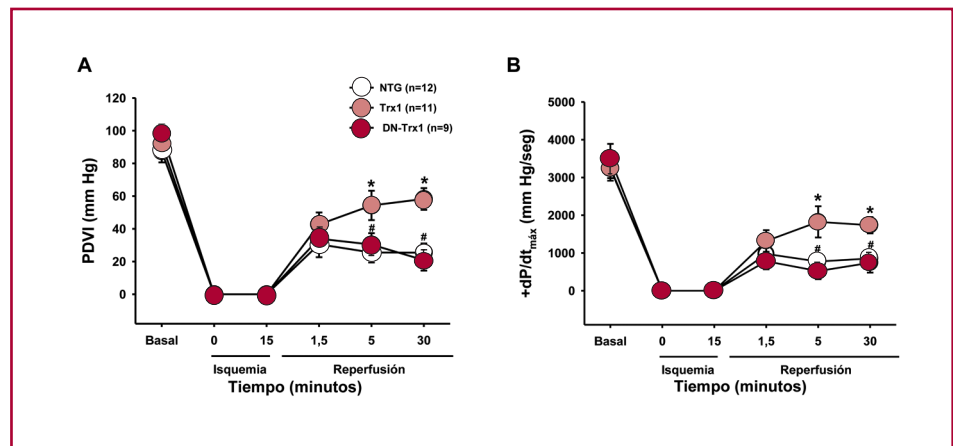
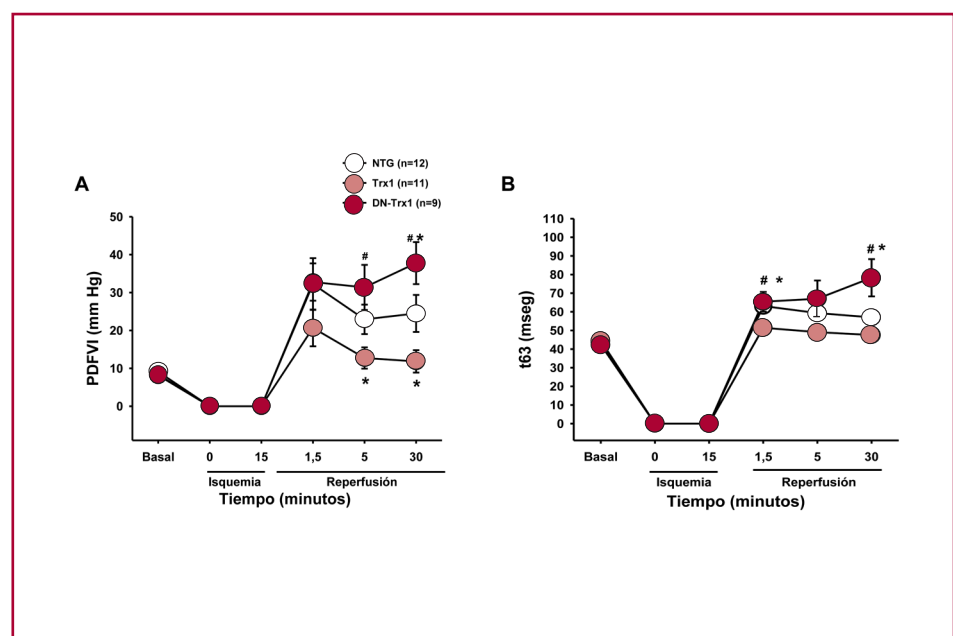


Fig. 2. Función ventricular diastólica en el miocardio atontado. Panel **A**: Índice de rigidez miocárdica [presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (PDFVI, mm Hg)]; se observa un incremento de la rigidez en los grupos NTG y DN-Trx1 durante la reperfusión que se ve atenuada en los ratones Trx1. Panel **B**: Índice de relajación miocárdica (t63 para todos los grupos); se evidencia un enlentecimiento de la relajación en los grupos NTG y DN-Trx1, mientras que en el grupo Trx1 no se observa este enlentecimiento de la relajación. * $p \leq 0,05$ vs. NTG; # $p \leq 0,05$ vs. Trx1. NTG: Grupo no transgénicos. Trx1: Grupo tiorredoxina-1. DN-Trx1: Grupo dominantes negativos, Trx1 mutada en el sitio activo.



DN-Trx1 (NTG $63,3 \pm 3,2$ mseg y DN-Trx1 $65,4 \pm 5,2$ mseg). Sin embargo, en los ratones Trx1 se observó una mejoría en la relajación isovolúmica en comparación con los grupos NTG y DN-Trx1 (Trx1 $51,4 \pm 1,9$ mseg, $p \leq 0,05$, vs. NTG y DN-Trx1). Al final de la reperfusión (30 min) tanto el grupo NTG como Trx1 regresaron a valores de t63 similares a los preisquémicos (NTG $57,1 \pm 2,1$ mseg y Trx1 $47,5 \pm 2,5$ mseg). Sin embargo, en el grupo de animales DN-Trx1 se exacerbó el enlentecimiento de la relajación en comparación con los ratones NTG y Trx1 ($78,2 \pm 9,8$ mseg, $p < 0,05$, vs. NTG y Trx1).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una mejoría en la función contráctil en el grupo de ratones que sobreexpresan Trx1, en comparación con los grupos NTG y DN-Trx1. Con respecto a la función diastólica, el grupo Trx1 muestra una rigidez menor que el grupo NTG y

que el grupo DN-Trx1, el cual muestra un aumento de la rigidez miocárdica con respecto al grupo NTG. Por último, la relajación miocárdica se encuentra enlentecida en el grupo DN-Trx1 con respecto a los grupos NTG y Trx1.

Es conocido que en el miocardio atontado existe una alteración diastólica con diferente comportamiento para cada una de las dos subfases, es decir, en la relajación y en la rigidez miocárdica. Esta disociación se manifiesta debido a que en la reperfusión temprana existe una alteración de la relajación, mientras que la rigidez permanece dentro de los límites normales. Por otro lado, en la reperfusión tardía se normalizan las alteraciones lusitrópicas, mientras que la rigidez miocárdica aumenta. (16, 17) Esta disociación diastólica se confirma en nuestro modelo en el grupo NTG con una alteración en la reperfusión temprana de la relajación y un aumento de la rigidez en la reperfusión tardía. Es interesante observar que en el grupo DN-Trx1 la alteración de la relajación y el aumento de la rigidez

se dan durante toda la reperfusión, sin respetar los períodos antes mencionados. Por otro lado, en el grupo Trx1, la alteración de la relajación y el aumento de la rigidez son menores que en el grupo NTG y tienden a volver a los valores preisquémicos hacia el final de la reperfusión.

Además, los datos presentados muestran una relación directa entre la sobreexpresión de la Trx1 y la función ventricular sistólica, ya que el grupo Trx1 muestra una mejoría en la recuperación del estado contráctil del miocardio atontado en comparación con los grupos NTG y DN-Trx1. El grupo de ratones DN-Trx1, en los que la Trx1 sobreexpresada tiene una mutación de su sitio activo y por lo tanto su actividad es prácticamente nula, no mostró una mejoría en el estado contráctil con respecto al grupo NTG, pero tampoco empeoró, a diferencia de los parámetros de función diastólica. Esta disociación entre el estado contráctil y la función diastólica quizás se deba a que los mecanismos involucrados en la cardioprotección conferida por la Trx1, frente a la lesión por I/R, son diferentes.

Con respecto a la función ventricular, otros autores han demostrado una mejoría en su recuperación, en protocolos de miocardio atontado, cuando se administran antioxidantes de manera exógena. (18, 19) Sin embargo, no hay estudios que evalúen qué sucede con la función ventricular cuando existe falta de actividad de antioxidantes, como ocurre en el grupo DN-Trx1. En relación con este concepto, Asimakis y colaboradores, (20) utilizando dos modelos de ratones transgénicos, unos con deficiencia citosólica de SOD (SOD1) y otros con deficiencia mitocondrial de SOD (SOD2), observaron que solo la deficiencia parcial de SOD2 afectaba negativamente la recuperación de la función ventricular en comparación con los ratones NTG control. (20) Atribuyeron esta diferencia a que posiblemente las mitocondrias contribuirían en mayor medida a la generación de estrés oxidativo y, por lo tanto, solo observaron cambios en el modelo con déficit de SOD mitocondrial. Una diferencia de estos autores con nuestro trabajo es que ellos utilizaron 30 min de isquemia y, por lo tanto, con presencia de tejido necrótico que dificulta la evaluación correcta de la función ventricular. En nuestro modelo, si bien el tiempo de isquemia es menor (15 min), se muestra cómo la deficiencia de Trx1 citosólica tiene un efecto nocivo en la recuperación de la función ventricular diastólica, sin cambios en la recuperación del estado contráctil. Este hallazgo es novedoso, ya que plantea una disociación del mecanismo sistólico y diastólico que involucra al sistema de Trx1. También evaluando la función ventricular, Yoshioka y colaboradores (21) estudiaron los efectos del sistema de proteína que regula la actividad de Trx1 y Trx2 sobre la función ventricular en un modelo de atontamiento miocárdico. La diferencia con nuestro estudio es que estos autores no estudiaron la función ventricular diastólica en detalle, y, por otro lado, utilizaron un modelo transgénico con deficiencia de una proteína que interactúa con la Trx (TXNIP),

inhibiendo tanto la Trx1 como la Trx2; por lo tanto, no se puede discernir si los efectos beneficiosos sobre la función ventricular fueron por la Trx presente en el citosol o en la mitocondria. De esta manera, nuestro trabajo amplía este conocimiento, estudiando en forma detallada los efectos de la Trx1 citosólica sobre la función ventricular diastólica y proyectando evaluar la señalización de las proteínas involucradas en la relajación y su relación con la función mitocondrial.

Como ya se mencionó, en la disfunción ventricular del miocardio atontado están involucradas tanto la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} como la generación de estrés oxidativo. Con respecto a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , los mecanismos implicados en la entidad fisiopatológica del atontamiento se relacionan con la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular y la alteración de la repuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} . A su vez, esto último podría deberse a modificaciones covalentes causadas por las especies reactivas del oxígeno (ERO) que lesionan las proteínas contráctiles, pudiendo modificar su sensibilidad al Ca^{2+} . (22) Con respecto a la generación de estrés oxidativo, Bolli y colaboradores (23, 24) fueron los primeros en demostrar la participación de las ERO en el mecanismo fisiopatológico del miocardio atontado, sugiriendo fuertemente que el aumento de ERO produce peroxidación lipídica y, como consecuencia, favorece la desnaturalización de proteínas con la consiguiente alteración de la permeabilidad de las membranas y el funcionamiento de enzimas y organelas. (25-27)

CONCLUSIÓN

Este trabajo demuestra el papel protector de la Trx1 en el miocardio atontado en ratones que sobreexpresan este antioxidante. Muestra además la importancia de esta proteína, ya que, por un lado, la sobreexpresión de Trx1 mejora la función ventricular, tanto sistólica como diastólica y, por otro, la deficiencia en su función altera la recuperación de la función diastólica en comparación con los ratones NTG controles. Son necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos intracelulares involucrados en la protección conferida por la Trx1 y de esta manera se puedan plantear posibles nuevos tratamientos para el miocardio atontado que sufren los pacientes sometidos a terapias de reperfusión y evitar así posibles riesgos y complicaciones.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web/ Material suplementario).

BIBLIOGRAFÍA

1. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990;82:723-38. <http://doi.org/df3q76>
2. Bolli R, Hartley CJ, Rabinovitz RS. Clinical relevance of myocardial "stunning". *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:877-90. <http://doi.org/d9tr9n>

3. González GE, Rodríguez M, Donato M, Palleiro J, D'Annunzio V, Morales C, et al. Effects of low-calcium reperfusion and adenosine on diastolic behavior during the transitory systolic overshoot of the stunned myocardium in the rabbit. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84:265-72. <http://doi.org/cx7rs3>
4. Hess ML, Kukreja RC. Free radicals, calcium homeostasis, heat shock proteins, and myocardial stunning. *Ann Thorac Surg* 1995;60:760-6. <http://doi.org/df9qrm>
5. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, et al. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989;65:607-22. <http://doi.org/6pm>
6. Boveris A, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:535-42. E8.
7. Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol* 2002;349:280-7. <http://doi.org/ccz8qc>
8. Ostadal P, Elmoselhi AB, Zdobnicka I, Lukas A, Elimban V, Dhalla NS. Role of oxidative stress in ischemia-reperfusion-induced changes in Na⁺, K⁺-ATPase isoform expression in rat heart. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:914-23. <http://doi.org/ckgwp2>
9. Liu P, Xiang JZ, Zhao L, Yang L, Hu BR, Fu Q. Effect of beta2-adrenergic agonist clenbuterol on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts and cardiomyocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:661-9. <http://doi.org/c2wnbq>
10. Valdez LB, Zaobornyj T, Bombicino S, Iglesias DE, Boveris A, Donato M, et al. Complex I syndrome in myocardial stunning and the effect of adenosine. *Free Radic Biol Med* 2011;51:1203-12. <http://doi.org/b8cb6j>
11. Mahmood DF, Abderrazak A, El Hadri K, Simmet T, Rouis M. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:1266-303. <http://doi.org/6pn>
12. Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol* 2002;4:743-9. <http://doi.org/fj2wd2>
13. Nakamura H, Herzenberg LA, Bai J, Araya S, Kondo N, Nishinaka Y, et al. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15143-8. <http://doi.org/dzg4xc>
14. Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Akita Y, Samuel SM, Otani H, et al. Thioredoxin 1 enhances neovascularization and reduces ventricular remodeling during chronic myocardial infarction: a study using thioredoxin 1 transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:239-47. <http://doi.org/cc2m3h>
15. Yoshioka J, Lee RT. Thioredoxin-interacting protein and myocardial mitochondrial function in ischemia-reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med* 2014;24:75-80. <http://doi.org/6pp>
16. Mosca SM, Gelpi RJ, Cingolani HE. Dissociation between myocardial relaxation and diastolic stiffness in the stunned heart: its prevention by preconditioning. *J Mol Cell Biochem* 1993;129:171-8. <http://doi.org/fbggtz>
17. Mosca SM, Carriquiriborde M, Cingolani HE. Biphasic changes in relaxation following reperfusion after myocardial ischemia. *Mol Cell Biochem* 1996;160-1:123-8. <http://doi.org/c94qtj>
18. Kaplan P, Matejovicova M, Herijgers P, Flameng W. Effect of free radical scavengers on myocardial function and Na⁺, K⁺-ATPase activity in stunned rabbit myocardium. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:213-9. <http://doi.org/c83dbc>
19. Kals J, Starkopf J, Zilmer M, Pruler T, Pulges K, Hallaste M, et al. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. *Int J Cardiol* 2008;125:133-5. <http://doi.org/c83dbc>
20. Asimakis GK, Lick S, Patterson C. Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation* 2002;105:981-6. <http://doi.org/fvqqzs>
21. Yoshioka J, Chutkow WA, Lee S, Kim JB, Yan J, Tian R, et al. Deletion of thioredoxin-interacting protein in mice impairs mitochondrial function but protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2012;122:267-79. <http://doi.org/fox4rr>
22. Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofibrillar proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res* 1998;82:261-71. <http://doi.org/6pq>
23. Bolli R, Zhu WX, Hartley CJ, Michael LH, Repine JE, Hess ML, et al. Attenuation of dysfunction in the postischemic "stunned" myocardium by dimethylthiourea. *Circulation* 1987;76:458-68. <http://doi.org/bn68bc>
24. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McKay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988;82:476-85. <http://doi.org/fg4pb8>
25. Ullrich V, Brüne B, Hecker G, Schmidt KU, Mülsch A, Busse R. Physiological targets of superoxide anion and hydrogen peroxide in reperfusion injury. *Free Radic Res Commun* 1989;7:265-74. <http://doi.org/dvzv8d>
26. Kaneko M, Masuda H, Suzuki H, Matsumoto Y, Kobayashi A, Yamazaki N. Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. *Mol Cell Biochem* 1993;125:163-9. <http://doi.org/dvzv8d>
27. Wills ED. Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 1971;123:983-91.