



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Valoración del efecto cardioprotector de Nebivolol y Trimetazidina sobre los daños
cardiacos inducidos por periodos de isquemia-reperfusión en ratas.**

POR:

ALDAHIR MERO

8-882-1758

DIRECTORA:

ESTELA GUERRERO DE LEÓN

ASESOR:

JUAN ANTONIO MORÁN PINZÓN

**TRABAJO DE GRADUACIÓN
PRESENTADO PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Ciudad Universitaria: Dr. Octavio Méndez Pereira

Panamá, 25 de octubre del 2023

I. Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado, en primer lugar, a las personas que de alguna manera contribuyeron al desarrollo y culminación de este proyecto. Entre esas personas quiero destacar de manera muy especial a mis tutores y amigos, la Dra. Estela Guerrero y al Mgtr. Juan Morán; que, sin su orientación, buena voluntad, ayuda, apoyo y sus llamados de atención; este trabajo hubiese sido mucho más difícil. También quiero destacar, con mucho cariño, el apoyo de la Dra. Ivonne Torres que como jefa del departamento de farmacología y amiga siempre estuvo dispuesta a brindarme su apoyo en lo que necesitase.

A mi amiga y compañera de maestría Xenia Hernández, que recorrimos juntos este camino tanto en las clases como en los experimentos y escritura de la tesis.

Tengo que reconocer que este trabajo no hubiera sido una realidad sin el apoyo incondicional de mi familia, que siempre estuvo allí para suplirme cualquier necesidad que se me presentara desde los lonches que me preparaba mi mamá, Oreliz Ríos, para los días largos de experimentos hasta los fines de semana que le robe a mi hermana, Zoany Mero para que me pudiera ayudar a preparar las soluciones y a lavar el material de cirugía.

Finalmente, a mi papá Cesar Mero, que, aunque físicamente no está presente, se que estás muy orgulloso de verme cumplir una meta que me viste empezar y ahora, desde el cielo, me ves culminar.

II. Agradecimiento

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo y orientación de las Dras. Estela Guerrero e Ivonne Torres y del Mgtr. Juan Morán.

También quiero agradecer al Centro de investigaciones psicofarmacológicas (CIPFAR), por brindarme un nicho para que pudiera desarrollar el proyecto de investigación de mi tesis.

A Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología e investigación y a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado por ser las fuentes de financiamiento que permitieron la exitosa ejecución del proyecto de tesis.

A Abdy Morales, Hugo Sánchez y Maricselis Diaz; mis compañeros del departamento de Farmacología y del CIPFAR, que fueron un gran apoyo para realizar mis experimentos.

Por último, a mi familia por su apoyo incondicional

III. Índice

I. Dedicatoria.....	2
II. Agradecimiento	4
III. Índice	6
IV. Índice de figuras	10
V. Índice de tablas	12
VI. Índice de Gráficos.....	14
VII. Abreviaturas.....	17
VIII. Introducción.....	20
IX. Objetivos	22
X. Justificación	24
XI. Marco Teórico	26
1. Epidemiología del infarto.....	27
2. Fisiopatología del infarto	27
3. Lesión por isquemia reperusión	28
4. Tratamiento farmacológico de la isquemia miocárdica aguda.....	31
5. Fármacos objeto de estudio y resultados experimentales relacionados	32
5.1. Trimetazidina y resultados de sus principales propiedades farmacológicas descritas a través de estudios pre-clínicos.....	32
5.1.1. Generalidades farmacológicas de la trimetazidina	32
5.1.2. Propiedades antioxidantes de la trimetazidina	35
5.1.3. Mecanismos cardioprotectores de la trimetazidina en modelos de isquemia.....	37
5.2. Nebivolol y sus propiedades cardiovasculares y antioxidantes descritas en estudios pre-clínicos.....	40
5.2.1. Generalidades farmacológicas del Nebivolol.....	40
5.2.2. Propiedades antioxidantes del Nebivolol.....	41
5.2.3. Efectos cardioprotectores del Nebivolol demostrados en modelos experimentales.....	45
6. Modelo experimental de corazón perfundido de Langendorff	48
6.1. Generalidades del modelo de corazón perfundido de Langendorff	48
6.2. Parámetros obtenidos a partir del corazón perfundido	48
6.3. Ventajas y desventajas del modelo de corazón perfundido de Langendorff	51
6.4. Corazón perfundido como modelo traslacional del IM y de la lesión por isquemia reperusión.	51
XII. Metodología	53

7. Biomodelo experimental	54
7.1. Modelo de Isquemia Reperusión	54
7.1.1. Cirugía y extirpación del corazón	54
7.1.2. Estandarización del modelo de I/R empleando el corazón perfundido de Langendorff	55
7.1.3. Evaluación de los parámetros fisiológicos	56
7.1.4. Evaluación del efecto cardioprotector de Nebivolol y Trimetazidina, solos y en combinación, empleando el modelo de I/R	58
7.1.5. Determinaciones histológicas del corazón	60
8. Evaluación vascular de Nebivolol y Trimetazidina	60
8.1. Efecto vascular de la NEB/TMZ en anillos aórticos	60
8.1.1. Efecto vasorelajante de NEB/TMZ en la aorta de rata aislada	60
8.1.2. Efecto del pretratamiento con NEB/TMZ sobre la contracción inducida por NA	62
8.1.3. Efecto del pretratamiento con NEB/TMZ en la relajación inducida por ACh	63
9. Actividad antioxidante de NEB y TMZ	64
9.1. Actividad antiradicalaria frente a DPPH	64
9.2. Actividad atrapadora del radical de óxido nítrico	65
9.3. Actividad atrapadora de radicales de anión superóxido	66
XIII. Resultados	68
10. Estandarización del modelo de I/R empleando el corazón perfundido de Langendorff	69
10.1. Presión desarrollada del ventrículo izquierdo	69
10.1.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min	69
10.1.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min	69
10.2. Doble producto	73
10.2.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min	73
10.2.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min	74
10.3. Max dP/dt	77
10.3.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min	77
10.3.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min	78
10.4. Min dP/dt	81
10.4.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min	81
10.4.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min	82
11. Evaluación del efecto cardioprotector de Nebivolol y Trimetazidina, solos y en combinación, empleando el modelo de I/R	85
11.1. Efecto cardioprotector de los tratamientos	85
11.1.1. Parámetros hemodinámicos de corazones sometidos a I/R y perfundidos con Trimetazidina	85
11.1.2. Parámetros hemodinámicos de corazones sometidos a I/R y perfundidos con Nebivolol	88
11.1.3. Parámetros hemodinámicos de corazones sometidos a I/R y perfundidos con Trimetazidina y Nebivolol	90

12.1.4. Área de infarto	92
12. Evaluación de la actividad vascular de Nebivolol y Trimetazidina... 94	
12.1. Efecto vascular de Nebivolol y Trimetazidina en anillos de aorta de rata con endotelio precontractados con FE	94
12.2. Efecto de Nebivolol y Trimetazidina sobre la curva concentración-respuesta a noradrenalina en anillos de aorta aislada de rata.	95
12.3. Efecto de la combinación Nebivolol y Trimetazidina sobre la curva concentración-respuesta a noradrenalina en anillos de aorta aislada de rata.	97
12.4. Efecto de Nebivolol y/o Trimetazidina sobre la relajación inducida por acetilcolina	98
13. Evaluación de la actividad antioxidante de Nebivolol y Trimetazidina 100	
13.1. Actividad antiradicalaria frente a DPPH.....	100
13.2. Actividad antiradicalaria frente a ON●	103
12.1. Actividad antiradicalaria frente a ASO	105
XIV. Discusión	106
14. Efecto cardioprotector vascular y antioxidante de Trimetazidina .. 107	
14.1. Efecto cardioprotector	107
14.2. Vascular	110
14.3. Antioxidante.....	111
15. Efecto cardioprotector vascular y antioxidante de Nevibolol	112
14.1. Efecto cardioprotector	112
14.2. Efecto Vascular	116
14.3. Efecto Antioxidante.....	117
16. Efecto cardioprotector vascular y antioxidante del tratamiento combinado Nevibolol y Trimetazidina.....	118
XV. Conclusiones	121
XVI. Referencias	123

IV. Índice de figuras

Figura 1. Esquema del mecanismo de daño miocárdico inducido por I/R.....	29
Figura 2. Mecanismo de acción propuesto para la trimetazidina (TMZ) en el metabolismo y la protección miocárdica.....	34
Figura 3. Sustratos energéticos del corazón	38
Figura 4. Efectos protectores del nebivolol frente al estrés oxidativo para prevenir el daño de órganos diana relacionado con la hipertensión.	43
Figura 5. Mecanismos de acción del nebivolol en el sistema cardiovascular.....	46
Figura 6. Sistema de perfusión	55
Figura 7. Parámetros hemodinámicos obtenidos por el sistema de registro y calculados a partir de los datos registrados.....	57
Figura 8. Esquema del protocolo implementado en el desarrollo del trabajo experimental.	59
Figura 9. Registro original obtenido en el protocolo de evaluación vascular y obtención de la curva dosis respuesta de Nebivolol (A) y Trimetazidina (B) en anillos de aorta de rata.62	
Figura 10. Registro original obtenido en la evaluación del efecto de Nebivolol (A) y Trimetazidina (B) sobre la contracción vascular inducida por NA en anillos de aorta de rata.	63
Figura 11. Registro original obtenido en la evaluación del efecto de Nebivolol (A) y Trimetazidina (B) sobre la relajación vascular inducida por acetilcolina en anillos de aorta de rata.	64
Figura 12. Esquema de la metodología para la evaluación de la actividad antiradicalaria frente a DPPH.....	65
Figura 13. Esquema de la metodología para la evaluación de la actividad antiradicalaria frente a ON.	66
Figura 14. Esquema de la metodología para la evaluación de la actividad antiradicalaria frente a ASO.....	67

V. Índice de tablas

- Tabla 1.** Eficacia antioxidante demostrada para Nebivolol en modelos experimentales relacionados con enfermedad cardiovascular. 44
- Tabla 2.** Investigaciones del último año que utiliza el modelo de Langendorff en estudios de isquemia reperfusión50
- Tabla 3.** Valores de presión desarrollada por el ventrículo izquierdo en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R. 71
- Tabla 4.** Valores de doble producto en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R. 75
- Tabla 5.** Valores de Max dP/dt en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R. 79
- Tabla 6.** Valores de Min dP/dt en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R. 83

VI. Índice de Gráficos

Gráfico 1. Efecto sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL/min) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (SP) o deprivación de oxígeno (DO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$.	72
Gráfico 2. Efecto sobre el doble producto (DP) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL/min) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (IRSP) o deprivación de oxígeno (IRDO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$.	76
Gráfico 3. Efecto sobre la contractilidad miocárdica (Max dP/dt) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL/min) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (SP) o deprivación de oxígeno (DO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$.	80
Gráfico 4. Efecto sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (SP) o deprivación de oxígeno (DO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$.	84
Gráfico 5. Efecto desarrollado por la Trimetazidina sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) (A); doble producto (DP) (B); Max dP/dt (C) y Min dP/dt (D) en corazones aislados y perfundidos sometidos a I/R. * $p < 0.05$ vs control; $n = 8$.	87
Gráfico 6. Efecto desarrollado por la Nebivolol sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) (A); doble producto (DP) (B); Max dP/dt (C) y Min dP/dt (D) en corazones aislados y perfundidos sometidos a I/R. * $p < 0.05$ vs control; $n = 8$.	89
Gráfico 7. Efecto desarrollado por Trimetazidina y Nebivolol sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) (A); doble producto (DP) (B); Max dP/dt (C) y Min dP/dt (D) en corazones aislados y perfundidos sometidos a I/R. * $p < 0.05$ vs control; $n = 8$.	91
Gráfico 8. Área de infarto desarrolladas por las diferentes intervenciones experimentales. * $p < 0.05$ vs control; $n = 4$.	93
Gráfico 9. Curva concentración-respuesta de NEB, TMZ y ACh (1×10^{-8} a 1×10^{-3} M) evaluadas en anillos de aorta de rata con endotelio intacto (E+) y precontraídos con fenilefrina (FE 1×10^{-6} M). $n = 6$; $X \pm ES$.	94
Gráfico 10. Evaluación del efecto inhibitorio de Trimetazidina y Nebivolol (25 y 100 μ M) sobre la respuesta contráctil de noradrenalina (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M) en anillos de aorta de ratas con endotelio intacto (E+). $n = 6$; $X \pm ES$.	96
Gráfico 11. Evaluación del efecto inhibitorio de la combinación NEB-TMZ sobre la respuesta contráctil de noradrenalina (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M) en anillos de aorta de ratas con endotelio intacto (E+). $n = 6$; $X \pm ES$.	97

- Gráfico 12.** Curva dosis respuesta a Acetilcolina (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M), en ausencia y presencia de Trimetazidina y Nebivolol ($25 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$) en anillos de aorta de ratas con endotelio intacto (E+). $n=6$; $X \pm \text{ES}$ 99
- Gráfico 13.** Actividad antioxidante de extractos de Nebivolol, Trimetazidina y sus combinaciones frente al radical DPPH. $n=3$; $X \pm \text{ES}$. * $p < 0.05$ vs Quercetina..... 101
- Gráfico 14.** Actividad antioxidante de extractos de Nebivolol, Trimetazidina y sus combinaciones frente al radical ON. $n=3$; $X \pm \text{ES}$. * $p < 0.05$ vs Quercetina. 104
- Gráfico 15.** Actividad antioxidante de extractos de Nebivolol, Trimetazidina y sus combinaciones frente al radical ASO. $n=3$; $X \pm \text{ES}$. * $p < 0.05$ vs Quercetina..... 105

VII. Abreviaturas

IAM	Infarto agudo al miocardio
ECV	Enfermedad cardiovascular
NEB	Nebivolol
TMZ	Trimetazidina
CCR	Curva concentración respuesta
NA	Noradrenalina
ACh	Acetilcolina
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
ON	Óxido nítrico
ASO	Anión superóxido
I/R	Isquemia reperfusión
CTE	Cadena de transporte de electrones
ATP	Adenosín trifosfato
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EO	Estrés oxidativo
SOD	Superóxido dismutasa
GPx	Glutación peroxidasa
PTPm	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
IAMCEST	Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST
RNZ	Ranolazina
3-CAT	3 cetoacil tiolasa de cadena larga
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
AGL	Ácido graso libre

IC	Insuficiencia cardiaca
CMD	Cardiomiopatía diabética
Nox	NADPH oxidasa
CPRT3	Canal de potencial de receptor transitorio 3
NLRP3	Proteína 3 con dominio NOD, LRR y pirina
IL-1β	Interleucina 1- β
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido
ATC	Acido tricarbóxico
FosOx	Fosforilación oxidativa
AMPK	Cinasa de AMP
SIRT-1	Regulador de información silente 1
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
NPY	Neuropéptido Y
BBA	Bloqueante β -adrenergico
AR	adrenoreceptor
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
RVP	Resistencia vascular periférica
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
TV	Taquicardia ventricular
FV	Fibrilación ventricular
PDVI	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
Max dP/dt	Tasa de variación de presión durante la sístole
Min dP/dt	Tasa de variación de presión durante la diástole

VIII. Introducción

El infarto agudo de miocardio (Ferraro et al.) es una de las principales causas de muerte en la población adulta. Dado el grado de invasividad que representan los estudios en humanos, cuando se quieren determinar las propiedades benéficas de las terapias farmacológicas, los modelos experimentales en modelos animales representan una alternativa a la investigación clínica.

Los tratamientos farmacológicos importantes en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias incluyen una gama amplia de fármacos entre los cuales resaltan los β -bloqueantes. El nebivolol (Mahfoudh-Boussaid et al.) es β -bloqueante de última generación, con propiedades muy particulares como su efecto vasodilatador directo y actividad antioxidante. Existen otros fármacos potencialmente útiles durante la reperfusión y que podrían reducir las lesiones del IAM. La trimetazidina (TMZ) es un agente antiisquémico que normaliza los trastornos metabólicos en la isquemia.

Entre los modelos experimentales empleados están el modelo de isquemia-reperfusión en corazón aislado de rata. Utilizando el sistema Langendorff se obtuvieron los datos de actividad cardiaca a lo largo del experimento. En este modelo, el corazón se extrajo del animal y colocado en un sistema que permite su viabilidad a través de perfusión continua de una solución nutritiva debidamente oxigenada. La isquemia se indujo al someter al órgano a un periodo de 30 minutos de perfusión carente de oxígeno. Mantendremos diferentes grupos, entre ellos el grupo control, el cual se somete a 110 minutos de perfusión retrógrada y los grupos tratados. Finalizado el protocolo de I/R para cada uno de los grupos de tratamiento, los corazones se tiñeron para realizar estudios histológicos, que permitan determinar la zona de isquemia y el grado de infarto. Adicionalmente se realizan curvas concentración respuesta (CCR) a ambos fármacos para evaluar su capacidad vasodilatadora y se incubaron antes de realizar las CCR frente a Noradrenalina (NA) y Acetilcolina (ACh) para ver su interacción. Finalmente, se evaluó la capacidad atracadora de radicales libres frente a 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), óxido nítrico (ON) y anión superóxido (Mason et al.) que poseían los fármacos del estudio.

Al final de este trabajo se discuten los resultados obtenidos y se relacionan con diferentes mecanismos moleculares estudiados y publicados en la literatura científica.

IX. Objetivos

Objetivo General

Explorar si la combinación NEB-TMZ será más beneficiosa que la monoterapia en la prevención del daño cardíaco inducido por el proceso de isquemia-reperfusión en corazón aislado de ratas.

Objetivos específicos

1. Valorar la cardioprotección, a través de la determinación de parámetros electrofisiológicos en corazón perfundido con soluciones de NEB y/o TMZ.
2. Establecer la relación entre el tipo de tratamiento, perfusión única y combinada, y los cambios histológicos en el modelo experimental de isquemia cardíaca inducida I/R en ratas.
3. Evaluar las acciones vasculares única y combinada de los fármacos objetos de estudio, sobre la función endotelial en anillos de aorta.
4. Conocer si la combinación de NEB y TMZ potencia las acciones antioxidantes individuales descritas para el beta bloqueante.

X. Justificación

La justificación de esta investigación en base a la importancia que posee el estudio de enfermedades isquémicas como una de las principales causas de muerte en Panamá y la intervención farmacológica como área de interés médico-científico, quedando enmarcada en los siguientes puntos:

- La Contraloría General de la República, a través del Instituto Nacional de Estadística y Censo, en su publicación “Estadísticas Vitales, Volumen III-Defunciones”, con información concerniente a los hechos ocurridos en la República en el 2018, señala que las enfermedades isquémicas del corazón están, en las provincias de Panamá, Colón y Darién, como segunda causa de muerte; y tercera causa en Chiriquí y P. Oeste. <https://www.inec.gob.pa/archivos/P0705547520191205111401Cuadro%2012.pdf>
- Siendo las enfermedades isquémicas del corazón, una de las primeras causas de mortalidad en la población panameña, los estudios que avalen la eficacia de las terapias combinadas de fármacos de nueva generación, y presentes en el mercado nacional, podrían proporcionar evidencias científicas que favorezcan terapias más eficaces que ayuden a incrementar la supervivencia de los pacientes.
- La selección de los fármacos se basa en conocimientos previos que definen la capacidad que posee el NO para ejercer cardioprotección en modelos animales de lesión I/R. Siendo el NEB un fármaco que induce la liberación de NO y la TMZ un compuesto que previene el estrés mitocondrial, la asociación de estos agentes terapéuticos podría resultar en efectos potencialmente benéficos en la reducción de la mortalidad asociada al IAM.
- Aportaremos datos que podrían extrapolarse a la clínica del tratamiento del IAM. Los resultados podrían dar pie a una terapia combinada disminuya las morbilidades asociadas a las enfermedades isquémicas del corazón, lo que a su vez supondría un ahorro al estado, al disminuir las necesidades de los pacientes post infartados a los servicios de salud.

XI. Marco Teórico

1. Epidemiología del infarto

La enfermedad isquémica cardíaca se compone de un abanico variado de presentaciones clínicas que abarcan desde la angina estable, el síndrome coronario agudo hasta la isquemia miocárdica. La enfermedad isquémica cardíaca es la principal causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Un gran número de esta carga recae en países de ingresos bajos y medios, que representan casi 7 millones de muertes al año (Ralapanawa & Sivakanesan, 2021). En la región de América Latina, la enfermedad isquémica cardíaca se clasificó como una de las principales causas de mortalidad, representando el 35 % de todas las muertes (Lanas et al.). En general, se ha observado una tendencia a la disminución de la mortalidad por la enfermedad isquémica cardíaca en la mayoría de los países de América Latina, exceptuando a México y Panamá (Pagan et al.). En el año 2019, el Ministerio de Salud de la República de Panamá, publica los Indicadores Básicos de País en donde se documenta a las enfermedades isquémicas cardíacas como la segunda causa de defunciones en el país, con una tasa de mortalidad de 42.59/ 10 000 hab (Salud, 2019).

2. Fisiopatología del infarto

Las enfermedades isquémicas cardíacas se derivan a partir de la aterosclerosis hasta evolucionar a una oclusión de las arterias coronarias (Ross, 1999). El desarrollo de la placa aterogénica empieza por la elevada concentración plasmática de lipoproteínas de baja densidad, que son capaces de atravesar el endotelio y oxidarse (Ibanez et al., 2007). Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas tienen capacidad quimioatrayentes de macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar a éstas, convirtiéndose en células espumosas. La acumulación de células espumosas en la íntima de los vasos sanguíneos genera una lesión aterosclerótica. Esta lesión es capaz de atraer células musculares lisas, que empiezan la proliferación y producción de matriz extracelular (colágenos y proteoglicanos), resultando en el crecimiento y desarrollo de la placa aterosclerótica. (Malakar et al.). La lesión final que se forma es una lesión avanzada y complicada que consta de una cubierta

fibrosa con un núcleo rico en lípidos que contiene material necrótico, que puede ser muy trombogénico (Ross, 1999).

Como consecuencia de la formación de la placa aterosclerótica en la arteria coronaria, se produce una obstrucción del flujo sanguíneo que provoca un desajuste entre el suministro y la demanda de oxígeno miocárdico (Cassar et al., 2009 2009)

3. Lesión por isquemia reperfusión

El término lesión por isquemia reperfusión (I/R) empieza a tener vigencia en 1985, cuando Braunwald y Kloner llamaron la atención al señalar que "la reperfusión miocárdica puede considerarse un arma de doble filo" (Braunwald & Kloner, 1985). La lesión por I/R es un acontecimiento nocivo asociado a numerosas patologías, siendo el infarto de miocardio (IM) una de las más importantes (Kalogeris et al.). Para esta lesión se han descrito dos eventos consecutivos, capaces de desencadenar desequilibrios metabólicos que conducen a daño y muerte celular. El primer de los eventos, la lesión isquémica, ocurre por la interrupción de la perfusión tisular y el daño generado está determinado por la intensidad y la duración de la restricción del suministro de sangre (Cadenas, 2018). En esta fase, la hipoxia generada por la interrupción del flujo sanguíneo conduce a la disfunción de la cadena de transporte de electrones (CTE) en las mitocondrias, disminución de la producción de Adenosin trifosfato (ATP) mitocondrial, metabolismo anaeróbico y menor producción de agentes antioxidantes, en este orden (Meng Yu Wu et al., 2018).

En condiciones normales, el sustrato energético del corazón son los ácidos grasos libres, resultando en la fuente principal de producción de ATP en el miocardio (Kolwicz et al., 2013). Durante un evento isquémico, el desacoplamiento y disfunción de la producción mitocondrial de ATP favorece a la utilización de la glucólisis anaerobia como principal fuente de obtención de ATP. Esto conlleva a un aumento del piruvato que se desvía a la producción y acumulación de lactato e H^+ , generando una acidosis celular (Marzilli et al., 2019) (**Figura 1**). En consecuencia, el exceso H^+ activa el intercambiador Na^+-H^+ , lo que favorece la salida de los H^+ y

la entrada de Na^+ a la célula. La disfunción de la bomba $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ ATPasa, junto a la entrada constante de Na^+ , conlleva a una sobrecarga intracelular de Na^+ . En respuesta a esta sobrecarga de Na^+ se genera

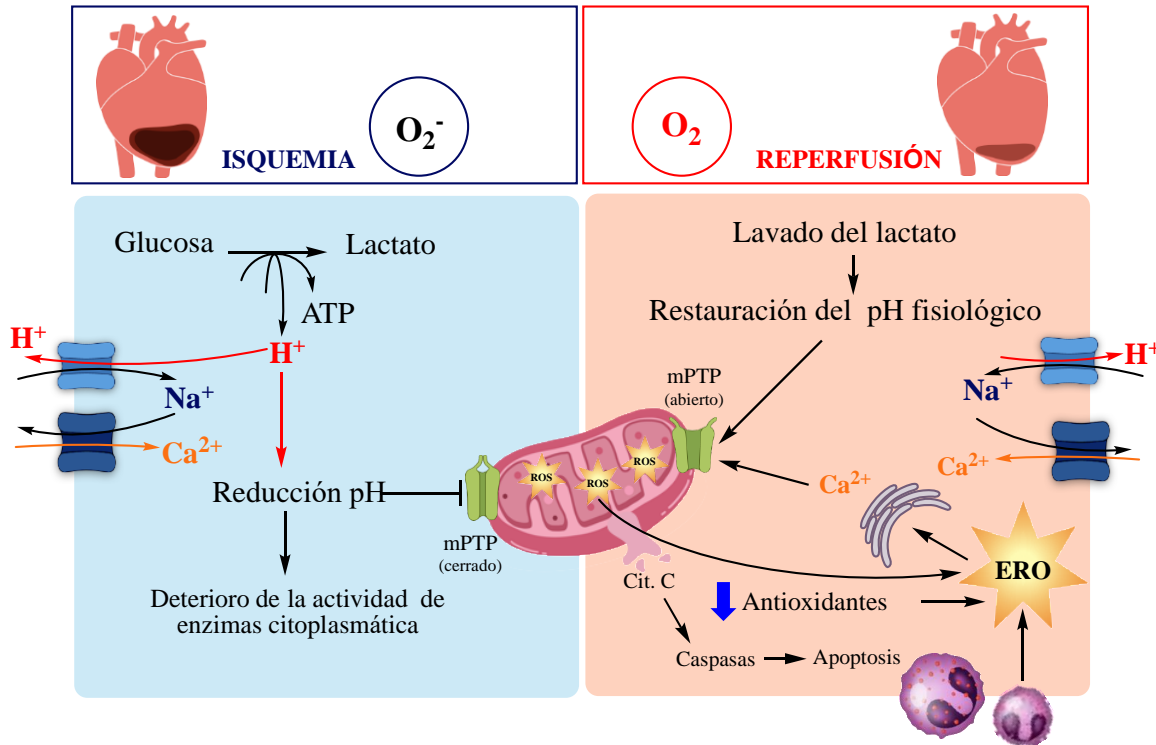


Figura 1. Esquema del mecanismo de daño miocárdico inducido por I/R.

La isquemia miocárdica aguda se caracteriza por un aumento del metabolismo anaeróbico. En este déficit energético, la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana celular y la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico se vuelven disfuncionales. El fallo en la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa conduce a la retención de sodio en el interior de las células, lo que a su vez promueve la disminución de la actividad de las bombas intercambiadoras de sodio-hidrógeno (bombas Na^+-H^+). Este acontecimiento conduce a la acumulación de hidrógeno que disminuye el pH y, en consecuencia, provoca un deterioro de la actividad enzimática intracelular. Con la reperfusión, se restablece el oxígeno tisular, lo que favorece un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno, que se combina con el déficit de antioxidantes celulares para inducir una lesión por reperfusión en el tejido isquémico. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) provocan respuestas inflamatorias locales que, en conjunto, conducen a la apoptosis debido al daño de las estructuras celulares

la activación inversa del intercambiador $2\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, que resulta la acumulación intracelular de Ca^{2+} a medida que la célula intenta extruir Na^+ (Hausenloy & Yellon). Las bombas Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico también se vuelven disfuncionales, lo que limita la recaptación de Ca^{2+} . Como resultado de estos mecanismos se produce una acumulación de H^+ , Na^+ y Ca^{2+} ; produciendo una hiperosmolaridad, lo que provoca el flujo de agua hacia el citoplasma, hinchazón y muerte celular (M. Y. Wu et al., 2018).

En el contexto de la lesión por I/R, los cambios descritos, producto de la hipoxia, se potencian por la reperfusión del tejido, donde la reoxigenación en la zona isquémica provoca que converjan mecanismos patológicos como el estrés oxidativo (EO) (Chazelas et al., 2021) disfunción mitocondrial (M. Yang et al., 2019) y respuestas inflamatorias deletéreas (Yan et al., 2020) (**Figura 1**). De los mecanismos señalados, el EO es uno de los más comúnmente asociado a la lesión por I/R, en el que prevalece un desequilibrio entre los sistemas enzimáticos normales de eliminación de oxidantes, como el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el glutatión peroxidasa (GPx), y la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Di Napoli et al., 2007; Raedschelders et al., 2012; Meng Yu Wu et al.). Durante la isquemia prolongada, los niveles de ATP y el pH intracelular disminuyen, por lo que una sobreproducción de ERO puede desencadenarse producto de acidosis y de las alteraciones iónicas que ocurren durante la hipoxia (Cadenas, 2018). En la fase de reperfusión, como consecuencia de un mayor aporte de oxígeno, también se describe un aumento de ERO (Xiang et al.).

Por otra parte, la acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma se exagera en el momento de la reperfusión miocárdica debido al deterioro de la membrana plasmática del retículo sarcoplásmico, producto del EO. Con la normalización del pH, esta

acumulación es capaz de generar una activación miofibrilar que conduce a una generación de fuerza excesiva e incontrolada, llamado de otra forma, una hipercontractura en los cardiomiocitos (Hausenloy & Yellon; Piper et al.). También se postula que, de manera más tardía, la activación de las proteasas inducida por el Ca^{2+} provoca alteraciones en las proteínas contráctiles, una disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} y un deterioro sostenido de la contractilidad a pesar del elevado Ca^{2+} citosólico (Buja, 2005).

Las mitocondrias desempeñan un papel importante en el desarrollo de la lesión por I/R, principalmente asociada con la apertura prolongada de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Di Lisa & Bernardi, 2006; Ong et al., 2015). Cabe señalar que, en condiciones fisiológicas, cuando los mPTP se abren de forma controlada y transitoria, desempeñan un papel importante en la regulación de la señalización de las especies reactivas de oxígeno y la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial. Sin embargo, cuando la apertura de los mPTP es prolongada y no regulada, se produce una despolarización del potencial de membrana mitocondrial, el cese de la síntesis de ATP, la liberación masiva de citocromo C y Ca^{2+} mitocondrial, lo que conduce a la inflamación y muerte mitocondrial (Kwong & Molckentin). Durante la reperfusión, los niveles excesivos de ERO, Ca^{2+} y fósforo inorgánico; el agotamiento de ATP y la normalización del pH celular son factores que favorecen a la apertura del mPTP (Ong et al.; Zorov et al.).

4. Tratamiento farmacológico de la isquemia miocárdica aguda

Aunque existen estrategias para minimizar la lesión isquémica miocárdica aguda en pacientes que presentan un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) o en pacientes sometidos a cirugía cardíaca, la "lesión por reperfusión miocárdica" y la muerte de cardiomiocitos, que paradójicamente se produce con la reperfusión aguda, sigue siendo un objetivo terapéutico desatendido en estos dos grupos de pacientes (Hausenloy & Yellon, 2016). Por tanto, las lesiones de la intervención son objeto de estudios pre-clínicos y nuevos abordajes terapéuticos se desarrollan con la finalidad de limitar el daño. En este contexto, la

identificación de los mecanismos moleculares relacionados al daño producido por la I/R, abre la posibilidad de encontrar fármacos que sean capaces de modular estos mecanismos, a la vez que puedan reducir la muerte de los cardiomiocitos y prevenir el desarrollo de la insuficiencia cardiaca (Gunata & Parlakpınar, 2021). El enfoque en nuestro estudio es estudiar fármacos que posean la capacidad para precondicionar el miocardio frente a la lesión por I/R.

Del abanico de fármacos que podrían ser de interés en este campo, la selección de Nebivolol y Trimetazidina se basó fundamentalmente en que ambos fármacos emplean diferentes vías de señalización para influir sobre el estrés oxidativo y la acumulación intracelular de Ca^{2+} ; siendo estos mecanismos potencialmente responsables de la lesión inducida por I/R.

5. Fármacos objeto de estudio y resultados experimentales relacionados

5.1. Trimetazidina y resultados de sus principales propiedades farmacológicas descritas a través de estudios pre-clínicos

5.1.1. Generalidades farmacológicas de la trimetazidina

A finales de la década de los 90 se empieza a reconocer la importancia de controlar los procesos isquémicos cardiacos a través de la modulación del metabolismo celular. El mayor desarrollo en la aplicación de la terapia metabólica se produjo con la aparición de trimetazidina (TMZ) y ranolazina (RNZ), ambos compuestos inhiben parcialmente la oxidación de los ácidos grasos del miocardio (Liu et al., 2016). El mecanismo de acción más reconocido para TMZ es la inhibición competitiva de la 3-cetoacil CoA tiolasa de cadena larga (3-KAT), que es la enzima que cataliza la etapa terminal de la β -oxidación de los ácidos grasos, provocando que el metabolismo energético se desplace hacia la oxidación de la glucosa para producir ATP (Kantor et al., 2000) (**Figura 2**). Los efectos de la TMZ sobre las tasas de β -oxidación de los ácidos grasos del miocardio descritos en modelos animales (Kantor et al., 2000; Lopaschuk et al., 2003) también se han observado en el corazón humano (Lionetti et al., 2011).

El efecto beneficioso de la TMZ como fármaco antianginoso se estableció antes de que se descubriera que el fármaco actúa a través de la inhibición parcial de la oxidación de los ácidos grasos del miocardio. Los primeros estudios preclínicos demostraron que era citoprotectora en varios modelos de isquemia miocárdica y reperfusión (Guarini et al., 2018). Actualmente, la TMZ es un fármaco antianginoso de segunda línea, aunque en estudio clínicos, se ha demostrado su eficacia en pacientes diabéticos con síntomas de infarto, pacientes con insuficiencia cardíaca y en pacientes que fueron sometidos a revascularización (Marzilli et al.; McCarthy et al.).

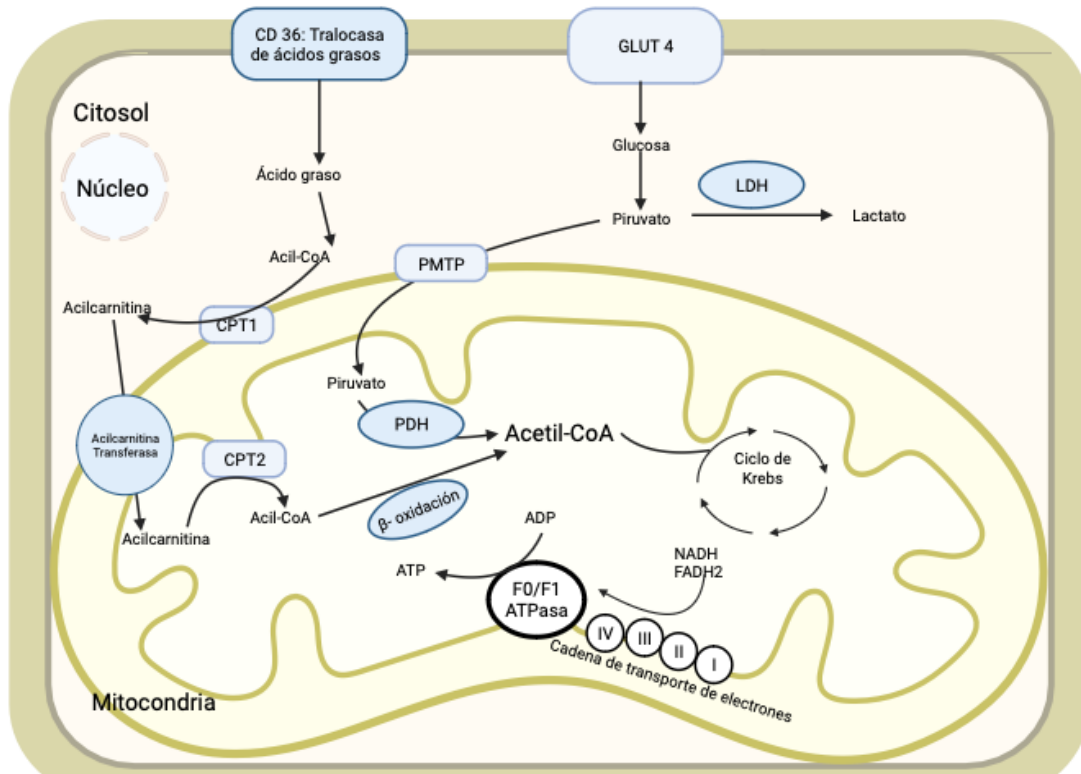


Figura 2. Mecanismo de acción propuesto para la trimetazidina (TMZ) en el metabolismo y la protección miocárdica.

La administración de TMZ induce la inhibición parcial de la β -oxidación de los ácidos grasos y aumenta la piruvato deshidrogenasa y determina el aumento de la oxidación de la glucosa, energéticamente útil en las condiciones isquémicas del miocardio.

LDH = Lactato deshidrogenasa; CPT = carnitina palmitoiltransferasa; MPC = Proteína Mitocondrial Transportadora de Piruvato.

En esta línea, nos propusimos realizar una revisión de los efectos demostrados para la TMZ en modelos experimentales, que se desarrollaron con el ánimo de valorar el potencial terapéutico del fármaco sobre varias patologías, incluyendo otras enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal y perfil antidiabético. Por otra parte, incluimos la revisión de las acciones antioxidantes descritas para TMZ, así como las rutas de señalización postulada para sus acciones.

5.1.2. Propiedades antioxidantes de la trimetazidina

El efecto protector de la TMZ sobre la injuria producida por el EO ha sido demostrado en ambientes experimentales diversos, siendo los procesos isquémicos el blanco principal de los estudios para la TMZ. Durante la isquemia cardiaca severa, donde predomina la oxidación de ácidos grasos, se produce un exceso de NADH, lo que puede romper el equilibrio redox entre nicotinamida adenina dinucleótida reducida (NADH) y nicotinamida adenina dinucleótida oxidada (NAD⁺), y eventualmente puede conducir a un EO. Estos mecanismos sugieren que la inhibición de la 3-KAT, y subsecuente reducción de la oxidación de ácidos grasos producida por TMZ, disminuye la relación mitocondrial NADH/NAD⁺ (Liu et al., 2016), lo que en parte explica las propiedades antioxidantes descritas para el fármaco (Wang et al., 2021; Zheng et al., 2018).

El exceso de succinato generado por los cambios en el metabolismo mitocondrial y que ocurren durante el proceso de I/R, es la principal fuente de electrones que se escapan de la cadena respiratoria y reaccionan con el oxígeno, dando origen a la formación incontrolada de ERO (Andrienko et al., 2017). En un modelo experimental de retorno de la circulación espontánea, se demostró que el pretratamiento con TMZ indujo una reducción del succinato superfluo relacionado con ERO mitocondriales y atenuó el EO en el corazón. Estos efectos se asociaron con una inhibición de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos libres (OAGL) inducida por el tratamiento con TMZ (Wang et al., 2021). Aunque los hallazgos preclínicos de la TMZ están más dirigidos al tratamiento de la miocardiopatía isquémica, los resultados obtenidos abren un nuevo abanico de oportunidades terapéuticas para este fármaco. Al igual que fuera descrita para el proceso de isquemia/reperfusión, en la insuficiencia

cardiaca (IC) la mayor parte de las ERO generadas por la CTE mitocondrial proceden de una mayor fuga de electrones mediada por el complejo II mitocondrial. Así, los efectos de TMZ y sus propiedades antioxidantes han sido extrapolados a la IC-no isquémica, donde el modulador del metabolismo proporcionó protección contra la apertura del mPTP, un efecto que fue asociado a la atenuación de la generación de ERO y no a la inhibición de la 3-KAT (Dedkova et al., 2013). La cardiomiopatía diabética (CMD) se define por la existencia de una estructura y un rendimiento miocárdico anormales en individuos con diabetes mellitus y en ausencia de otros factores de riesgo cardíaco (Jia et al., 2018). Un cambio en el estado metabólico, aumento de la inflamación y del EO, son elementos de la fisiopatología de la enfermedad (Borghetti et al., 2018). En modelos de ratas diabéticas se ha demostrado que la TMZ podría utilizarse para prevenir y tratar la DMC (Ovide-Bordeaux et al., 2005; Zhang et al., 2016) y el efecto beneficioso del fármaco parece estar asociado a la inhibición de NADPH oxidasa 2 (Nox2) (Tang et al., 2019), enzima relacionada con estrés oxidativo e inducción de fibrosis en corazones diabéticos (Liu & Zhang, 2015). Al igual que la Nox2, el canal de potencial receptor transitorio 3 (CPRT3) desempeña un papel fundamental en el remodelado cardíaco. Los efectos antioxidantes y antiinflamatorios producidos por TMZ en modelos de ratas con DMC también se han asociado con la inhibición de CPRT3 (Tang et al., 2019).

El estrés oxidativo es también uno de los elementos más comúnmente asociados con la patogénesis de la aterosclerosis. La TMZ y su rol en el equilibrio redox fue el objetivo de un estudio, en el que la administración del modulador metabólico fue capaz de suprimir la progresión de la aterosclerosis en ratas y reducir la formación de células espumosas, sin afectar a los niveles de lípidos plasmáticos (Zheng et al., 2018). Hallazgos similares han sido reportados con la administración de TMZ en ratones LDL-R-/-, donde el fármaco redujo el crecimiento de la placa aterosclerótica (Hohensinner et al., 2021). Un aspecto novedoso en la comprensión de la enfermedad aterosclerótica es la relación existente entre la OAGL y la secreción de interleucinas inflamatorias. La relación establecida pasa por la interacción que existe entre la AGL y el sistema de la proteína 3 que contiene dominios NOD, LRR

y pirina (NLRP3), el cual es requerido para la activación del inflammasoma y secreción de interleucina 1 β (IL-1 β) en los macrófagos proinflamatorios (Grebe et al., 2018). En macrófagos derivados de monocitos humanos, la activación del sistema NLRP3 y la secreción de IL-1 β disminuyeron significativamente tras la inhibición de la OAGL inducida con TMZ (Hohensinner et al., 2021). Este estudio también estableció que existe una relación entre la inhibición de la OAGL y la reducción de la IL-1 β circulante y escindida en la lesión aterosclerótica en ratones LDL-R^{-/-} (Hohensinner et al., 2021).

Podríamos decir que en la ECV, tanto la cardiopatía isquémica como la no isquémica, así como en los daños cardiacos y vasculares inducidos por la diabetes y aterosclerosis, el EO y la inflamación son elementos comunes y, en consecuencia, de los hallazgos descritos, la TMZ surge como un enfoque terapéutico novedoso en el manejo de estas patologías.

5.1.3. Mecanismos cardioprotectores de la trimetazidina en modelos de isquemia

En condiciones normales, el sustrato energético del corazón son los ácidos grasos libres, resultando en la fuente principal de producción de ATP en el miocardio. (Kolwicz et al., 2013). El ácido graso antes de empezar la β -oxidación, debe convertirse a acil-CoA que es transportado dentro de la mitocondria mediante la carnitina. La molécula de acil-CoA, por medio de la β -oxidación, es un generador de acetil-CoA; que entra al ciclo de Krebs donde se producen el NADH y flavina adenina dinucleótido (FADH₂) que se dirigen a la cadena de transporte de electrones (**Figura 3**) (Honka et al., 2021). El mecanismo de acción descrito para la TMZ la convierte en una molécula de interés farmacológico, por lo que diversos autores han realizado estudios experimentales para evidenciar las acciones cardioprotectores del regulador del metabolismo. En primera instancia, en ratones con ligadura de las arterias coronarias, la TMZ ha demostrado eficacia para disminuir la insuficiencia cardiaca al mejorar la función mitocondrial y la utilización de la glucosa (Shu et al., 2021); así como capacidad para reducir la apoptosis miocárdica y mejorar el metabolismo cardiaco (Luo et al., 2021). Adicionalmente, se

reporta que la TMZ aumenta la supervivencia celular en cardiomiocitos de ratas neonatales, mediante la inhibición de la apoptosis y el fomento de la autofagia (Zhong et al., 2017). Estos efectos se han explicado a partir de la activación de la vía cinasa de AMP (AMPK) – regulador de información silente 1 (SIRT1) mediada por TMZ (Luo et al., 2021; Shu et al., 2021).

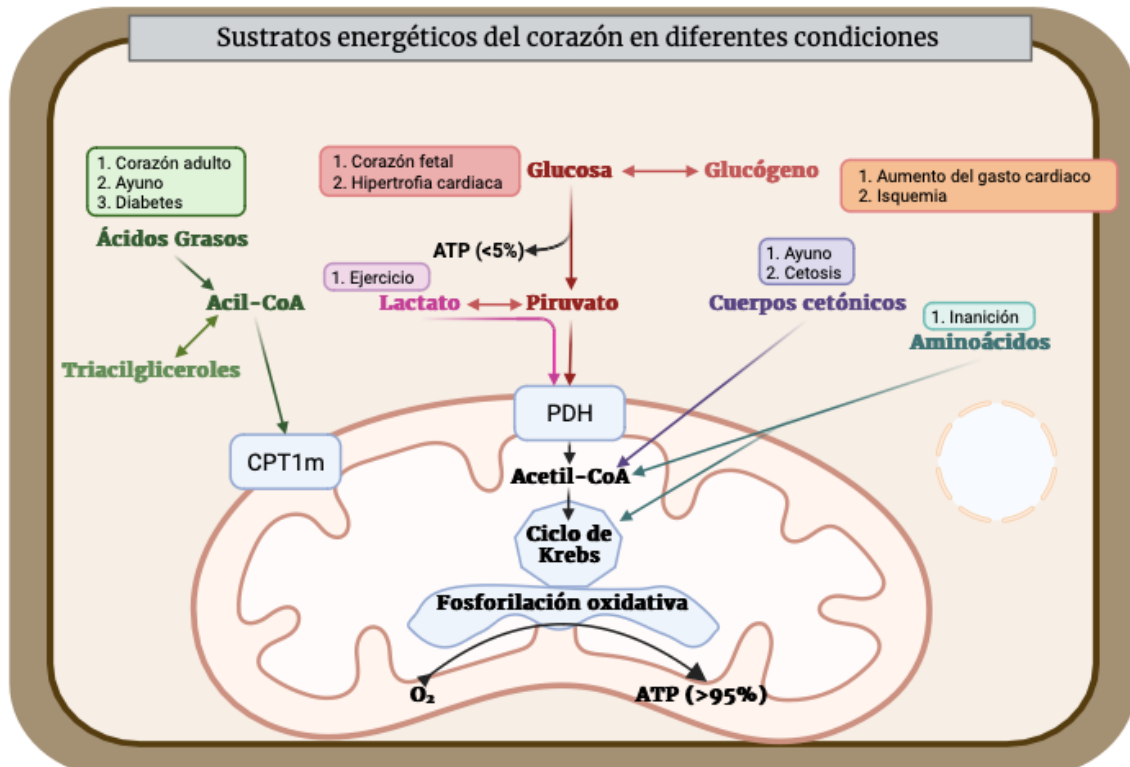


Figura 3. Sustratos energéticos del corazón

Los sustratos que producen energía (ácidos grasos, glucosa, cetonas y aminoácidos), a través de vías catabólicas específicas, convergen en la producción de acetil CoA con la posterior entrada en el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC). El paso final de la transferencia de energía se logra a través de la fosforilación oxidativa (FosOx), que suministra más del 95 % del ATP consumido por el corazón. Los cuadros por encima de cada vía metabólica indican la condición patológica y/o

fisiológica en la que el sustrato específico se convierte en un contribuyente predominante al metabolismo. TAG, triacilglicerol; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; ATGL, lipasa de triglicéridos adiposos; mCPT1, forma muscular de la carnitina palmitoil transferasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; TCA, ácido tricarbóxico; O₂, oxígeno.

En la comprensión de los efectos cardioprotectores de TMZ, adicional a las acciones descritas sobre AMPK y SIRT1, se han propuesto otros mecanismos moleculares. Por una parte, se demostró que la regulación metabólica que ejerce TMZ induce una reducción de la lesión cardíaca en ratones con ligadura de la arteria coronaria izquierda, un efecto que fue vinculado con la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en específico, la vía de las ERK1/2 (Liu et al., 2016). Previo a este estudio, los efectos cardioprotectores de TMZ no se relacionaron con el resto de las vías MAPK, siendo que en corazones aislados de ratas sometidos a isquemia-reperfusión, aunque el fármaco ejerce efecto protector, no modificó la vía de la p38 ni de la JNK, ambas MAPK (Pantos et al., 2005).

Adicional a la utilización de lesión cardíaca inducida por ligadura coronaria, otros autores han empleado modelos de sobrecarga cardíaca por compresión aórtica abdominal (Chen et al., 2016) o modelos de fibrosis cardíaca para valorar la eficacia cardioprotectora de la TMZ (Chen et al., 2022). En sus resultados, el pretratamiento con TMZ demostró reversión parcial de los cambios metabólicos inducidos por sobrecarga de presión, en lo que los autores describen como un efecto mediado por la regulación de los niveles séricos de neuropéptido Y (NPY) y la expresión de los receptores de esta molécula, (Chen et al., 2016). En la fibrosis cardíaca inducida por isoproterenol en ratas, TMZ redujo la fibrosis cardíaca mediante la reducción de la vía NOX/NF- κ B/Snail (Chen et al., 2022).

Finalmente, la TMZ ha demostrado efecto protector frente a la cardiotoxicidad inducida por diferentes agentes quimioterapéuticos. Zhao et al. (2019) estudió la acción combinada de la TMZ y la Coenzima Q10 en cardiomiocitos aislados de

corazones de ratas expuestos a cisplatino. Su conclusión fue que la administración conjunta de TMZ y Coenzima Q10 suprimieron significativamente la cardiotoxicidad inducida por el cisplatino (Zhao, 2019). En otro estudio en donde se evaluó el efecto de la TMZ sobre la toxicidad cardíaca inducida por sunitinib en ratones 129S1/SvlmJ, se demostró la capacidad del fármaco para revertir la hipertensión y la disfunción ventricular izquierda causada por el sunitinib (Y. Yang et al., 2019).

5.2. Nebivolol y sus propiedades cardiovasculares y antioxidantes descritas en estudios pre-clínicos

5.2.1. Generalidades farmacológicas del Nebivolol

El propranolol fue el primer bloqueante β -adrenérgico (BBA) que se introdujo en la clínica en 1964, y desde entonces han llegado al mercado otros BBA. Los BBA más antiguos o conocidos como de primera generación, se caracterizan por su antagonismo no selectivo, presentando afinidad frente a los adrenoreceptores (AR) tanto β 1-AR como β 2-AR (Wong et al., 2016). Una de las grandes limitaciones que presenta este primer grupo de BBA es que la interacción con el β 2-AR puede causar efectos secundarios graves relacionados con los β 2-AR, como broncoespasmos, que es una afección potencialmente letal para los pacientes con asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Un potencial aumento de la resistencia vascular periférica (RVP) también se puede originar debido al antagonismo de los β 2-AR en la vasculatura periférica. Producto de estas interacciones y efectos adversos relacionados, se trabajó en el desarrollo de fármacos altamente selectivos para los β 1-AR (segunda generación) y se avanzó hasta la tercera y más reciente generación de BBA que incluye compuestos como el carvedilol y el nebivolol (Mahfoudh-Boussaid et al.) (Mahfoudh-Boussaid et al.), que pueden diferir en cardioselectividad pero que poseen capacidades cardiovasculares adicionales; en la mayoría de los casos, caracterizado por ejercer un efecto vasodilatador directo. El NEB es un bloqueante selectivo de β 1-AR, catalogado como un β bloqueante de acción prolongada. Este fármaco existe en forma de mezcla racémica (enantiómero L y D), donde el D-nebivolol presenta mayor afinidad por los receptores β 1-AR por

lo que se le considera como el principal responsable de los efectos cardíacos (Olawi et al.). Por otra parte, el L-nebivolol media principalmente, la liberación de (óxido nítrico) ON derivado del endotelio (Wehland et al.). Además, se demostró que el NEB induce la lipólisis y promueve los genes termogénicos y mitocondriales a través de los β 3-AR (Bordicchia et al.). También reduce el EO mediante la activación de la NOS endotelial (NOSe) aumentando la biodisponibilidad del ON. (Khan et al., 2013) Su principal indicación es para la hipertensión arterial, aunque en estudios preclínicos se ha demostrado su eficacia en patologías como el infarto agudo de miocardio (Zhang et al.) y la insuficiencia cardíaca (Lipsic & van Veldhuisen, 2010).

5.2.2. Propiedades antioxidantes del Nebivolol

Las ERO y las especies reactivas del nitrógeno (ERN) desempeñan un papel clave en la regulación de la señalización fisiológica y patológica dentro de la vasculatura. En condiciones fisiológicas, un delicado equilibrio entre oxidantes y antioxidantes protege a las células de los efectos perjudiciales de las ERO/ERN. De hecho, el desequilibrio entre la producción de ERO/ERN y los mecanismos de defensa antioxidantes conduce al EO y nitrosativo dentro de la célula (Sorriento et al., 2018). Estos procesos promueven el daño vascular observado en afecciones cardiovasculares.

Hasta la fecha, se han descubierto varias moléculas que son fármacos antihipertensivos eficaces con propiedades antioxidantes. En efecto, el NEB es uno de los BBA capaz de reducir el EO. A nivel molecular, el propio efecto BBA es importante para reducir la producción de ERO mediante el bloqueo de las catecolaminas, que se sabe, inducen EO en el miocardio (Türck et al., 2022) (**Figura 4**). Además, el NEB posee efectos antioxidantes directos y es capaz de generar un aumento de los niveles de ON, la actividad de la NOS y la expresión de la NOSe, así como también su capacidad para reducir la producción de ERO y la expresión de Nox (Z. Wang et al., 2017). Adicionalmente, en un estudio experimental se demostró que el NEB inhibe la actividad de la Nox, lo que se relacionó con la capacidad de este fármaco para mejorar la disfunción endotelial a través de un mecanismo antioxidante independiente de la actividad de bloqueo del β 1-AR

(Mason et al., 2006) y se postula que este efecto puede reducir una de las principales fuentes de EO en la hipertensión (Viridis et al., 2011).

Son diversos los modelos experimentales y esquemas de tratamiento en los que NEB ha demostrado sus efectos positivos sobre la regulación del EO. En este contexto, resumimos hallazgos de interés en el **Tabla 1**. La descripción preclínica del NEB lo convierte en un fármaco antihipertensivo prometedor y demuestra fuertes propiedades antioxidantes debido a su capacidad para liberar ON. Además de reducir la presión arterial, ha demostrado eficacia para prevenir los daños orgánicos.

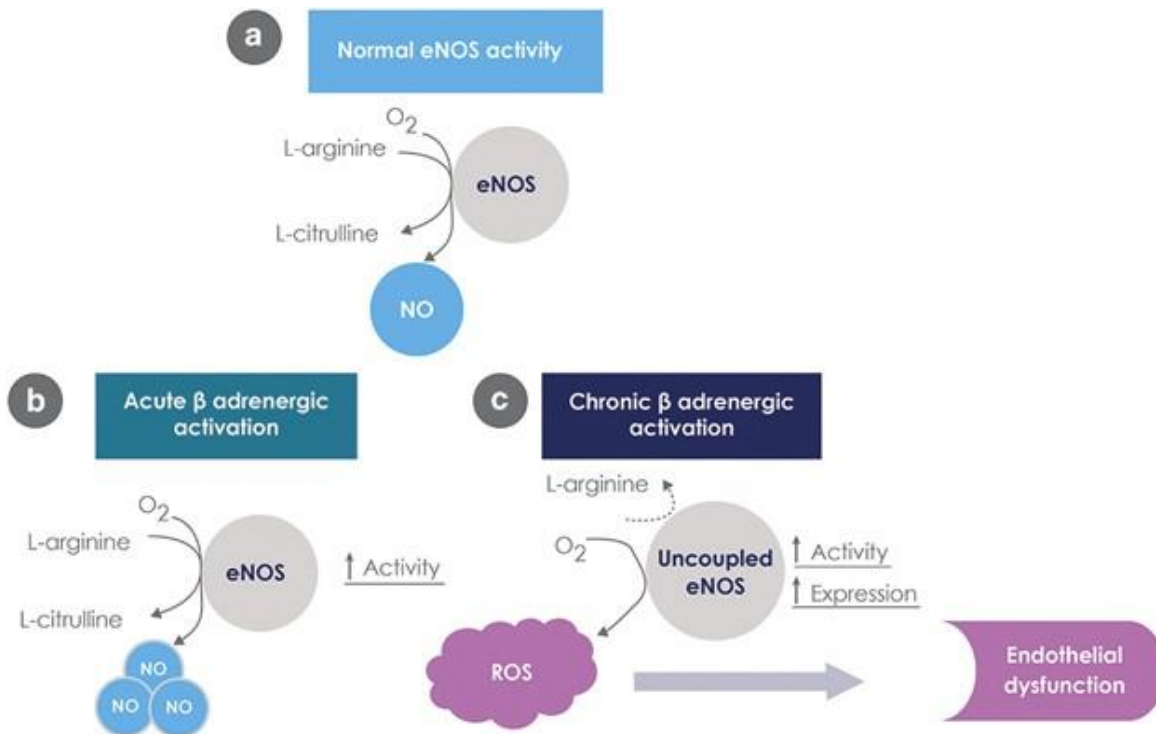


Figura 4. Efectos protectores del nebivolol frente al estrés oxidativo para prevenir el daño de órganos diana relacionado con la hipertensión.

Actividad, expresión y desacoplamiento de la eNOS en (a) condiciones normales, (b) activación β -adrenérgica aguda y (c) activación β -adrenérgica crónica.

NOSe, óxido nítrico sintasa endotelial; *ON*, óxido nítrico; *ERO*, especies reactivas del oxígeno.

Tabla 1. Eficacia antioxidante demostrada para Nebivolol en modelos experimentales relacionados con enfermedad cardiovascular.

Título resumido	Metodología / Hallazgos de interés
Nebivolol y la regulación de Nox2/NADPH oxidasa en toxicidad cardiaca inducida por etanol (do Vale et al., 2021)	NEB 10 mg/kg/día p.o. durante 3 semanas. ----- NEB previno el aumento (superóxido) O_2^- y TBARS en el ventrículo izquierdo de ratas tratadas con etanol.
Nebivolol previene EO vascular y la HTA en ratas tratadas con etanol (do Vale et al., 2018)	NEB 10 mg/kg/día p.o. durante 3 semanas. ----- La disminución de los niveles aórticos de nitrato/nitrito (NOx) inducida por el etanol fue prevenida por NEB
Efectos antitrombóticos del NEB implican β 2-AR y las vías COX-2/PGI ₂ (Kozlovski et al., 2015)	1.Ratas anestesiadas con circulación extracorpórea perfundidas con tiras de colágeno. 2.Vasodilatación en corazones aislados de cobaya perfundidos. ----- NEB indujo efecto antitrombótico sostenido y dosis dependiente. Indujo vasodilatación dependiente del NO e independiente de β 2-AR.
Nebivolol alivia el remodelado aórtico mediante la regulación de la eNOS y la inhibición del EO en modelo de HTA (Y. Wang et al., 2017)	Ratas tratadas con L-NAME (60 mg/kg/día), solo o en combinación con NEB (8 mg/kg/día) p.o. durante 8 semanas. ----- NEB produjo aumento de los niveles de NO, de la actividad de la NOS y de la expresión de eNOS, p-eNOS, Akt y p-Akt, así como de una reducción de la generación de ERO y de la expresión de Nox2, Nox4 y p22phox.
Nebivolol mejoró el daño renal en ratas diabéticas mediante la regulación de la vía del estrés oxidativo/NO (Guan et al., 2020)	Ratas ZDF tratadas oralmente con NEB (10 mg/kg) durante 6 meses. ----- NEB incrementó el NO plasmático y renal, aumentó las expresiones de eNOS, p-eNOS y NOS neuronal, y suprimió el desacoplamiento de eNOS y la expresión de NOS inducible.
Efectos del nebivolol mediados por el NO en el infarto de miocardio: la fuente del óxido nítrico (Sorriento et al., 2018)	I/R en ratas tratadas con NEB (0.1 mg/kg) I.V. ----- Los daños oxidativos (caracterizados por la disminución de los niveles de MDA y el aumento de los niveles de SOD) y nitrosativos (caracterizados por la disminución de los niveles de ONOO-) fueron limitados en los grupos con NEB.
Akt = Proteína cinasa B; O_2^- = Anión superóxido; HTA = hipertensión arterial; NOSe = Óxido nítrico sintetasa endotelial; ON = Óxido nítrico; Nox= NADPH oxidasa; p-Akt = Akt fosforilada en Ser473; p-eNOS = eNOS fosforilada en Ser1177; TBARS= Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	

5.2.3. Efectos cardioprotectores del Nebivolol demostrados en modelos experimentales

Son múltiples los estudios que sustentan como objetivo demostrar el efecto cardioprotector del NEB en modelos experimentales de ECV (Cheema et al., 2011; Toblli et al., 2012; Zhang et al., 2014). En primera instancia, la actividad simpática desempeña un papel importante en la modulación del ritmo cardiaco y por esta razón, los BBA han sido objeto de estudios para valorar su eficacia como antiarrítmico (Grandi & Ripplinger, 2019). Uno de los estudios que tuvo como objeto la evaluación del efecto antiarrítmico del NEB, evaluó el fármaco en arritmias inducidas por reperfusión tras ligadura de la arteria coronaria en ratas (Lu et al., 1994). En este estudio, el BBA de tercera generación redujo la incidencia de taquicardia ventricular (TV) y disminuyó la de fibrilación ventricular (FV). En el mismo estudio, los autores emplearon corazones de cobaya estimulados eléctricamente y el resultado obtenido con la administración de NEB fue una reducción del umbral de FV, así como una protección frente a las arritmias inducidas por ouabaína y aconitina (Lu, 1994).

El objetivo de emplear NEB como agente cardioprotector se basa, no solo en su capacidad para bloquear los estímulos cardíacos que resultan de la activación de los β 1-AR; sino que también consideran las acciones vasodilatadoras descritas para el fármaco (Kamp et al., 2010) (Figura 5). En esta línea, la disfunción endotelial es un estado patológico sistémico del endotelio caracterizado por una reducción de la biodisponibilidad de los vasodilatadores, esencialmente el ON. Uno de los factores clave de la disfunción endotelial es la sobreproducción de ERO, por lo que el NEB, para el cual ya hemos descrito sus propiedades antioxidantes, es un agente terapéutico que modifica esta condición de interés clínico. Así se observa que algunos autores vinculan la actividad cardioprotectora del BBA con su capacidad para mejorar la función endotelial (Toblli et al., 2012).

De forma concreta, el efecto cardioprotector del NEB ha sido descrito en el modelo de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, fármacos de uso habitual en el tratamiento antineoplásico. En un estudio llevado a cabo por de Nigris y col.(2008), (de Nigris et al.) se evaluó toxicidad cardíaca de las antraciclinas mediante la

determinación de la presión ventricular izquierda desarrollada bajo una presión de perfusión constante,

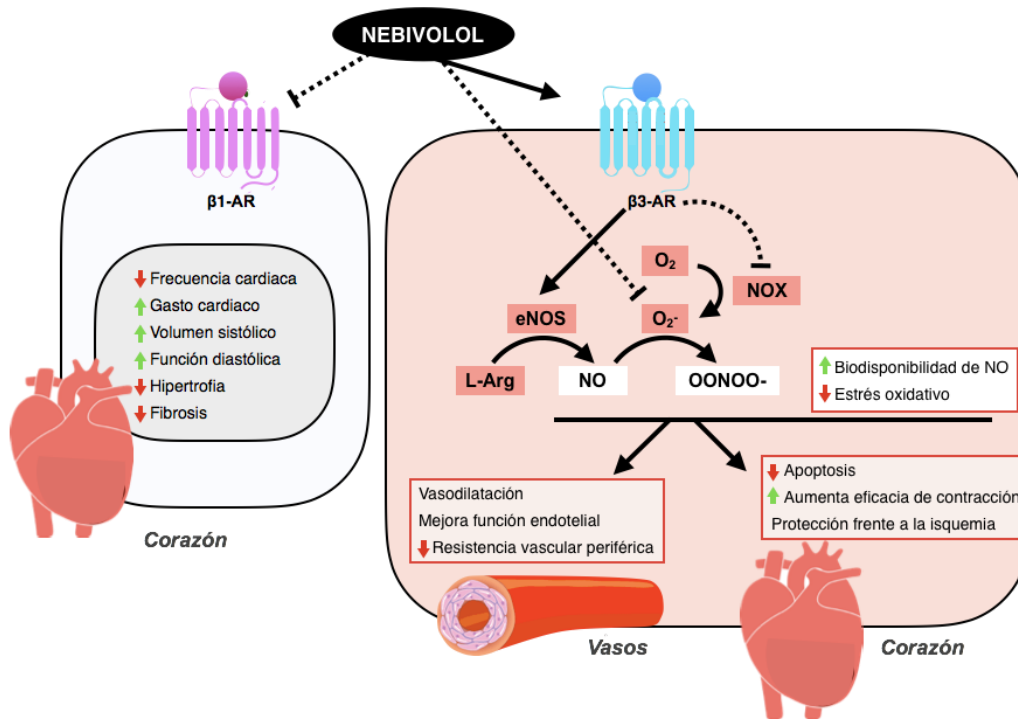


Figura 5. Mecanismos de acción del nebivolol en el sistema cardiovascular.

El antagonismo de los receptores β 1-adrenérgicos cardíacos por nebivolol mantiene o mejora la función ventricular izquierda en sujetos sanos y en pacientes con hipertensión al disminuir la frecuencia cardíaca, aumentar el gasto cardíaco y el volumen sistólico. Además, el nebivolol protege la salud reduciendo el estrés oxidativo y aumentando la biodisponibilidad de óxido nítrico mediante la eliminación de O_2^- no dependiente de receptores y la inhibición de la NADPH oxidasa y la desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial dependiente de receptores β 3-adrenérgicos. En la vasculatura, el nebivolol actúa a través de los receptores β 3-adrenérgicos para aumentar la biodisponibilidad del óxido nítrico y ejerce un efecto barredor directo, lo que conduce a la vasodilatación y a una mejora de la función endotelial.

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; NOX, NADPH oxidasa; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; NO, óxido nítrico.

la tasa de variación de este parámetro durante la sístole (contractilidad) (Max dP/dt) y durante la diástole (relajación) (Min dP/dt); demostrando que la combinación con NEB reduce la toxicidad cardíaca; a la par que el fármaco aumenta los niveles de glutatión peroxidasa y la liberación de nitrito/nitrato, cambios que podrían explicar su efecto cardioprotector (de Nigris et al., 2008). En otro estudio donde se empleó el modelo de IAM de rata, relacionó las acciones de NEB sobre la biodisponibilidad de ON con la capacidad del BBA para reducir la apoptosis cardíaca (Mercanoglu et al., 2008).

6. Modelo experimental de corazón perfundido de Langendorff

6.1. Generalidades del modelo de corazón perfundido de Langendorff

Podemos denominar al método de Langendorff de corazón aislado, como la perfusión de las arterias coronarias de un corazón por una solución nutritiva y oxigenada que fluye retrógradamente desde la aorta (Langendorff). Este método fue establecido en 1897 por Oscar Langendorff y sus experimentos se llevaron a cabo principalmente utilizando corazones de gatos, pero también de perros y conejos (Zimmer, 2000). Con el tiempo el método de Langendorff de corazón aislado se ha convertido en el modelo estándar para la enseñanza y la investigación cardiovascular básica, realizando aportes sobre temas como la regulación de la función cardíaca, flujo coronario y el metabolismo cardíaco (Skrzypiec-Spring et al., 2007).

El principio de este modelo consiste en la canulación, a un aparato de perfusión, de un corazón aislado de un animal, pudiendo ser de ratón, rata, cobayo, conejo, perro o cerdo. El sistema de perfusión permanece conectado a un bomba que perfunde la solución nutritiva, burbujeada continuamente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), desde un reservorio y a través de tubos termostatizados a 37 ° C, hasta el tejido aislado (Langendorff).

6.2. Descripción de la técnica

6.3. técnica

6.4. Parámetros obtenidos a partir del corazón perfundido

Este modelo experimental permite la medición de la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo mediante la inserción de un balón de látex dentro del ventrículo. Diversos datos funcionales contráctiles, como la frecuencia cardíaca, la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) , la presión al final de la diástole

(PFD) y derivados como el Max dP/dT y Min dP/dT. Además, puede ser valorado ajustando, el volumen del balón, el estiramiento ventricular y establecerse curvas de Frank-Starling, que pueden ser especialmente valiosas en muchos experimentos funcionales (Bell et al., 2011). La medida típica de la función cardiaca es la PDVI, esta se obtiene restando la PFD de la presión sistólica. Esta medida puede variar en función de la cepa del ratón o rata. La frecuencia cardiaca se obtiene a partir de las mediciones cíclicas de las ondas de presión del VI, mediante el programa de registro y adquisición de datos (LabChart V.8). Además, los derivados de contractilidad como el Max dP/dT y Min dP/dT se estiman utilizando la primera derivada de la onda de presión del VI (Kolwicz & Tian, 2010). El método de Langendorff de corazón aislado es muy adecuado para estudiar las intervenciones farmacológicas sobre la función miocárdica, la conducción eléctrica, la reactividad vascular, la función endotelial y del músculo liso coronario (Liao et al.). Una de las principales áreas de investigación de este modelo se enfoca en la protección frente a la muerte celular inducida por los daños relacionados a la I/R. Una muestra de estos estudios publicados en el último año, se resumen en la **Tabla 2**, en el que además se identifican las principales determinaciones realizadas y que hacen de este modelo una técnica con aplicación biomédica integral.

Tabla 2. Investigaciones del último año que utiliza el modelo de Langendorff en estudios de isquemia reperfusión	
Titulo resumido	Determinaciones realizadas
Diminazene Aceturate promotes cardioprotection (Coutinho et al., 2022)	Niveles de ATP y función mitocondrial.
Cardiac Protection of a Novel Lupane-Type Triterpenoid (Guo et al., 2022)	Parámetros hemodinámicos: PDVI, frecuencia cardiaca, Max dP/dt. Niveles de CK, LDH, SOD, MDA y GSH-Px
Urocortin I Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury (Liu et al., 2022)	Parámetros hemodinámicos: PDVI, frecuencia cardiaca, Max dP/dt. Estado respiratorio mitocondrial, actividad enzimática respiratorio mitocondrial y nivel de cardiolipina mitocondrial
Oxytocin ameliorates high glucose and ischemia/reperfusion injury (Yao et al.)	Parámetros hemodinámicos: PDVI, área de infarto Consumo de oxígeno mitocondrial
Teriflunomide treatment exacerbates cardiac ischemia reperfusion injury (Alexander et al.)	Parámetros hemodinámicos: PDVI, flujo coronario y ECG área de infarto
TRPV1 Contributes to Modulate the Nitric Oxide Pathway during Ischemia and Reperfusion(Castrejón-Téllez et al.)	Expresión de eNOS, iNOS y pNOS por Western blot Niveles de NO, BH4, cGMP, entre otros Cambios estructurales por histología

6.5. Ventajas y desventajas del modelo de corazón perfundido de Langendorff

El modelo Langendorff de corazón aislado es un método conveniente para la evaluación de los mecanismos involucrados en el daño miocárdico y la cardioprotección. La reproducibilidad y su alto rendimiento caracterizan a este modelo. Es capaz de conjugarse con otras técnicas de investigación, como la resonancia magnética nuclear, para complementar los datos obtenidos durante el montaje. Es un excelente método para el tamizado de fármacos, ya que los resultados son independientes de los factores neuroendocrinos y los presentes en la circulación sistémica. Sin embargo, el modelo presenta ciertas complejidades como la necesidad de habilidad y delicadeza en la manipulación del corazón, debido a su vulnerabilidad. Adicionalmente, durante el experimento puede presentarse un flujo coronario excesivo y edema tisular, lo que hace necesario la estandarización de la velocidad de perfusión. Durante su realización se deben controlar cuidadosamente las condiciones experimentales (Disponibilidad de oxígeno y nutrientes, temperatura y presión de perfusión) (Skrzypiec-Spring et al., 2007).

6.6. Corazón perfundido como modelo traslacional del IM y de la lesión por isquemia reperusión.

Los modelos experimentales de corazón aislado son un modelo confiable y reproducible para explicar los mecanismos relacionados al daño inducido por I/R y de la cardioprotección (Lindsey et al., 2018). De ahí que, a partir de estudios en corazón aislado, como el modelo Langendorff; se haya desarrollado la base para el ejecución de estudios clínicos dirigidos a reducir el tamaño del infarto en pacientes después de sufrir un IAM. El Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (NHLBI, siglas en inglés) recomienda que en los estudios preclínicos enfocados a la cardioprotección farmacológica de los daños relacionados a I/R se enfoquen en definir intervenciones cardioprotectoras efectivas y el momento

apropiado para su administración; mediante la evaluación de la eficacia de terapias combinadas en comparación con las terapias individuales (Schwartz Longacre et al., 2011). Poder encontrar un fármaco o una combinación de fármacos , ya sean nuevos o conocidos, que sean capaces de pre/post acondicionar al miocardio frente al daño por I/R, se vuelve relevante (Mewton et al., 2011).

Actualmente se considera que existe una brecha entre los muchos estudios preclínicos que informan de una cardioprotección frente al infarto con intervención farmacológica; y la traducción, de esas misma estrategias, en mejores resultados clínicos en los pacientes con IAM (Heusch, 2020). La comparación con modelos animales inapropiados y estudios clínicos mal diseñados, son algunas de las razones que sustentan esta brecha (Bulluck et al., 2016; Herr et al., 2015). Sin embargo, otros autores, analizan la situación desde otro punto de vista y proponen encajar los contextos clínicos del IAM a los diferentes modelos animales existentes utilizados para evaluar los daños por I/R (Mewton et al., 2011).

El futuro de la terapia cardioprotectora depende de una mejor comprensión de la fisiopatología de la lesión miocárdica por I/R y las vías de transducción de señales cardioprotectoras. Adicionalmente aún existe la necesidad de encontrar y desarrollar fármacos cardioprotectores que se puedan administrar antes o durante la reperfusión (Heusch, 2020). Todas estas son razones válidas para continuar con las investigaciones cardiovasculares básicas, entre ellas los estudios que utilizan los modelos de corazón aislado perfundido.

XII. Metodología

7. Biomodelo experimental

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (250-300 g) provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), Panamá. Los animales fueron mantenidos, en el bioterio experimental del Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas (CIPFAR) de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de ciclos de 12 horas de luz / oscuridad, alojados a una temperatura de 24 ± 1 °C y con libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2012). Este proyecto de investigación fue aprobado por Comité de Bioética de la Universidad de Panamá mediante nota CBIUP/153/2020.

7.1. Modelo de Isquemia Reperfusión

7.1.1. Cirugía y extirpación del corazón

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y anticoagulados con heparina sódica (500 U/kg). Una vez comprobado el plano anestésico en el animal, abrimos la cavidad abdominal realizando una incisión transversal. El diafragma se seccionó y se realizaron incisiones laterales a lo largo de la caja torácica. El corazón se separó, haciendo un solo corte con las tijeras en el tejido conectivo que fija al corazón. Seguidamente, el corazón se colocó en un recipiente que contenía solución amortiguadora helada (4°C) de Krebs-Henseleit (K-H) (NaCl (118.5 mM), NaHCO₃ (25mM), KCl (4.7 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), MgSO₄. 7H₂O (1.2 mM), Glucosa (11 mM), CaCl₂.2H₂O (2.5 mM), Octanoato de sodio (7.7×10^{-2} mM)). Por último, la aorta del corazón se limpió, canuló y se conectó al sistema de perfusión para la perfusión retrógrada (**Figura 6**).

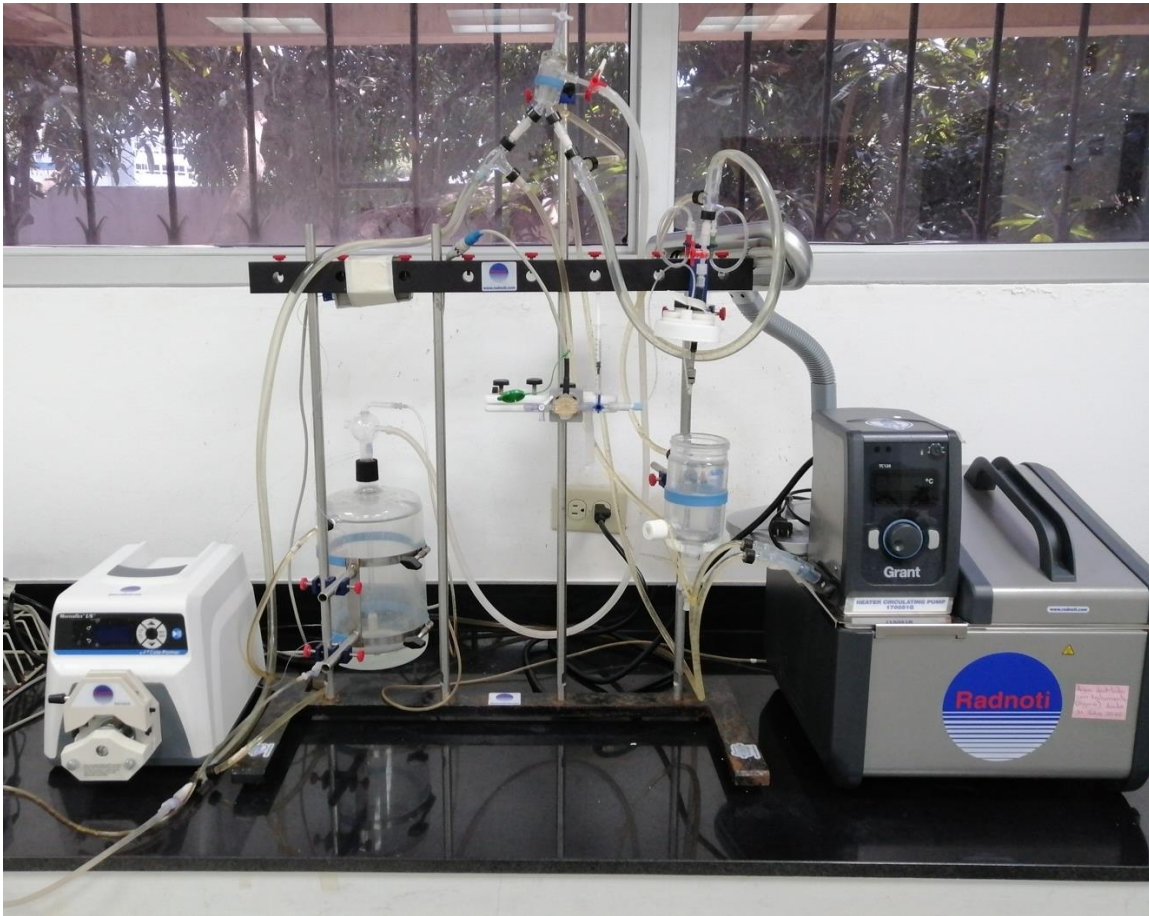


Figura 6. Sistema de perfusión

7.1.2. Estandarización del modelo de I/R empleando el corazón perfundido de Langendorff

La estandarización fue el proceso previo a la implementación del modelo en la evaluación farmacológica. Considerando que la reproducibilidad del modelo de I/R depende de variables importantes como la velocidad de perfusión, basamos la primera fase de estandarización en la modificación de este factor. Los primeros resultados fueron obtenidos con la velocidad de perfusión de 8 mL/min, con la que no se logró la presión basal mínima deseada (datos no mostrados). Con base a este resultado llevados a cabo durante el proceso de estandarización, seleccionamos las velocidades de 10.5 y 12 ml/min para ser empleadas en la perfusión del corazón aislado. Considerando ambas velocidades, establecimos grupos controles y grupos en los que se indujo I/R. Otra variable sujeta a ser modificada en este modelo, es el

mecanismo empleado para la inducción de la isquemia, que se relaciona con el daño asociado a la isquemia reperusión. En nuestro caso, evaluamos la inducción de la isquemia mediante la suspensión de la perfusión (SP) o por la deprivación de oxígeno (DO) en la solución perfundida.

En todos los protocolos se mantiene un grupo control, donde los corazones son perfundidos de forma continua y con solución oxigenada durante 120 minutos, mientras que, el grupo isquemia reperusión, se estabiliza perfundiéndolo durante los primeros 30 min, seguido por un periodo de isquemia por SP o DO de 30 min., para proceder al periodo de reperusión durante una hora.

A partir de estas modificaciones realizamos un grupo de experimentos que nos permitieron concluir sobre las condiciones que eran favorables a la inducción de la lesión cardíaca y que además garantizarían la reversión, aunque solo fuera parcial, de la actividad del tejido.

7.1.3. Evaluación de los parámetros fisiológicos

El registro de los datos fue por medio de un balón de látex que es insertado en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral y conectándolo a un transductor de presión (Physiological pressure transducer, ADInstruments, MLT844). Para todos los corazones, cambios en la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (PDVI) y la frecuencia cardíaca (FC) se registraron continuamente utilizando un sistema de adquisición de datos PowerLab v8. Además, se logró calcular otros valores de la funcionalidad cardíaca como lo son el MaxdP/dt (indicador de la contracción miocárdica), MindP/dt (indicador de la relajación miocárdica) y el doble producto que es el resultado de la multiplicación del valor de la FC y la PDVI y que además es considerado un indicador del consumo miocárdico de oxígeno (Herr et al., 2015). La descripción de la obtención de los parámetros hemodinámicos se resumen en la Figura 7.

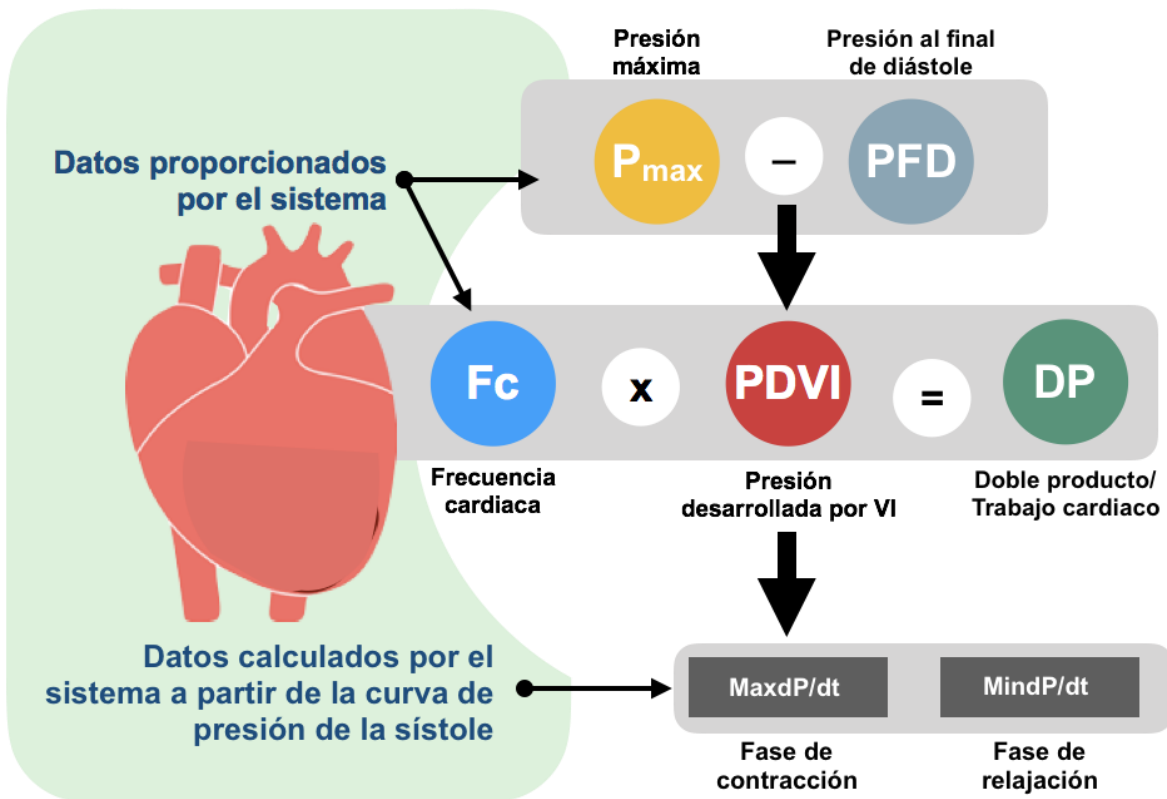


Figura 7. Parámetros hemodinámicos obtenidos por el sistema de registro y calculados a partir de los datos registrados.

7.1.4. Evaluación del efecto cardioprotector de Nebivolol y Trimetazidina, solos y en combinación, empleando el modelo de I/R

Con base a la estandarización y los resultados obtenidos, establecimos como modelo la perfusión a 10.5 mL/min y la isquemia fue inducida por la DO en la solución perfundida. De esta forma, el grupo control (C) la perfusión con solución K-H oxigenada se realizó de forma continua durante 120 min a una velocidad de 10.5 mL/min. En el grupo de I/R los corazones se estabilizaron durante 30 min con perfusión de la solución K-H oxigenada, posteriormente se indujo la isquemia mediante la perfusión de una solución K-H sin oxigenar durante 30 min, para continuar con la fase de reperfusión con K-H oxigenada durante 60 min, para cumplir con un total de 120 minutos. En los grupos tratados con NEB, TMZ o la mezcla de estos, se mantiene el periodo de estabilización y 7 min antes de la isquemia, los fármacos se suministran disueltos en solución K-H oxigenada. Al igual que fuera descrito para el grupo I/R, en los corazones pretratados con los fármacos y sus combinaciones, finalizada la fase de isquemia se procede con la reperfusión, siempre manteniendo la velocidad de flujo de 10.5 mL/min. La TMZ se evaluó en concentraciones de 25 μ M y 100 μ M, el NEB se evaluó en concentraciones de 10 μ M y 25 μ M. Adicionalmente se evaluó la combinación de las concentraciones de los fármacos con mejores efectos (**Figura 8**).

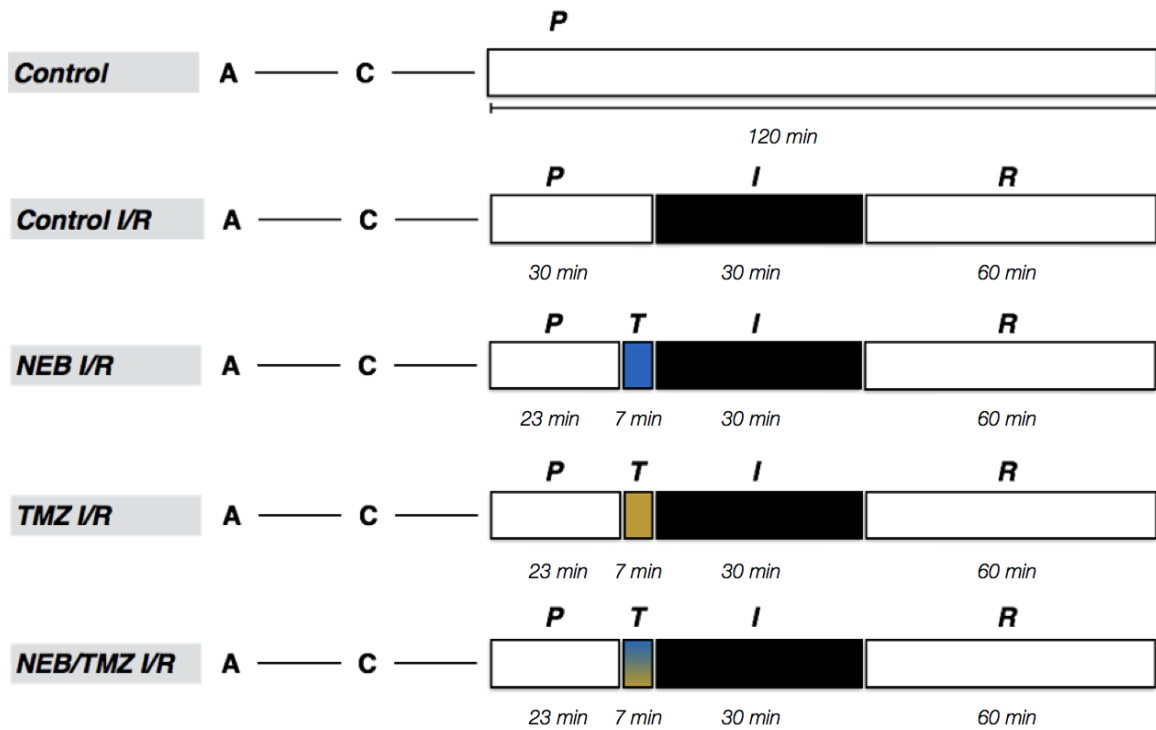


Figura 8. Esquema del protocolo implementado en el desarrollo del trabajo experimental.

A: periodo de anestesia, C: periodo de cirugía, P: periodo de perfusión, I: periodo de isquemia, R: periodo de reperusión, T: periodo de perfusión del tratamiento, NEB: Nebivolol, TMZ: Trimetazidina.

7.1.5. Determinaciones histológicas del corazón

Una vez concluidos los protocolos de perfusión, los corazones fueron sometidos a un proceso de fijación y tinción. El corazón se congeló por 10 min a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalizado el tiempo de congelación obtuvimos secciones transversales desde el ápice hacia la base del corazón. Los cortes fueron tratados con Cloruro de Trifeniltetrazolio al 1% durante 15-20 minutos a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se fijaron con formaldehído al 10% durante 20 min. Los corte teñidos se fotografiaron bajo estereoscopio y, utilizando el software Image J®, se trazaron las zonas de infarto y se calcularon las áreas de infarto respectivas en términos de píxeles (Ito et al., 1997)

8. Evaluación vascular de Nebivolol y Trimetazidina

Después de la extracción del corazón, el resto de la aorta torácica se limpió de grasa y tejido conectivo y se cortó en anillos de aproximadamente 2 mm de longitud. Cada anillo arterial se suspendió entre dos ganchos de acero inoxidable conectados a un transductor de fuerza isométrica (Myograph, ADInstrument 7200,) para medir la tensión. Cada anillo se sumergió en una cámara de 5 ml con solución de Krebs que contenía NaCl (122 mM), KCl (4.9 mM), HEPES (10 mM), KH_2PO_4 (0.5 mM), NaH_2PO_4 (0.5 mM), MgCl_2 (1.0 mM), glucosa (11 mM) y CaCl_2 (1.8 mM), con un pH de 7,4 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, burbujeado continuamente con carbógeno. Se realizó una tensión de reposo de 2 g en cada anillo y se dejó que se estabilizara durante 60 min, realizando lavados cada 15 min. Los cambios en la tensión isométrica de los anillos aórticos se detectaron utilizando un sistema de adquisición de datos Powerlab con el software Lab Chart v 8.0.

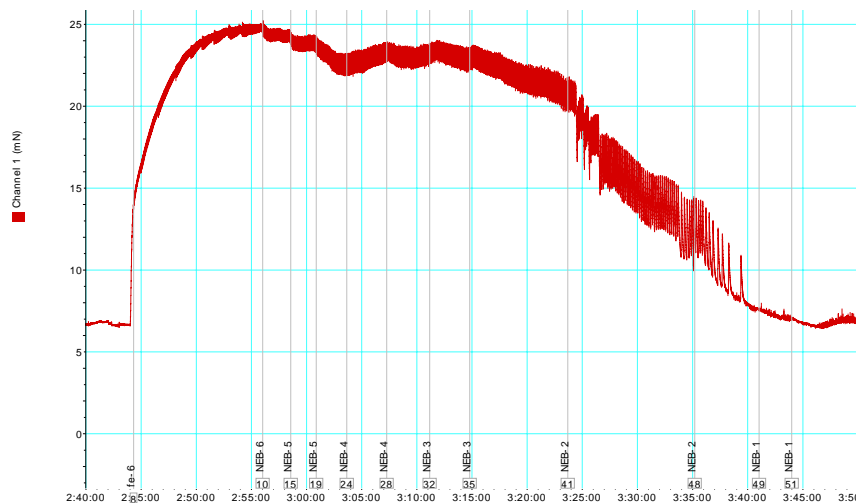
8.1. Efecto vascular de la NEB/TMZ en anillos aórticos

8.1.1. Efecto vasorelajante de NEB/TMZ en la aorta de rata aislada

Para investigar el efecto vasorelajante de los fármacos en el endotelio intacto, una vez estabilizada la tensión, se evaluó la integridad endotelial midiendo la respuesta de relajación a la acetilcolina (ACh, $1 \times 10^{-5}\text{ M}$), en los anillos precontraídos con fenilefrina (FE, $1 \times 10^{-6}\text{ M}$). La integridad del endotelio se confirmó cuando la ACh

provocaba una relajación superior al 70%. A continuación, los anillos aórticos se contrajeron con FE (1×10^{-6} M) y, cuando la contracción fue estable, se añadieron concentraciones acumuladas de NEB/TMZ (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) en la cámara del órgano (**Figura 9**). En los grupos de control, en el baño de órganos se añadió el vehículo empleado para disolver los fármacos (DMSO/solución de Krebs).

A



B

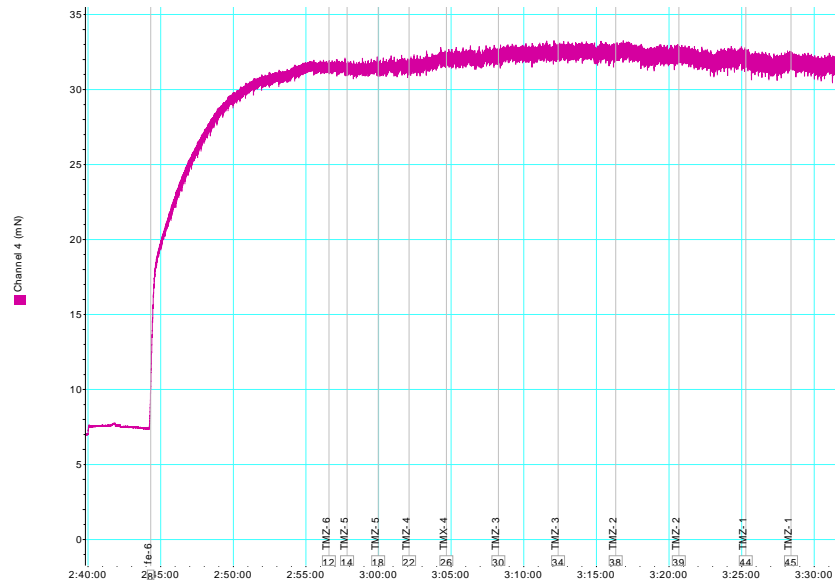


Figura 9. Registro original obtenido en el protocolo de evaluación vascular y obtención de la curva dosis respuesta de Nebivolol (A) y Trimetazidina (B) en anillos de aorta de rata.

8.1.2. Efecto del pretratamiento con NEB/TMZ sobre la contracción inducida por NA

Se analizó el papel inhibitor de la NEB/TMZ (1×10^{-4} M, 2.5×10^{-5} M) sobre la contracción concentración dependiente de norepinefrina (NE, 1×10^{-10} - 1×10^{-5} M), empleando anillos aórticos con endotelio intacto. En anillos individuales, primero se evocó la contracción mediante concentraciones graduales de NE y posteriormente, después de periodo de lavado y estabilización de 1 h, los anillos aórticos se incubaron durante 20 minutos en ausencia (Control-DMSO/solución de Krebs) o en presencia de los fármacos NEB o TMZ (**Figura 10**).

A

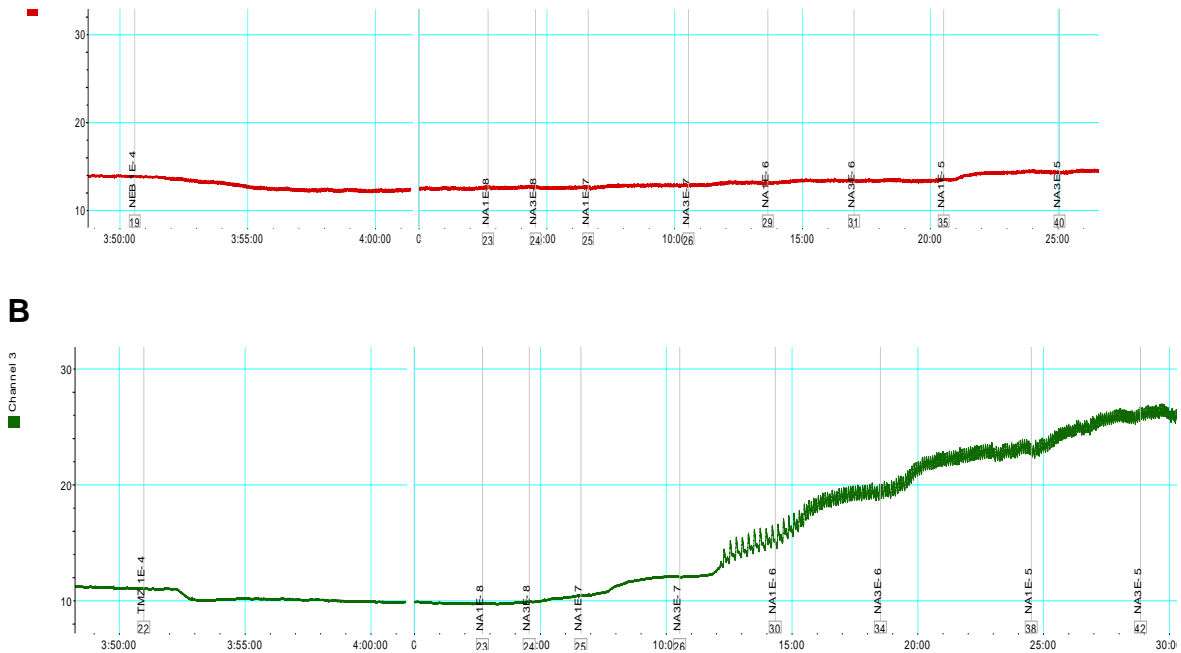


Figura 10. Registro original obtenido en la evaluación del efecto de Nebivolol (A) y Trimetazidina (B) sobre la contracción vascular inducida por NA en anillos de aorta de rata.

8.1.3. Efecto del pretratamiento con NEB/TMZ en la relajación inducida por ACh

Se analizó el efecto de la NEB/TMZ (1×10^{-4} M, 2.5×10^{-5} M) sobre la relajación inducida por ACh en anillos aórticos intactos con endotelio. En primer lugar, se obtuvo una curva de relajación dosis-respuesta a la ACh (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) tras la precontracción por FE (1×10^{-6} M). Tras un periodo de lavado y estabilización de 1 hora, se realizó una curva de relajación a la ACh en anillos aórticos en ausencia (Control -DMSO/solución de Krebs) o en presencia de NEB o TMZ (**Figura 11**).

A

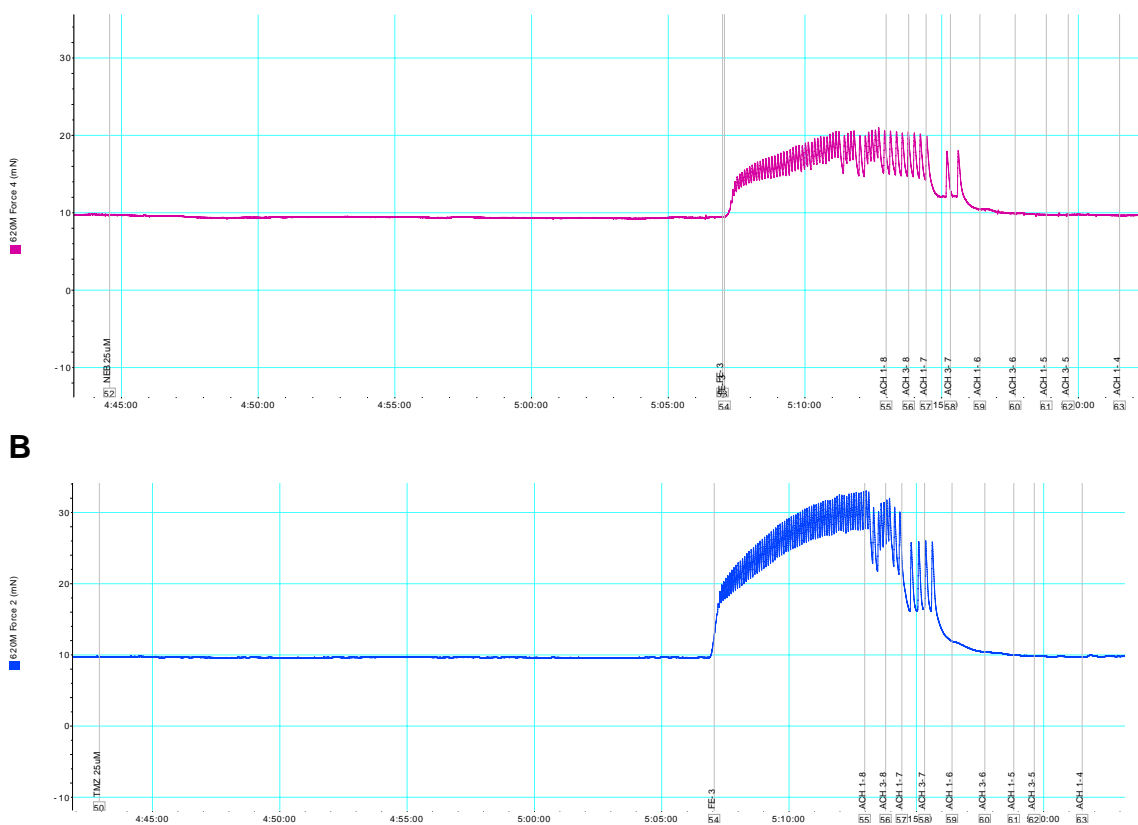


Figura 11. Registro original obtenido en la evaluación del efecto de Nebivolol (A) y Trimetazidina (B) sobre la relajación vascular inducida por acetilcolina en anillos de aorta de rata.

9. Actividad antioxidante de NEB y TMZ

9.1. Actividad antiradicalaria frente a DPPH

La actividad atrapadora de radicales libres DPPH se estimó mediante un ensayo basado en el método descrito en la literatura (Pombal et al., 2020). Los fármacos NEB y el control positivo quercetina, se disolvieron en DMSO, mientras que la TMZ se disolvió en Tampón fosfato salino; en dos soluciones de concentración (25 y 100 μ M). Las mezclas de reacción contenían 100 μ L de solución de muestra y 100 μ L de solución de metanol de DPPH (0,3 mM), y luego se midió la absorbancia a 515 nm después de incubar a 37 °C durante 30 min, mediante un lector de microplacas

automatizado (GloMax-Multi + Detection System con Instinct Software). **(Figura 12)**. El efecto de barrido del radical DPPH se calculó mediante la siguiente fórmula:

En donde el A0 es la absorbancia del blanco y A1 es la absorbancia de la muestra.

Radical DPPH

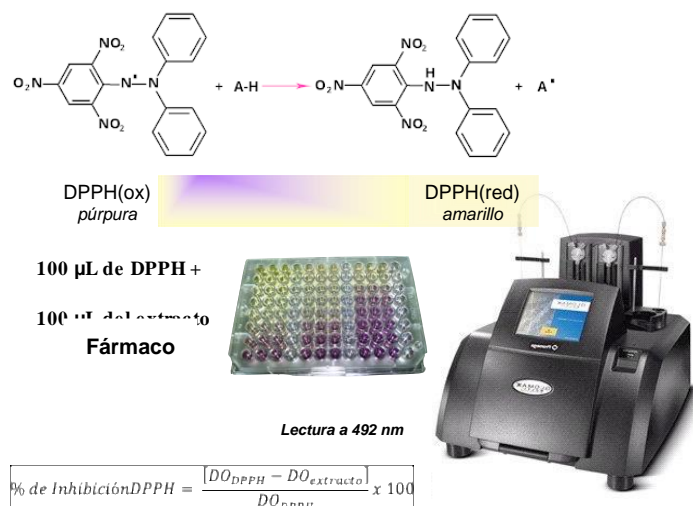


Figura 12. Esquema de la metodología para la evaluación de la actividad antiradicalaria frente a DPPH.

9.2. Actividad atrapadora del radical de óxido nítrico

La actividad atrapadora del óxido nítrico (NO) se estimó mediante un ensayo basado en la reacción de Griess Illosvoy (Pombal et al., 2020). Se mezclaron 50 µL de NEB/TMZ o Quercetina (25 y 100 µM en DMSO / tampón fosfato salino) con 50 µL de nitroprusiato de sodio (10 mM) y 50 µL de reactivo de Griess preparado en tampón fosfato salino (pH 7,4). Las microplacas se incubaron durante 150 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se registró la absorbancia a 546 nm mediante un lector de microplacas automatizado (GloMax-Multi + Detection System con Instinct Software). La disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción indicó un aumento de la actividad atrapadora del óxido nítrico **(Figura 13)**. El porcentaje de eliminación de radicales NO⁻ se calculó según la ecuación 1.

Radical NO

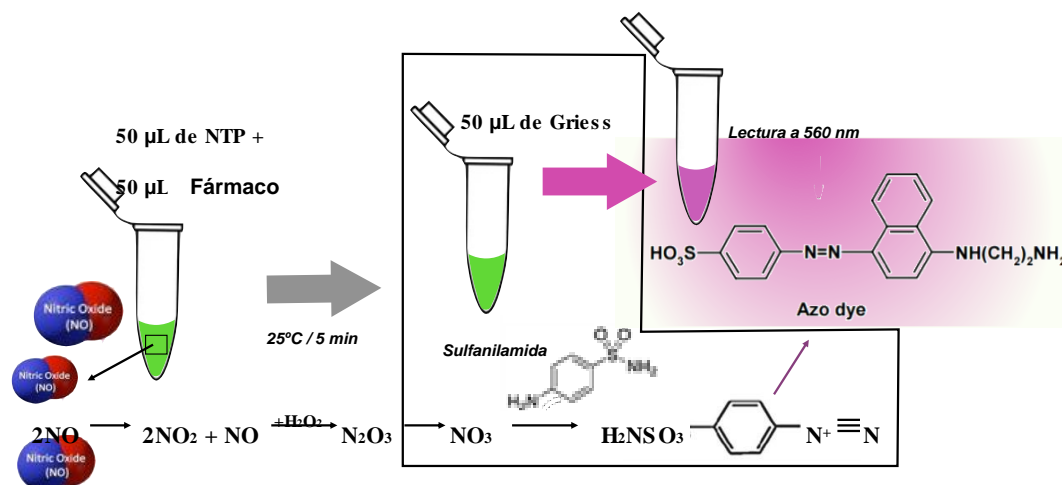


Figura 13. Esquema de la metodología para la evaluación de la actividad antiradicalaria frente a ON.

9.3. Actividad atrapadora de radicales de anión superóxido

La medición de la actividad atrapadora de anión superóxido se basó en el método descrito por (Pombal et al., 2017). Los radicales superóxido se generaron en un sistema PMS-NADH (Fenazine Methosulfate - Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide) mediante la oxidación de NADH y se analizaron a través de la reducción de NBT. Los radicales superóxido se generaron en presencia de 50 µL NEB/TMZ o Quercetina (25 y 100 µM en DMSO / tampón fosfato salino), utilizando 50 µL de solución de PMS (120 µM) y 50 µL de solución de NADH (936 µM). La reacción se reveló añadiendo 50 µL de solución de NBT (150 µM) a la mezcla, se incubó a 25 °C durante 5 minutos y, a continuación, se midió la absorbancia a 560 nm mediante un lector de microplacas automatizado (GloMax-Multi + Detection

System con Instinct Software). La disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción indicó un aumento de la actividad atrapadora del anión superóxido (**Figura 14**). El porcentaje de eliminación del radical superóxido se calculó según la ecuación 1.

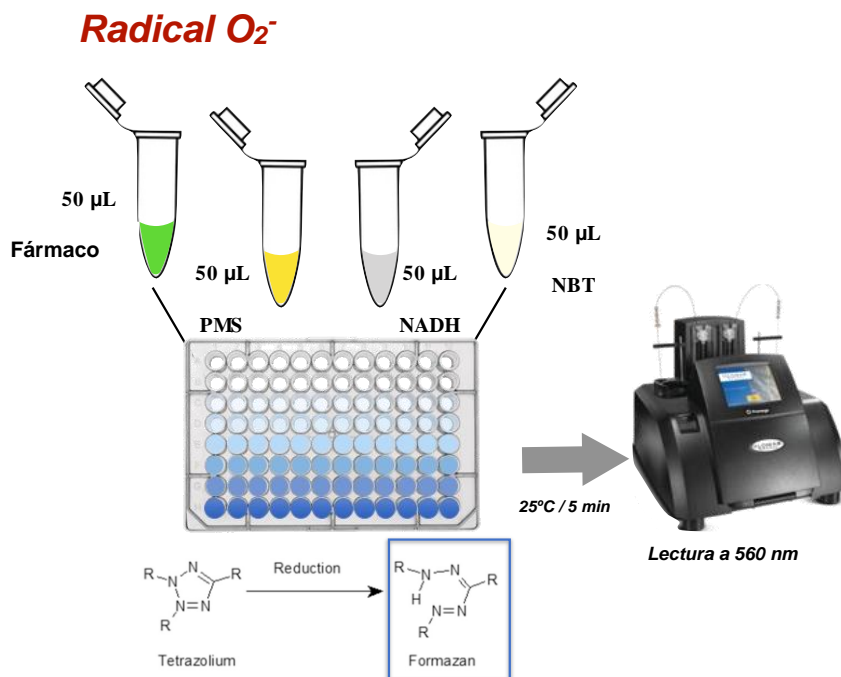


Figura 14. Esquema de la metodología para la evaluación de la actividad antiradicalaria frente a ASO

XIII. Resultados

10. Estandarización del modelo de I/R empleando el corazón perfundido de Langendorff

10.1. Presión desarrollada del ventrículo izquierdo

10.1.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min

En la primera fase de este estudio realizamos el proceso de estandarización del modelo de corazón perfundido de Langendorff. A partir del programa se obtienen los datos de Pmax y PFD, que nos permitieron calcular el valor de PDVI en los protocolos descritos. En primera instancia, al valorar la estabilidad del trabajo cardiaco y, por ende, de la viabilidad del tejido, era necesario determinar si la PDVI se mantenía sin cambios significativos durante los 120 minutos de ensayo.

Según se puede observar en la **Tabla 3 y Gráfico 1A**, para el grupo control perfundido a 10.5 mL, los valores de PDVI permanecen invariables durante los 120 minutos de experimentación, recogidos a través de los valores obtenidos a los 30, 70 y 120 minutos (79.06 ± 3.50 ; 85.76 ± 4.57 ; 82.36 ± 4.30 mm Hg, respectivamente). En el **gráfico 1A** también podemos observar que a esta velocidad en el periodo de estabilización que se registra en los primeros 30 minutos, no se observan diferencias significativas entre el control (79.06 ± 3.51 mm Hg) y las derivaciones protocolares IRSP (72.99 ± 5.80 mm Hg) e IRDO (85.71 ± 11.87 mm Hg). A los 10 minutos post-isquemia, representado en el gráfico como minuto 70, cuando la isquemia se induce por DO observamos una disminución significativa de la PDVI (Control= 85.75 ± 4.57 mm Hg ; IRDO= 47.52 ± 10.65 mm Hg) y en el minuto 120 se mantiene la diferencia significativa ente el grupo IR y el IRDO, siendo los valores de PDVI de 82.36 ± 4.30 mm Hg para el grupo control y de 46.79 ± 9.26 mm Hg en IRDO (**Tabla 3, Gráfico 1A**).

10.1.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min

Cuando la velocidad de perfusión se establece en 12 mL/min, los valores de PDVI en el grupo control disminuyen en el tiempo, siendo de 79.01 ± 9.46 al minuto 30 y de 61.14 ± 5.30 mm Hg a los 120 minutos (**Tabla 3, Gráfico 1B**).

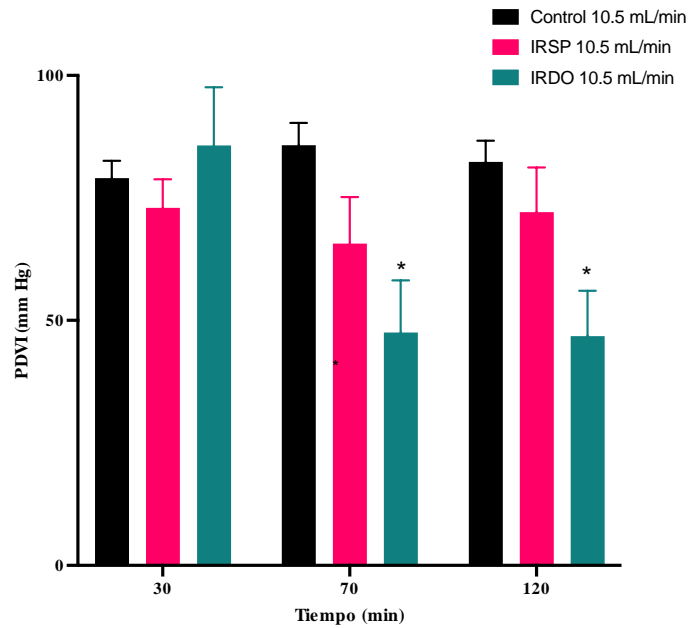
A pesar de que para el grupo perfundido a 12 mL/min observamos una tendencia natural hacia la reducción del trabajo cardiaco, consideramos la realización de los ensayos, incluyendo la variable de inducción de la I/R para esta velocidad. Así, en los grupos de isquemia experimental desarrollados a velocidad de 12 mL/min (**Gráfico 1B**), no se observan diferencias significativas entre los grupos control y protocolos de I/R (Control= 79.01 ± 9.46 mm Hg; IRSP= 68.22 ± 10.45 mm Hg; IRDO= 80.10 ± 6.30 mm Hg).

Para este protocolo de perfusión, a los 70 minutos se observa una tendencia a la disminución del parámetro de PDVI en el grupo IRDO (39.67 ± 8.90 mm Hg) si lo comparamos con los valores obtenidos en el grupo control en el mismo periodo (71.47 ± 8.25 mm Hg). A los 120 minutos al realizar una valoración comparativa entre los grupos que fueron perfundidos a la velocidad de 12 mL/min, podemos observar que, por una parte, los corazones del grupo control tienden a una reducción significativa de la PDVI (61.14 ± 5.30 mm Hg), en tanto que los grupos sometidos a I/R la actividad se mantiene (IRSP = 58.20 ± 12.02 mm Hg) o aumentan (IRSO = 42.15 ± 9.38 mm Hg). Este comportamiento marca como resultado que, a los 120 minutos de actividad protocolar, no haya diferencias entre los grupos controles 12 mL/min e I/R (**Tabla 3, Gráfico 1B**).

Tabla 3. Valores de presión desarrollada por el ventrículo izquierdo en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R.

Tiempo (min)	Velocidad de perfusión de 10.5 mL/min			Velocidad de perfusión de 12 mL/min		
	Control	IRSP	IRDO	Control	IRSP	IRDO
30	79.06 ± 3.51	72.99 ± 5.80	85.71 ± 11.87	79.01 ± 9.46	68.22 ± 10.45	80.10 ± 6.30
70	85.75 ± 4.57	65.70 ± 9.47	47.52 ± 10.65*	71.47 ± 8.25	62.64 ± 8.76	39.67 ± 8.90
120	82.36 ± 4.30	72.07 ± 9.14	46.79 ± 9.26*	61.14 ± 5.30	58.20 ± 12.02	42.15 ± 9.38
<p>Se presentan los datos de la media ± SEM de PDVI para un n=8 * p<0.05 vs control 10.5 mL/min; ** p<0.05 vs control 12 mL/min</p>						

A



B

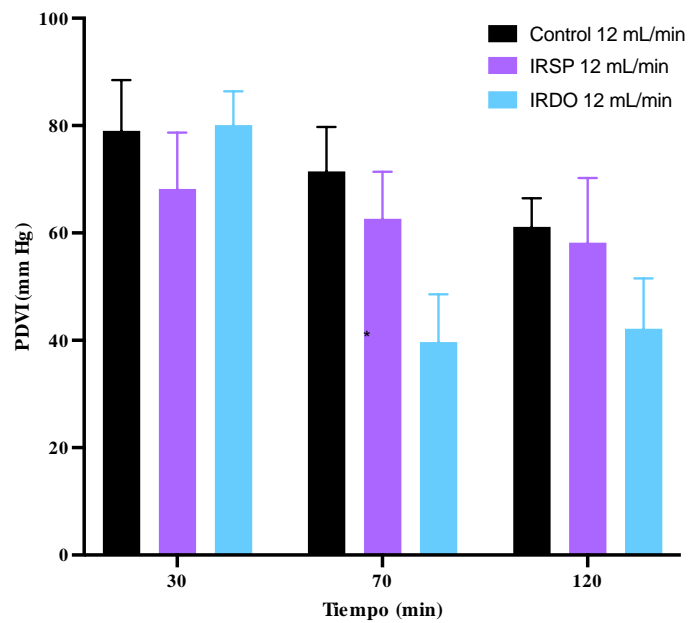


Gráfico 1. Efecto sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL/min) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (SP) o deprivación de oxígeno (DO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$.

10.2. Doble producto

10.2.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min

El proceso de estandarización del modelo incluyó la evaluación del DP. Este parámetro se calcula al multiplicar la PDVI por la FC, ambos valores son obtenidos del programa de adquisición de datos.

Durante los 120 minutos del experimento los valores de DP para el grupo control 10.5 ml/min se mantuvieron constantes, pudiendo observarse al minuto 30 un valor de DP de $21.75 \times 10^3 \pm 1.62 \times 10^3$ mm Hg . lpm y para los minutos 70 y 120; los valores de DP son $22.61 \times 10^3 \pm 1.38 \times 10^3$ y $21.25 \times 10^3 \pm 1.11 \times 10^3$ mm Hg . lpm, respectivamente. Con el propósito de verificar si existe diferencias significativas entre los grupos experimentales antes de inducir la isquemia (minuto 30), se compararon los valores de DP en ese tiempo, encontrándose que no existían diferencias significativas entre el control 10.5 mL/min ($21.75 \times 10^3 \pm 1.62 \times 10^3$ mm Hg . lpm) y los grupos IRSP ($19.52 \times 10^3 \pm 1.76 \times 10^3$ mm Hg . lpm) e IRDO ($22.29 \times 10^3 \pm 2.29 \times 10^3$ mm Hg . lpm) **(Tabla 4, Gráfico 2A)**.

Diez minutos después de iniciada la reperfusión (minuto 70), con el protocolo de inducción de la isquemia mediante la DO, se observa que el valor de DP es significativamente menor en el grupo IRDO ($10.36 \times 10^3 \pm 2.66 \times 10^3$ mm Hg . lpm), comparado con el control, donde el DP al mismo tiempo fue de $22.61 \times 10^3 \pm 1.38 \times 10^3$ mm Hg . lpm **(Tabla 4, Gráfico 2A)**.

En el minuto 120 se mantiene la diferencia significativa ente el grupo Control 10.5 mL/min y el IRDO, siendo los valores de DP de $21.25 \times 10^3 \pm 1.11 \times 10^3$ mm Hg . lpm para el grupo control y de $12.35 \times 10^3 \pm 2.36 \times 10^3$ mm Hg . lpm en IRDO **(Gráfico 2A)**.

10.2.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min

Cuando el corazón fue perfundido a una velocidad de 12 ml/min, el valor de DP en el grupo control fue decreciendo a partir del valor inicial de $19.58 \times 10^3 \pm 2.31 \times 10^3$ mm Hg . lpm, hasta un valor de $13.48 \times 10^3 \pm 1.36 \times 10^3$ mm Hg . lpm al final de la perfusión, reflejando una disminución del trabajo cardiaco durante el experimento. Cuando se compararon los grupos experimentales perfundidos a una velocidad de 12 mL/min, antes de inducir la isquemia, no se observan diferencias entre los grupos (Control 12 mL/min= $19.58 \times 10^3 \pm 2.31 \times 10^3$ mm Hg . lpm; IRSP= $18.49 \times 10^3 \pm 2.80 \times 10^3$ mm Hg . lpm, IRDO= $21.53 \times 10^3 \pm 2.11 \times 10^3$ mm Hg . lpm) (**Tabla 4, Gráfico 2B**).

A los 70 minutos, con el protocolo de isquemia por DO, se observa un menor valor de DP cuando se compara con el grupo control 12 mL/min ($11.03 \times 10^3 \pm 2.23 \times 10^3$ y $16.92 \times 10^3 \pm 1.99 \times 10^3$ mm Hg . lpm, respectivamente), sin que la diferencia tenga significancia estadística (**Tabla 4, Gráfico 2B**). Cuando la isquemia es inducida por el protocolo de SP no se observan cambios estadísticamente significativos a ninguna de las velocidades ensayadas.

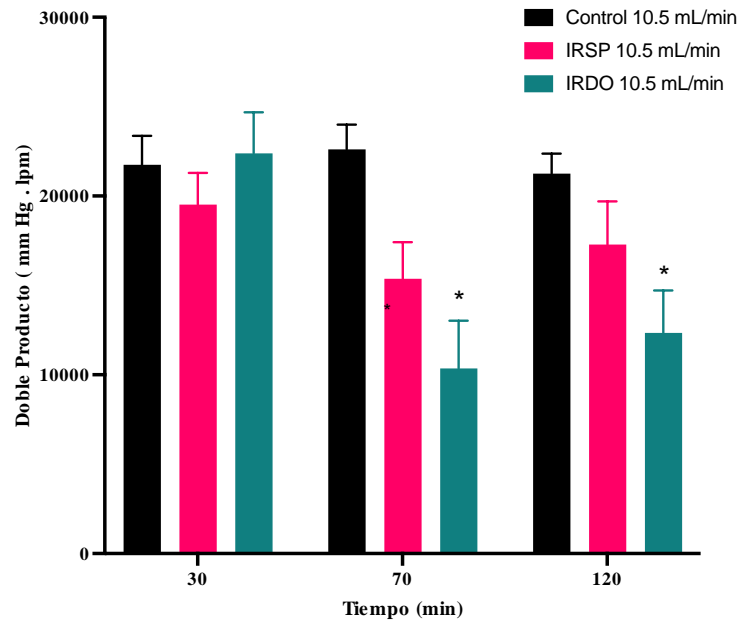
En la **Tabla 4**, se puede observar que los valores de DP para los grupos control 12 ml/min, IRSP e IRDO son similares una vez finalizada la estandarización ($19.58 \times 10^3 \pm 2.31 \times 10^3$, $18.49 \times 10^3 \pm 2.80 \times 10^3$ y $21.53 \times 10^3 \pm 2.11 \times 10^3$, respectivamente). Mientras que los valores para el grupo IRSP se mantienen constante hasta el final del experimento ($17.43 \times 10^3 \pm 2.49 \times 10^3$), una reducción no significativa se observó para los grupos control 12 ml/min e IRDO a los 120 min ($13.48 \times 10^3 \pm 1.36 \times 10^3$, $11.04 \times 10^3 \pm 1.99 \times 10^3$, respectivamente). Este comportamiento deriva en una ausencia de las diferencias significativas entre el grupo control 12 ml/min y los Grupos I/R (Gráfico 2B).

Tabla 4. Valores de doble producto en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R.

Tiempo (min)	Velocidad de perfusión de 10.5 mL/min			Velocidad de perfusión de 12 mL/min		
	Control	IRSP	IRDO	Control	IRSP	IRDO
30	21.75 ± 1.62	19.52 ± 1.76	22.39 ± 2.29	19.58 ± 2.31	18.49 ± 2.80	21.53 ± 2.11
70	22.21 ± 1.38	15.36 ± 2.05	10.36 ± 2.66 *	16.92 ± 1.99	16.32 ± 2.12	11.03 ± 2.23
120	21.25 ± 1.11	17.28 ± 2.42	12.35 ± 2.36 *	13.48 ± 1.36	17.43 ± 2.49	11.04 ± 1.99

Se presentan los datos de la (media ± SEM) x10³ de DP para un n=8
*** p<0.05 vs control 10.5 mL/min; ** p<0.05 vs control 12 mL/min**

A



B

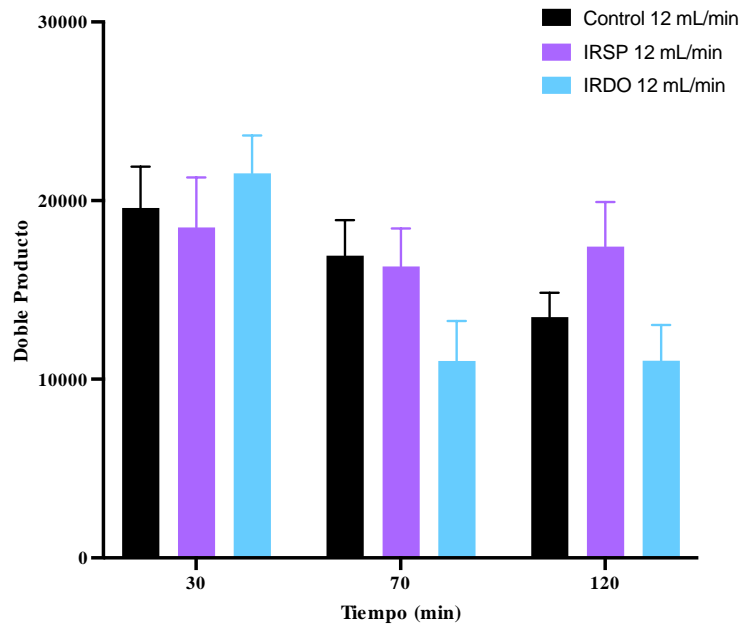


Gráfico 2. Efecto sobre el doble producto (DP) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL/min) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (IRSP) o deprivación de oxígeno (IRDO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$

10.3. Max dP/dt

10.3.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min

Otro parámetro que fue monitoreado durante la estandarización fue el Max dP/dt. Este parámetro se obtiene a partir de la curva de presión de un latido y se relaciona con la contractilidad cardíaca. Como fue observado en la PDVI y en el DP, los valores de Max dP/dt en el grupo control 10.5 mL/min se mantuvieron poco variables; partiendo de un valor pre-isquemia de $2.80 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s, hasta completar los 60 minutos pos-isquemia (120 minutos en **Tabla 5 y el Gráfico 3**), en donde el valor fue $2.71 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s.

Los valores de Max dP/dt para los grupos experimentales perfundidos a esta velocidad de perfusión no presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al control en el minuto 30, antes de inducir la isquemia, (Control 10.5 mL/min= $2.80 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s, IRSP= $2.67 \times 10^3 \pm 0.14 \times 10^3$ mm Hg/s y IRDO= $3.24 \times 10^3 \pm 0.38 \times 10^3$ mm Hg/s) (**Tabla 5, Gráfico 3A**)

Para el minuto 70, el comportamiento observado en el grupo al que se le induce la isquemia mediante la SP, es la disminución del valor del Max dP/dt. El efecto de la isquemia sobre el valor de Max dP/dt es significativo cuando se compara el grupo IRDO con el control ($1.46 \times 10^3 \pm 0.27 \times 10^3$ vs $2.97 \times 10^3 \pm 0.18 \times 10^3$ mm Hg/s, respectivamente). En el **Gráfico 3A y Tabla 5**, se puede observar los resultados para los grupos experimentales.

A los 120 minutos de iniciado el protocolo de perfusión, el grupo IRSP refleja una recuperación de la contractilidad cardíaca ($2.70 \times 10^3 \pm 0.40 \times 10^3$ mm Hg/s), un valor que es similar al control obtenido en este grupo antes de la isquemia ($2.67 \times 10^3 \pm 0.14 \times 10^3$ mm Hg/s). En cambio, el grupo IRDO mantuvo valores de Max dP/dt bajos, en especial cuando se comparan con el control 10.5 mL/min a los 120 minutos (Control 10.5 mL/min= $2.70 \times 10^3 \pm 0.40 \times 10^3$ mm Hg/s; IRDO= $1.87 \times 10^3 \pm 0.34 \times 10^3$ mm Hg/s) (**Tabla 5, Gráfico 3A**).

10.3.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min

Los valores de Max dP/dt desarrollados por los corazones del grupo control sometidos a la velocidad de perfusión de 12 ml/min, fueron disminuyendo durante el experimento, empezando con un valor de $3.02 \times 10^3 \pm 0.21 \times 10^3$ mm Hg/s al minuto 30; $2.78 \times 10^3 \pm 0.21 \times 10^3$ mm Hg/s al minuto 70 y finalizando con un valor de $2.39 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s a los 120 minutos, lo que refleja una disminución en la capacidad contráctil del corazón.

Los valores de Max dP/dt desarrollados antes de inducir la isquemia (30 minutos) fueron similares entre los grupos experimentales, en donde los valores para IRSP e IRDO fueron de $2.79 \times 10^3 \pm 0.37 \times 10^3$ mm Hg/s y $2.80 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s; respectivamente (**Tabla 5, Gráfico 3B**).

A esta velocidad de perfusión, al minuto 70, el protocolo de inducción de isquemia por SP no produjo una disminución significativa del valor, siendo que el valor de Max dP/dt del control es de $2.76 \times 10^3 \pm 0.21 \times 10^3$ mm Hg/s y el del IRSP es de $2.19 \times 10^3 \pm 0.31 \times 10^3$ mm Hg/s (**Tabla 5, Gráfico 3B**). En cambio, en el grupo IRDO se observa una diferencia significativa cuando se compra con sus respectivos controles (IRDO= $1.49 \times 10^3 \pm 0.32 \times 10^3$; Control = $2.39 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s).

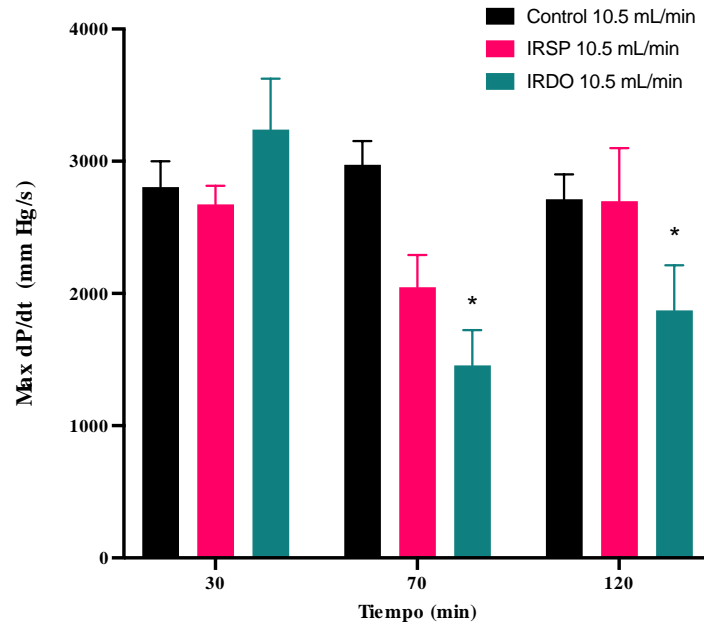
Finalmente, a los 120 minutos de experimento los valores de Max dP/dt en el grupo con protocolo de inducción mediante la SP reflejaron un aumento (IRSP= $2.92 \times 10^3 \pm 0.43 \times 10^3$ mm Hg/s), comparados con el valor del Control 12mL/min= $2.39 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s. Sin embargo, cuando la inducción de la isquemia se realiza mediante la DO, los valores de Max dP/dt se mantienen disminuidos (IRDO= $1.51 \times 10^3 \pm 0.30 \times 10^3$ mm Hg/s); aunque esta no es una reducción significativa cuando se compara con el control 12 mL/min= $2.39 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s (**Tabla 5, Gráfico 3B**).

Tabla 5. Valores de Max dP/dt en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R.

Tiempo (min)	Velocidad de perfusión de 10.5 mL/min			Velocidad de perfusión de 12 mL/min		
	Control	IRSP	IRDO	Control	IRSP	IRDO
30	2.80 ± 0.19	2.67 ± 0.14	3.24 ± 0.38	3.03 ± 0.21	2.79 ± 0.37	2.72 ± 0.18
70	2.97 ± 0.18	2.05 ± 0.24	1.46 ± 0.27 *	2.77 ± 0.21	2.19 ± 0.30	1.49 ± 0.32 **
120	2.71 ± 0.19	2.70 ± 0.40	1.87 ± 0.34 *	2.39 ± 0.19	2.92 ± 0.43	1.51 ± 0.30

Se presentan los datos de la (media ± SEM) x10³ de Max dP/dt para un n=8
*** p<0.05 vs control 10.5 mL/min; ** p<0.05 vs control 12 mL/min**

A



B

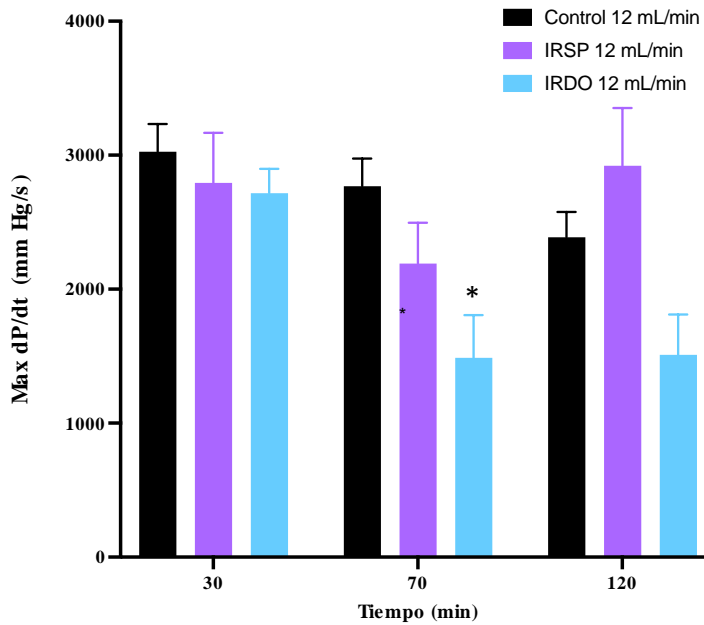


Gráfico 3. Efecto sobre la contractilidad miocárdica (Max dP/dt) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL/min) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (SP) o deprivación de oxígeno (DO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; n=8

10.4. Min dP/dt

10.4.1. Protocolo de perfusión 10.5 mL/min

El parámetro que se correlaciona a la relajación del miocardio también fue estimado en los diferentes grupos y protocolos, al igual que el MaxdP/dt, el Min dP/dt es un parámetro que se deriva de la curva de presión de un latido.

Al analizar la variabilidad del corazón a partir de los datos de Min dP/dt en el grupo control observamos que este parámetro se mantiene estable a lo largo del experimento (minuto 30= $-1.74 \times 10^3 \pm 0.12 \times 10^3$ mm Hg/s; minuto 70= $-1.78 \times 10^3 \pm 0.11 \times 10^3$ mm Hg/s y minuto 120= $-1.61 \times 10^3 \pm 0.13 \times 10^3$ mm Hg/s) (**Tabla 6 y Gráfico 4A**). En el minuto 30 de perfusión, no se observan diferencias significativas entre el control 10.5 mL/min ($-1.74 \times 10^3 \pm 0.12 \times 10^3$ mm Hg/s) y los grupos IRSP ($-1.61 \times 10^3 \pm 0.27 \times 10^3$ mm Hg/s) e IRDO ($-1.83 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s) (**Tabla 6 y Gráfico 4A**). El Min dP/dt durante el minuto 70, el grupo de IRDO muestra una reducción significativa en la capacidad de relajación ($-0.97 \times 10^3 \pm 0.18 \times 10^3$ mm Hg/s) cuando se compara con el grupo control 10.5 mL ($-1.78 \times 10^3 \pm 0.11 \times 10^3$ mm Hg/s). Esta diferencia no se observó con el grupo IRSP que obtuvo un valor de Min dP/dt de $-1.11 \times 10^3 \pm 0.16 \times 10^3$ mm Hg/s (**Tabla 6 y Gráfico 4A**).

Con el protocolo de velocidad 10.5 ml/min, en el minuto 120 se observa una diferencia no significativa entre el control 10.5 mL/min ($-1.61 \times 10^3 \pm 0.13 \times 10^3$ mm Hg/s) y el grupo IRDO ($-0.97 \times 10^3 \pm 0.16 \times 10^3$ mm Hg/s). Esto también ocurre con el grupo ISRP que obtuvo un valor de $-1.65 \times 10^3 \pm 0.32 \times 10^3$ mm Hg/s, que es bastante similar al del control 10.5mL/min (**Tabla 6 y Gráfico 4A**).

10.4.2. Protocolo de perfusión 12 mL/min

En la **Tabla 6 y Gráfico 4B**, se aprecia para el grupo control 12 ml/min una tendencia a la disminución de los valores del de Min dP/dt a medida que transcurre el tiempo de experimentación. Al minuto 30, el valor fue de $-1.62 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$ mm Hg/s, en el minuto 70 de $-1.43 \times 10^3 \pm 0.18 \times 10^3$ y a los 120 minutos el Min dP/dt fue de $-1.10 \times 10^3 \pm 0.14 \times 10^3$ mm Hg/s.

A los 30 minutos, finalizado el periodo de estabilización, para el grupo IRSP el valor de Min dP/dt es de $-1.54 \times 10^3 \pm 0.25 \times 10^3$ mm Hg/s y en el grupo IRDO el valor de es de $-1.55 \times 10^3 \pm 0.13 \times 10^3$ mm Hg/s (**Tabla 6 y Gráfico 4B**). Esto que nos lleva a concluir que a la velocidad de perfusión de 12 ml/min, todos los grupos experimentales parten de una similar capacidad de relajación miocárdica.

Cuando valoramos el valor de Min dP/dt al minuto 70 no se observan diferencias significativas de los grupos de IRSP ($-1.31 \times 10^3 \pm 0.17 \times 10^3$ mm Hg/s) e IRDO ($-0.84 \times 10^3 \pm 0.15 \times 10^3$ mm Hg/s) con su respectivo control ($-1.43 \times 10^3 \pm 0.18 \times 10^3$ mm Hg/s); en parte esto se explica por la disminución observada en el valor del grupo control 12mL/min.

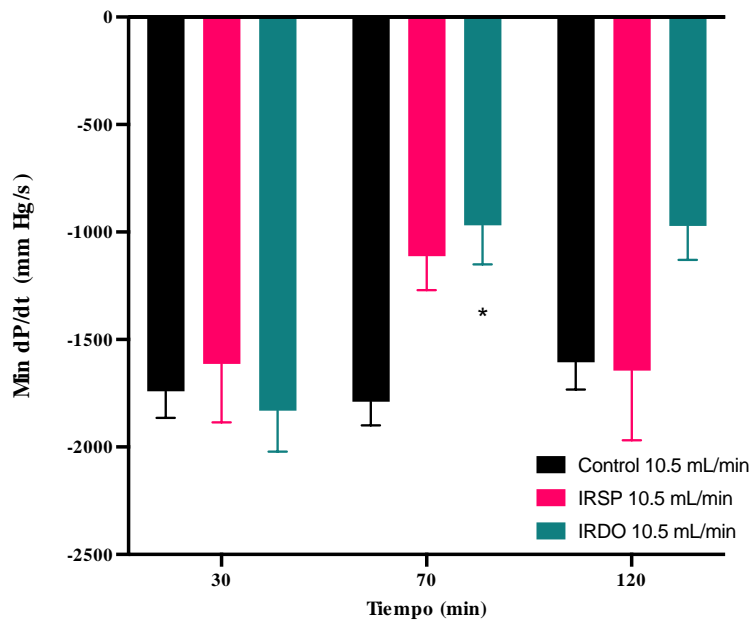
El comportamiento de los valores de Min dP/dt los 120 minutos de experimento, se resumen en la **Tabla 6 y Gráfico 4B**, en la que se puede observar que en los grupos control e IRDO los corazones tienden a una pérdida de su capacidad relajante (Control 12mL/min= $1.01 \times 10^3 \pm 0.14 \times 10^3$ e IRSP= $-1.52 \times 10^3 \pm 0.17 \times 10^3$ mm Hg/s) (Gráfico 4B).

Tabla 6. Valores de Min dP/dt en los grupos controles para los protocolos descritos a las velocidades de 10.5 y 12 mL/min y las derivaciones protocolares que modifican el método de inducción de I/R.

Tiempo (min)	Velocidad de perfusión de 10.5 mL/min			Velocidad de perfusión de 12 mL/min		
	Control	IRSP	IRDO	Control	IRSP	IRDO
30	-1.74 ± 0.12	-1.61 ± 0.27	-1.83 ± 0.19	-1.62 ± 0.19	-1.54 ± 0.25	-1.55 ± 0.13
70	-1.79 ± 0.11	-1.11 ± 0.16	-0.97 ± 0.18 *	-1.43 ± 0.18	-1.31 ± 0.17	-0.83 ± 0.15
120	-1.61 ± 0.13	-1.65 ± 0.32	-0.97 ± 0.16	-1.10 ± 0.14	-1.52 ± 0.17	-0.92 ± 0.16

Se presentan los datos de la (media ± SEM) x10³ de Min dP/dt para un n=8
*** p<0.05 vs control 10.5 mL/min; ** p<0.05 vs control 12 mL/min**

A



B

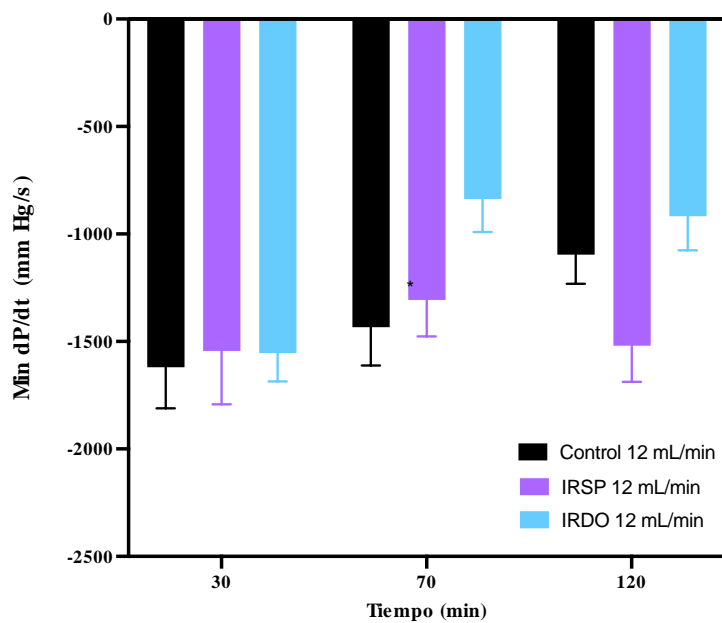


Gráfico 4. Efecto sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) de los protocolos de corazón perfundido a diferentes velocidades de perfusión (10.5 y 12 mL) y sometidos a lesión por isquemia/reperfusión, por supresión de perfusión (SP) o deprivación de oxígeno (DO). * $p < 0.05$ vs control 10.5 mL/min; $n = 8$.

11. Evaluación del efecto cardioprotector de Nebivolol y Trimetazidina, solos y en combinación, empleando el modelo de I/R

Basados en los resultados de la estandarización, para la evaluación de la actividad cardioprotectora de los fármacos y tratamientos combinados, se establece utilizar la velocidad de perfusión de 10.5 mL/min y la deprivación de oxígeno como protocolo de inducción de la lesión por I/R. Adicionalmente, siendo que durante la fase estandarización, los cambios más consistentes con una lesión isquémica se obtuvieron a los 70 minutos, el efecto de las intervenciones farmacológicas se evaluó en este periodo que corresponde a los 10 minutos post-isquemia.

En esta sección, y tal como se hiciera de manifiesto en la metodología, para la representación de los parámetros hemodinámicos optamos por presentar los resultados de los tratamientos como % de cambio, considerando como el 100% de actividad o actividad cardioprotectora deseable, el valor obtenido en el grupo control a los 70 minutos.

11.1. Efecto cardioprotector de los tratamientos

11.1.1. Parámetros hemodinámicos de corazones sometidos a I/R y perfundidos con Trimetazidina

La valoración de la lesión por I/R inicia por señalar que en el grupo I/R el valor de PDVI a los 70 minutos fue del 64.53 ± 5.94 % con respecto al control, reflejando una reducción significativa del parámetro hemodinámico. En los corazones perfundidos con TMZ durante 7 minutos antes del periodo de isquemia, se observa que a la concentración de 25 μ M, el fármaco modulador del metabolismo cardiaco mejora el desarrollo de la presión ventricular, parámetro establecido por un valor de PDVI de 84.88 ± 9.01 %. A pesar de que a esta concentración TMZ no alcanza diferencia significativa frente al grupo de I/R, los valores se acercan sin diferencias significativas a la normalidad del parámetro representado por el 100% del grupo control no sometido a isquemia (Gráfico 5A). Al perfundir la TMZ 100 μ M el valor

normalizado de PDVI es 64.54 ± 14.51 %, siendo similar al grupo I/R (64.53 ± 5.93 %) (Gráfica 5A) y estadísticamente inferior al control (100 ± 3.32 %) (**Gráfico 5A**).

El pre-acondicionamiento con TMZ $25 \mu\text{M}$ tiende a mejorar el gasto cardiaco representado por el valor de DP (92.26 ± 5.88 %), si lo comparamos con el valor desarrollado en los corazones sometidos a I/R (59.94 ± 3.85 %). La mayor consideración de este resultado radica en la ausencia de diferencia entre el grupo TMZ 25 (92.26 ± 5.88 %) y el grupo control (100 ± 3.85 %). En cambio, la perfusión de TMZ a $100 \mu\text{M}$ genera una disminución significativa del valor normalizado de DP (60.54 ± 14.16 %) comparado con el 100 ± 3.85 % del grupo control (**Gráfico 5B**).

El efecto benéfico generado por la perfusión de TMZ $25 \mu\text{M}$ también se observa en la actividad contráctil, ya que, mientras el grupo I/R presenta un valor normalizado de Max dP/dt equivalente al 60.74 ± 9.34 , el fármaco mejora la contractilidad al desarrollar un Max dP/dt de 90.93 ± 8.50 %, cercano al del Control (100 ± 4.23 %). Por otra parte, la perfusión con TMZ $100 \mu\text{M}$ no generó el mismo efecto protector sobre la contractilidad, desarrollando un valor de Max dP/dt más cercano al grupo I/R (65.0 ± 14.24 % y 60.74 ± 9.34 , respectivamente) (**Gráfico 5C**).

El efecto de la TMZ sobre la relajación miocárdica fue más discreto, tanto a la concentración de $25 \mu\text{M}$ como a la de $100 \mu\text{M}$, donde el valor de Min dP/dt fue de 81.20 ± 10.01 y 58.66 ± 10.72 %, respectivamente, frente al Min dP/dt del grupo I/R (67.37 ± 7.10 %). Para este dato, sigue siendo la concentración más baja ensayada la que muestra una marcada tendencia a mejorar la actividad cardiaca, al lograr valores de relajación sin diferencias significativas con respecto a la actividad deseable desarrollada en el grupo no isquémico (100 ± 4.06 %) (**Gráfico 5D**).

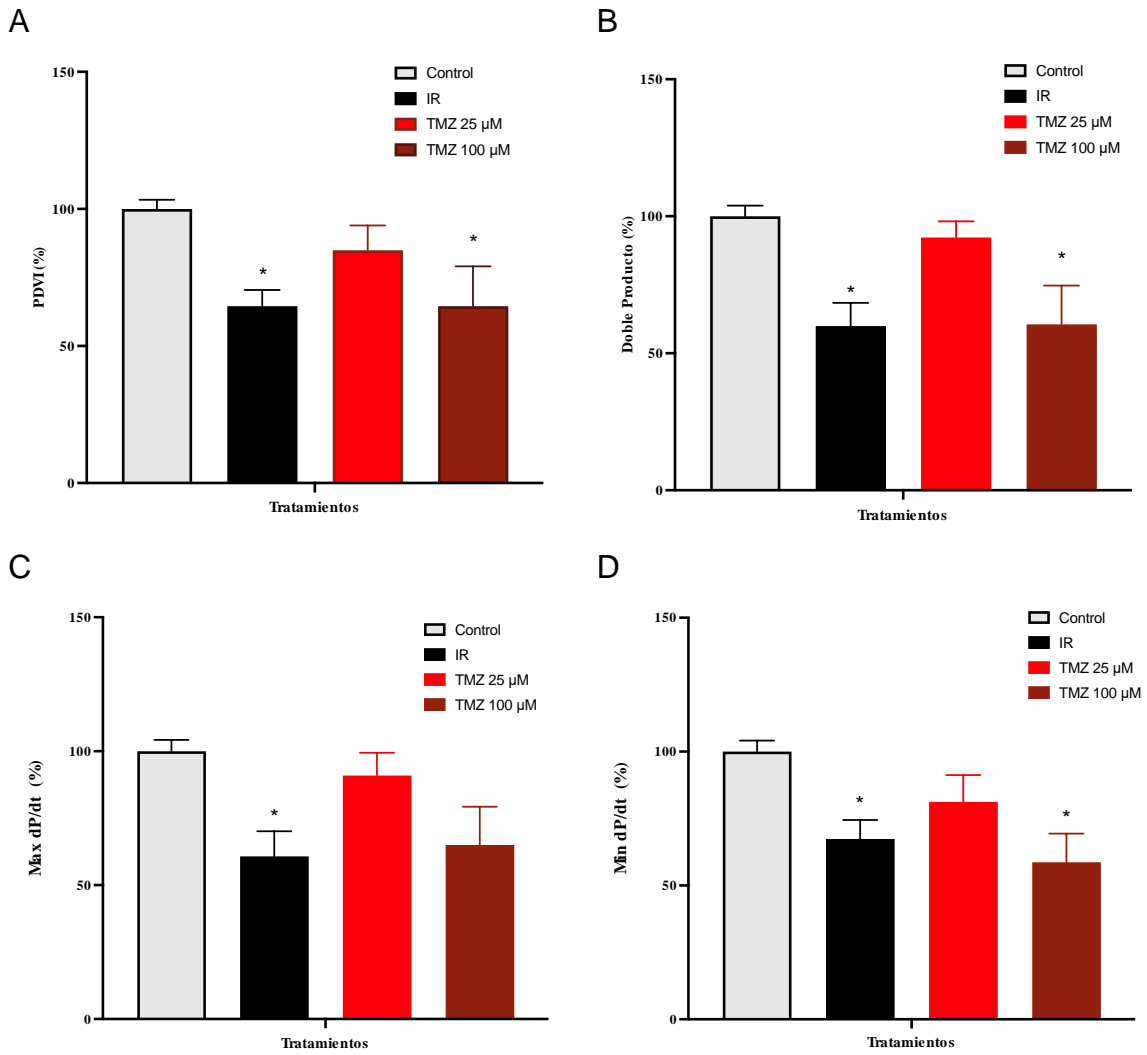


Gráfico 5. Efecto desarrollado por la Trimetazidina sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) (A); doble producto (DP) (B); Max dP/dt (C) y Min dP/dt (D) en corazones aislados y perfundidos sometidos a I/R. * $p < 0.05$ vs control; $n = 8$

11.1.2. Parámetros hemodinámicos de corazones sometidos a I/R y perfundidos con Nebivolol

La reducción del valor normalizado de la PDVI se observa en el grupo I/R después de inducir la isquemia alcanzando valores de $64.53 \pm 5.94\%$ del efecto cardiaco deseable. La administración del NEB exhibe un comportamiento dosis dependiente, en donde la menor concentración posee el mayor efecto cardioprotector sobre la PDVI. En el **Gráfico 6A** se observa que el valor normalizado de PDVI en el grupo perfundido con NEB $10 \mu\text{M}$, $93.02 \pm 7.44\%$, es cercano al perfil del grupo control ($100 \pm 3.32 \%$). Por otro lado, la perfusión de NEB $25\mu\text{M}$, genera un valor de PDVI de $79.38 \pm 9.95 \%$, aunque este valor es ligeramente mayor que el del grupo I/R, su efecto no es estadísticamente significativo. El efecto beneficioso del NEB sobre el DP no fue evidente a las concentraciones de $10 \mu\text{M}$ ($68.86 \pm 4.00 \%$) y $25 \mu\text{M}$ ($31.71 \pm 5.84 \%$), valores que son más cercanos al grupo I/R, que generó una disminución significativa del valor del DP ($59.95 \pm 8.46 \%$), esto cuando se compara con el grupo control (100 ± 3.85) **(Gráfico 6B)**. Sobre la contractilidad cardiaca, NEB $10 \mu\text{M}$ es capaz de mantener un $92.43 \pm 4.97 \%$ de la capacidad contráctil vs el $60.74 \pm 9.34\%$ que se obtuvo en el grupo I/R. Por su parte, los valores normalizados del Max dP/dt obtenidos de la perfusión con NEB $25 \mu\text{M}$ ($64.02 \pm 14.38\%$), disminuyen significativamente respecto a los los valores del grupo control ($100 \pm 4.23\%$) **(Gráfico 6C)**.

El efecto de la perfusión del betabloqueante sobre la relajación miocárdica genera un $88.67 \pm 3.83\%$ de la relajación observada en el grupo control ($100 \pm 4.06 \%$), el efecto de NEB es dosis dependiente, donde la dosis de $10 \mu\text{M}$ de NEB genera un valor de Min dP/dt de $88.67 \pm 3.83\%$ y la concentración de $25 \mu\text{M}$ de NEB generó un valor estadísticamente muy inferior ($56.87 \pm 9.19\%$) al desarrollado por el del control ($100 \pm 4.06\%$). **(Gráfica 6D)**. Finalmente, la perfusión con NEB $100 \mu\text{M}$ en los corazones abolió casi por completo el desarrollo de la PDVI ($15.16 \pm 7.8\%$), el DP ($1.91 \pm 1.02 \%$), el Max dP/dt ($6.12 \pm 0.32 \%$) y el Min dP/dt ($9.52 \pm 0.4 \%$)

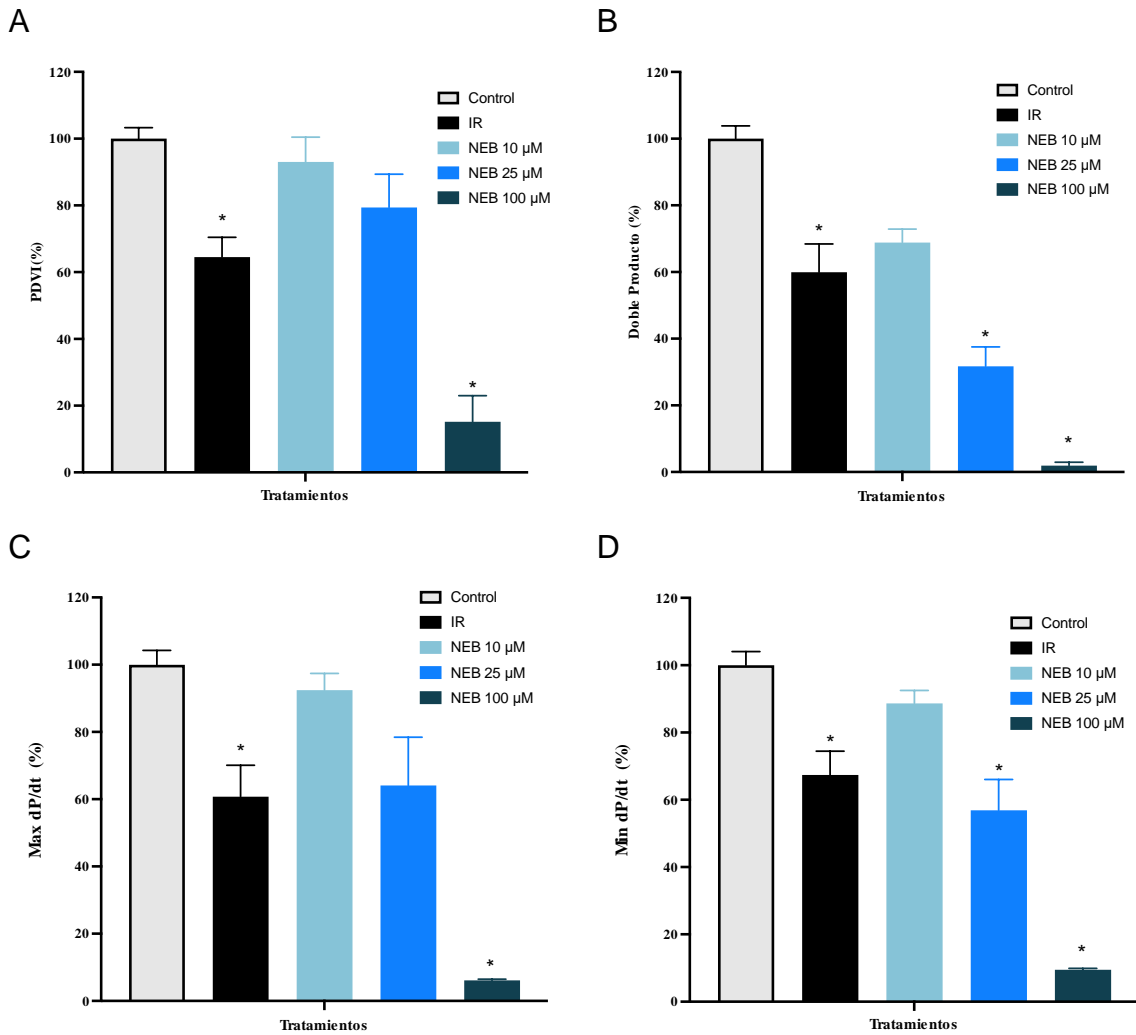


Gráfico 6. Efecto desarrollado por la Nebivolol sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) (A); doble producto (DP) (B); Max dP/dt (C) y Min dP/dt (D) en corazones aislados y perfundidos sometidos a I/R. * $p < 0.05$ vs control; . $n=8$

11.1.3. Parámetros hemodinámicos de corazones sometidos a I/R y perfundidos con Trimetazidina y Nebivolol

Los corazones sometidos a la isquemia por DO alcanzaron un valor normalizado de PDVI de 64.53 ± 3.32 %. El valor normalizado obtenido de la perfusión de la mezcla de los NEB y TMZ generó un valor de PDVI de 90.50 ± 7.94 %, que se asemeja al efecto alcanzado por la perfusión de NEB $10 \mu\text{M}$ (93.02 ± 7.44 %) y ambos son muy cercanos al valor del control (100 ± 3.32 %). Sin embargo, estos se alejan del efecto que se obtuvo al perfundir TMZ $100 \mu\text{M}$ (64.54 ± 14.51 %) (**Gráfico 7A**). En el caso de trabajo cardíaco, el efecto combinado de los fármacos mantiene un comportamiento similar al observado en los efectos de los fármacos individuales. Resultando en que el valor del DP de la combinación fue de 77.34 ± 5.65 %; un valor, que sin ser significativo es mayor al obtenido por NEB $10 \mu\text{M}$ (68.86 ± 4.00 %) o TMZ $100 \mu\text{M}$ (60.54 ± 14.16 %) (**Gráfico 7B**). La acción de NEB y TMZ desarrolló un valor de Max dP/dt de 90.92 ± 8.48 % del valor del grupo control (100 ± 4.23 %) y si se compara con el grupo I/R (60.75 ± 4.34 %) la perfusión de la combinación de fármacos mejoró la contractilidad cardíaca después de la isquemia. Debemos señalar, que el valor del Max dP/dt obtenido con la mezcla de los productos, es similar al presentado con la administración de NEB $10 \mu\text{M}$, desarrollando un valor de Max dP/dt de 92.43 ± 4.97 % (**Gráfico 7C**). Como se observa en el **Gráfico 7D**, la administración conjunta de los fármacos generó un valor de Min dP/dt (95.41 ± 5.39 %), muy cercano al valor del control (100 ± 4.06 %); e incluso mayor al valor de los corazones perfundidos con NEB $10 \mu\text{M}$ (88.67 ± 3.83). Adicionalmente, si se compara el comportamiento del grupo perfundido con la combinación se puede evidenciar una diferencia con los comportamientos del grupo I/R (67.38 ± 7.09 %) y del grupo perfundido con TMZ $100 \mu\text{M}$ (58.66 ± 10.72 %).

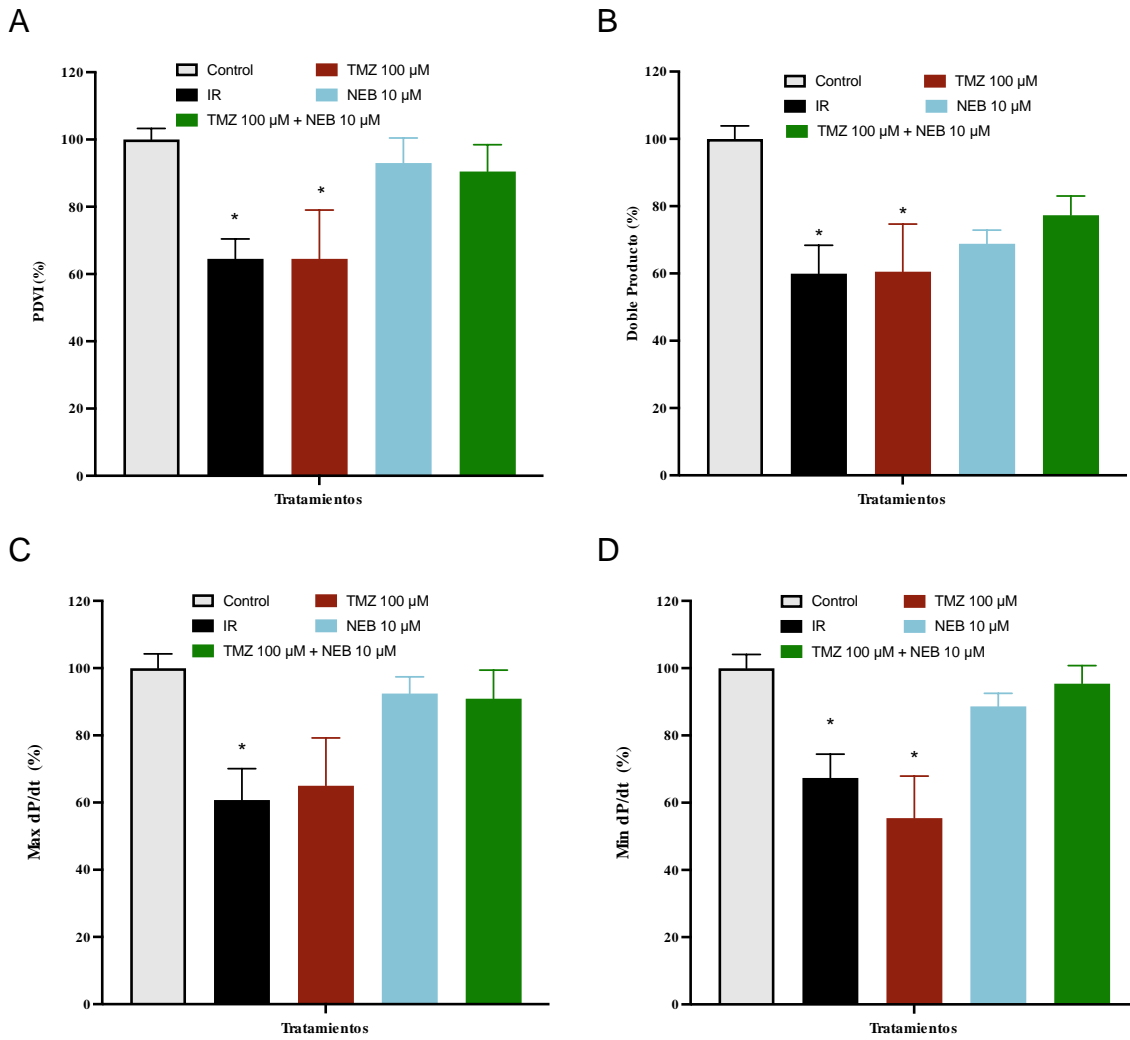


Gráfico 7. Efecto desarrollado por Trimetazidina y Nebivolol sobre la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) (A); doble producto (DP) (B); Max dP/dt (C) y Min dP/dt (D) en corazones aislados y perfundidos sometidos a I/R. * $p < 0.05$ vs control; . $n=8$

12.1.4. Área de infarto

En el **Gráfico 8**, se muestran los resultados del área de infarto obtenidos a partir de la tinción con TTC al 1%. En el grupo control, el área de infarto de infarto fue menor del 7% mientras que el área de infarto en el grupo I/R alcanzo un 51.07 %.

La mayor área de infarto alcanzada fue con NEB 100 μ M siendo esta de un 80.53%. Sin embargo, las menores concentraciones generaron una reducción del área de infarto, de esta forma para NEB 25 μ M el área fue de 33.71% y para NEB 10 μ M fue de 27.55%. El comportamiento en el efecto de la TMZ fue similar al observado con NEB, donde la mayor concentración del fármaco fue la que generó mayor área de infarto (TMZ 100 μ M, 56.16 %) en comparación con la menor concentración (TMZ 25 μ M, 32.24 %). La mezcla de los fármacos logro reducir el área de infarto generada por la I/R hasta valores cercanos a los corazones controles (16.52 % y 6.2%, respectivamente)

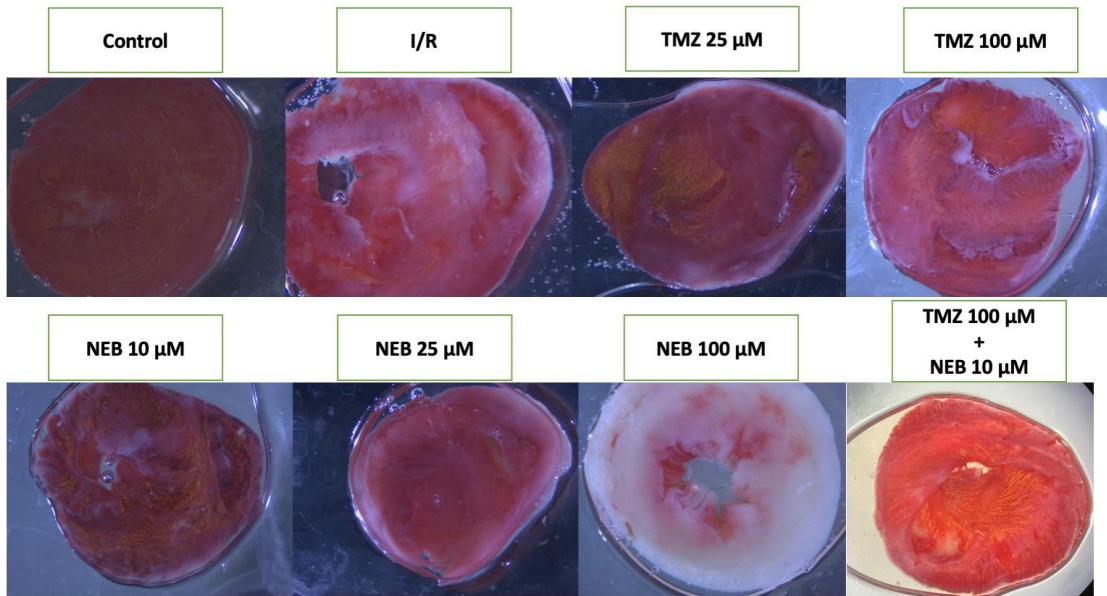
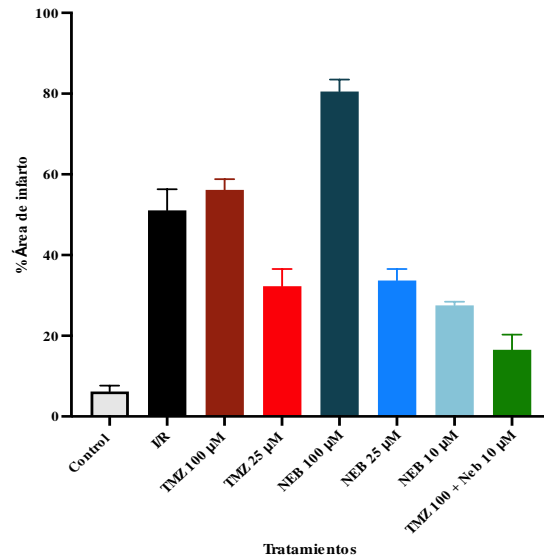


Gráfico 8. Área de infarto desarrolladas por las diferentes intervenciones experimentales. * $p < 0.05$ vs control; . $n = 4$

12. Evaluación de la actividad vascular de Nebivolol y Trimetazidina

12.1. Efecto vascular de Nebivolol y Trimetazidina en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con FE

En el **Gráfico 9** se presentan los resultados obtenidos en este protocolo. Podemos observar que la ACh generó una relajación máxima del 97.05% a la concentración de 1×10^{-4} M. Para el NEB, a esa misma concentración, encontramos una relajación promedio de 94.31%, sin evidenciar diferencias significativas en el efecto máximo entre ambos compuestos. En el caso de las CE_{50} calculadas, obtuvimos valores de 2.532×10^{-6} M para ACh; mientras que para NEB este parámetro fue de 5.795×10^{-6} M, indicando que ambas CE_{50} están en el mismo orden de magnitud. Por su parte, TMZ solo alcanzó una relajación máxima del 37.54 % , a la máxima concentración ensayada (1×10^{-3} M) indicando una muy débil actividad vascular directa en comparación con NEB.

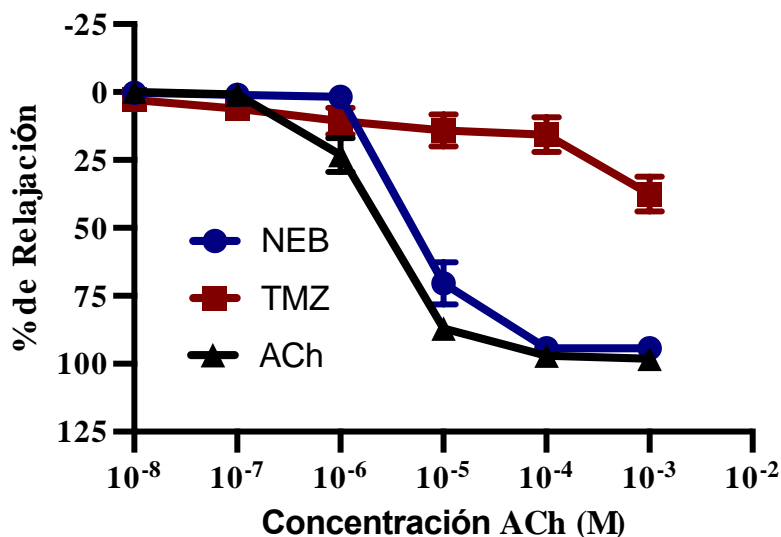


Gráfico 9. Curva concentración-respuesta de NEB, TMZ y ACh (1×10^{-8} a 1×10^{-3} M) evaluadas en anillos de aorta de rata con endotelio intacto (E+) y precontraídos con fenilefrina (FE 1×10^{-6} M). n= 6; $X \pm ES$.

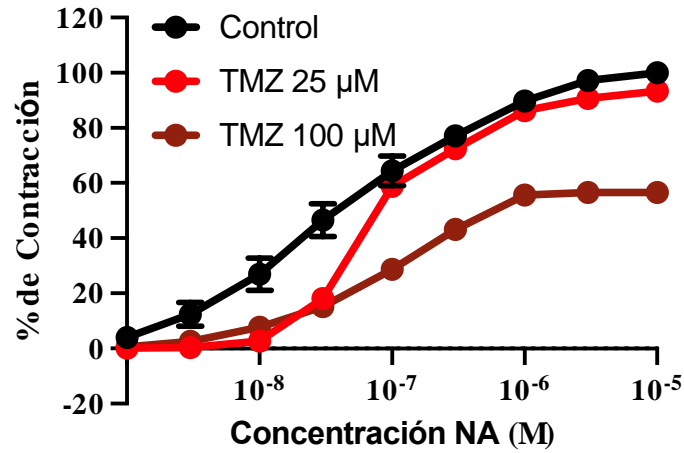
12.2. Efecto de Nebivolol y Trimetazidina sobre la curva concentración-respuesta a noradrenalina en anillos de aorta aislada de rata.

Para este protocolo experimental (**Gráfico 10A**) evaluamos los efectos de la incubación con dos concentraciones de TMZ. Tal y como podemos observar, la adición creciente de NA induce una respuesta vasoconstrictora que alcanza el 100% de eficacia. La incubación con 25 μM de TMZ, previo a la generación de la curva concentración respuesta, causa una reducción de la eficacia máxima del agonista adrenérgico, el cual alcanza un efecto máximo de 93.39%, sin evidenciar diferencias significativas en este parámetro. Sin embargo, para la CE_{50} , de ambas curvas obtuvimos una variación, ya que la CE_{50} de la curva control (NA) fue de 4.20×10^{-8} M mientras que con la incubación esta variable se modificó a un valor de 1.03×10^{-7} M; indicando un ligero desplazamiento de la curva hacia la derecha.

La incubación con TMZ 100 μM , generó una disminución de la contracción máxima inducida por NA, permitiéndole alcanzar una eficacia máxima de 55.70 %. Así mismo, la CE_{50} fue ampliamente modificada alcanzando un valor de 1.10×10^{-6} M; y evidenciando diferencias significativas ($p < 0.05$) en ambos parámetros estudiados, para la incubación con la concentración más alta de TMZ.

Por otra parte, los efectos de la incubación con NEB sobre la respuesta vascular de NA, se resumen en el **Gráfico 10B**. En este grupo de experimentos, pudimos observar que la incubación con ambas concentraciones de NEB (25 y 100 μM) causó una disminución en la contracción máxima inducida por el neurotransmisor y un desplazamiento a la derecha de la curva. Así, al incubar con NEB 25 μM , la eficacia máxima generada fue de 47.49% alcanzando diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, la adición de NEB 100 μM causó una reducción del efecto contráctil de NA, permitiéndole alcanzar un valor de 15.39% y estableciendo también diferencias significativas con respecto a la curva control (sin incubación). Para el caso de la CE_{50} , se observa un incremento de este parámetro con la concentración de NEB 25 μM en relación con el control (3.446×10^{-5} M vs. 4.20×10^{-8} M) mientras que para la incubación con NEB 100 μM , este parámetro no pudo determinarse.

A



B

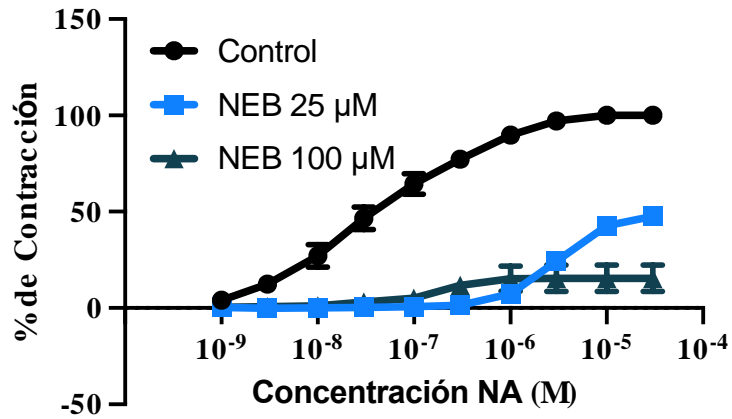


Gráfico 10. Evaluación del efecto inhibitorio de Trimetazidina y Nebivolol (25 y 100 µM) sobre la respuesta contráctil de noradrenalina (1x-10-9 M a 1x10-5 M) en anillos de aorta de ratas con endotelio intacto (E+). n= 6; X±ES.

12.3. Efecto de la combinación Nebivolol y Trimetazidina sobre la curva concentración-respuesta a noradrenalina en anillos de aorta aislada de rata.

Debido a la acciones inhibitorias observadas por la incubación con NEB y TMZ, nos propusimos determinar si la combinación de ambos compuesto podría generar un sinergismo. Los resultados de este protocolo se presentan en el **Gráfico 11**.

Para estos ensayos decidimos emplear una combinación de NEB 25 μM + TMZ 25 μM y NEB 25 μM + TMZ 100 μM . De esta manera, cuando comparamos el efecto generado por las combinaciones de ambos compuestos, podemos determinar que hay modificación significativa en comparación a la respuesta contráctil máxima inducida por NA (control); pero a su vez esta respuesta máxima es similar a la obtenida con la incubación de 100 M de TMZ. Un hallazgo importante que observamos es el hecho que la combinación de ambos fármacos causa un incremento de la CE_{50} y desplazamiento de la curva hacia la derecha (NEB 25 μM + TMZ 25 μM = 1.2×10^{-5} y NEB 25 μM + TMZ 100 μM = 1.34×10^{-5}).

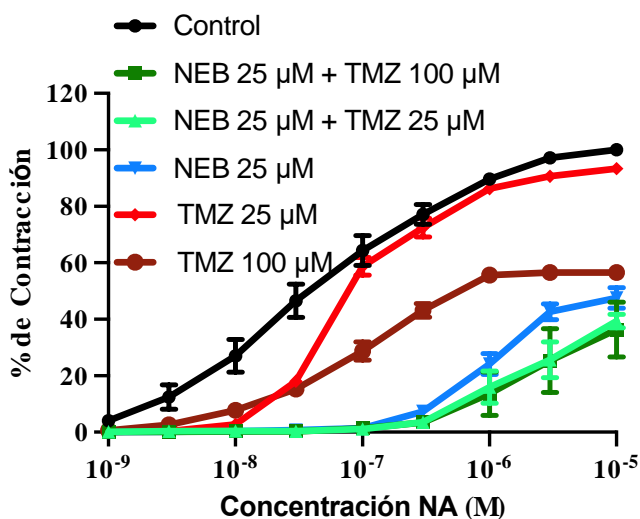


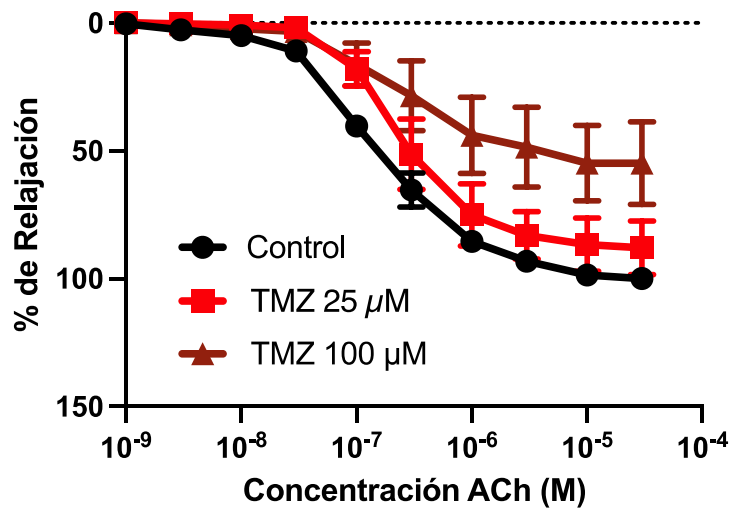
Gráfico 11. Evaluación del efecto inhibitorio de la combinación NEB-TMZ sobre la respuesta contráctil de noradrenalina (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M) en anillos de aorta de ratas con endotelio intacto (E+). $n=6$; $\bar{X} \pm \text{ES}$.

12.4. Efecto de Nebivolol y/o Trimetazidina sobre la relajación inducida por acetilcolina

Los resultados experimentales de esta sección se representan en los **Gráficos 12A y 12B**, en donde podemos observar que la incubación con TMZ 25 μM no indujo diferencias significativas en la CE_{50} comparado con el control (3.71×10^{-7} M y 1.19×10^{-7} M respectivamente). Para la concentración de TMZ 100 μM observamos una disminución significativa del porcentaje de relajación, alcanzando un valor de 55.16 %, comparada con el control ACh (100%) . La CE_{50} para el grupo TMZ 100 μM fue de 1.10×10^{-6} M en comparación con la CE_{50} del grupo control ACh (1.65×10^{-7} M), lo que indica un incremento de este parámetro.

Por su parte, la concentración más baja de NEB (25 μM) no indujo cambios significativos en la relajación de ACh; mientras que la incubación con NEB 100 μM aumentó la relajación inducida por ACh, alcanzando un porcentaje de 190.3 %. En este último caso, el BBA también aumento la potencia vasodilatadora al provocar una CE_{50} menor (5.31×10^{-9} M). que el control ACh. Al comparar el control ACh con NEB 25 μM no se observan diferencias significativas en el porcentaje de relajación comparado con el control. La CE_{50} calculada del Control fue de 1.19×10^{-7} M y de NEB 25 μM fue de 4.37×10^{-8} M (**Gráfico 12B**).

A



B

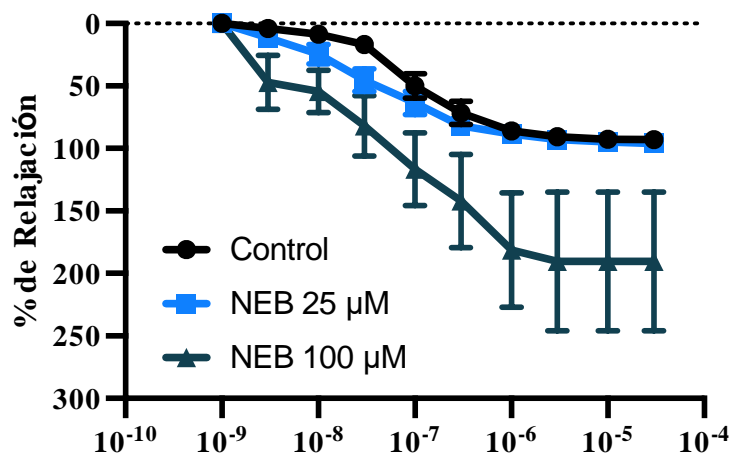


Gráfico 12. Curva dosis respuesta a Acetilcolina (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M), en ausencia y presencia de Trimetazidina y Nebivolol ($25 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$) en anillos de aorta de ratas con endotelio intacto (E+). $n = 6$; $X \pm \text{ES}$.

13. Evaluación de la actividad antioxidante de Nebivolol y Trimetazidina

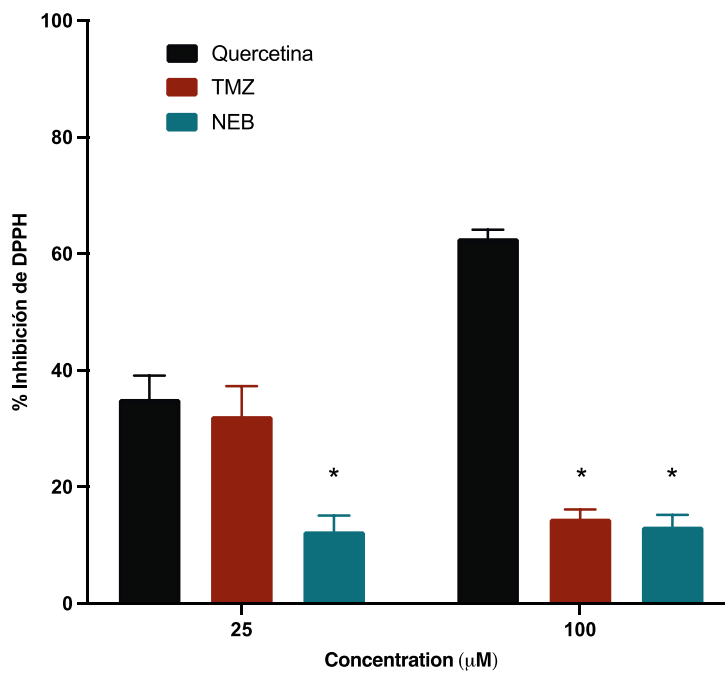
13.1. Actividad antiradicalaria frente a DPPH

El porcentaje de inhibición máximo fue de un 62.69 ± 0.83 % y se alcanzó con el Control positivo (Quercetina) a una concentración de $100 \mu\text{M}$. A la concentración de $25 \mu\text{M}$, el Control positivo (Quercetina), generó un porcentaje de inhibición de 35.10 ± 2.97 %.

Al ensayar la acción antiradicalaria de TMZ frente a DPPH en la concentración de $25 \mu\text{M}$, esta obtuvo un valor similar al Control ($32.15\% \pm 2.97$ %). En cambio, el efecto observado a la concentración de $100 \mu\text{M}$ fue de un 14.56 ± 0.89 %. Por otra parte, independientemente de la concentración ensayada ($25 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$) para NEB, los porcentajes alcanzados fueron similares, siendo estos de 12.38 ± 2.97 % y $14.56 \pm 0.89\%$, respectivamente (**Gráfico 13A**).

De las combinaciones ensayadas, la combinación de TMZ $100 + \text{NEB } 25$ desarrolló una actividad antiradicalaria de un $22.93 \pm 0.77\%$. El resto de las combinaciones generaron una actividad menor, siendo los valores los siguientes: TMZ $25 + \text{NEB } 25 = 15.47 \pm 5.56\%$, TMZ $100 + \text{NEB } 100 = 15.44 \pm 2.6\%$ y TMZ $25 + \text{NEB } 100 = 3.53 \pm 0.71\%$ (**Gráfico 13B**).

A



B

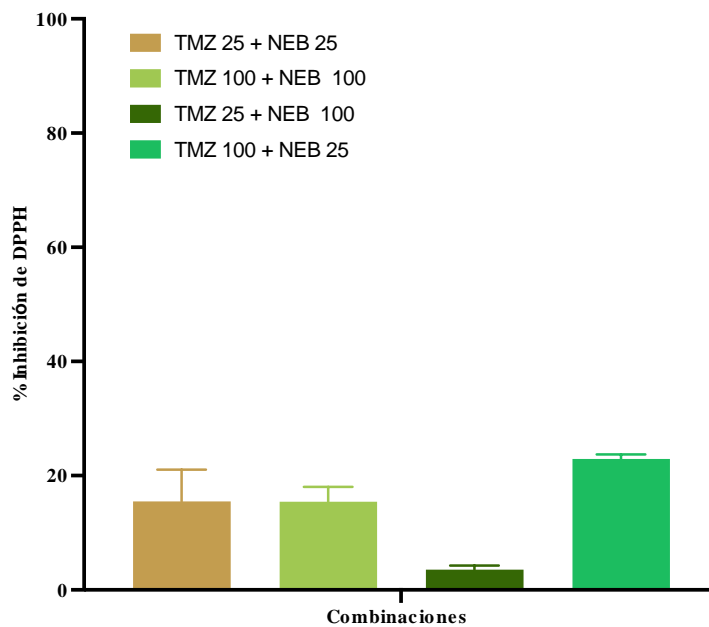


Gráfico 13. Actividad antioxidante de extractos de Nebivolol, Trimetazidina y sus combinaciones frente al radical DPPH. n= 3; X±ES. * p<0.05 vs Quercetina.

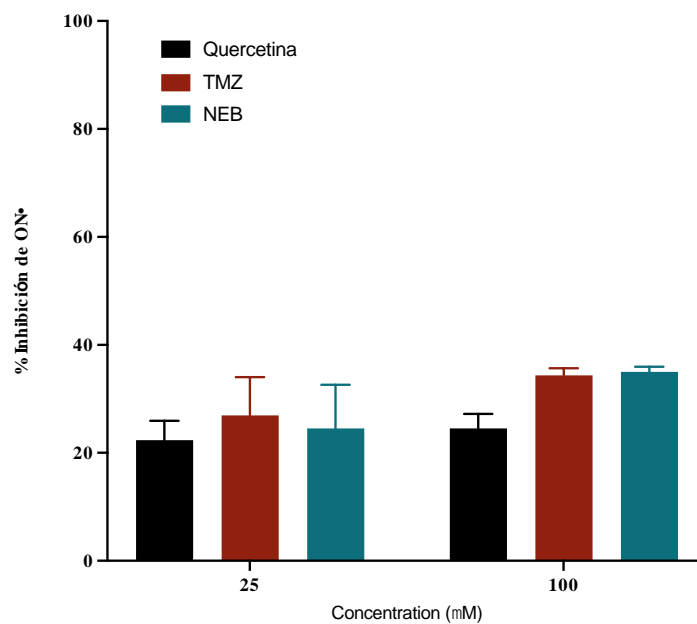
13.2. Actividad antiradicalaria frente a ON●

El Control positivo Quercetina presentó, a la concentración de 25 μ M, un porcentaje de inhibición de 22.37 ± 3.59 %; mientras que la concentración de 100 μ M alcanzó un 24.53 ± 2.65 % de inhibición frente al ON.

La TMZ mostró un efecto antiradicalario de 26.93 ± 7.09 % y 34.35 ± 1.32 %, para las concentraciones de 25 y 100 μ M, respectivamente. Mientras que el efecto alcanzado por el NEB (25 μ M) fue de 24.53 ± 8.08 % y el efecto a la concentración de 100 μ M fue de un 35.66 ± 0.95 %. Para ambas concentraciones, el efecto obtenido al ensayar la concentración de 100 μ M fue mayor al obtenido con el control positivo (Quercetina). En la concentración de 25 μ M los efectos de los fármacos y el control fueron similares (**Gráfico 14A**).

En general, el efecto de las combinaciones un efecto sinérgico de la actividad antiradicalaria, donde, TMZ 100 + NEB 25 generó un 43.95 ± 1.90 %, para TMZ 25 + NEB 100 el efecto fue de 40.46 ± 6.25 % y para TMZ 100 + NEB 100 se alcanzó un efecto de 37.41 ± 6.26 %. Excepto la combinación TMZ 25 + NEB 25 que generó un efecto similar a los observado con NEB y TMZ a la concentración de 100 μ M, que fue de 34.79 ± 6.23 % de efecto normalizado (**Gráfico 14B**).

A



B

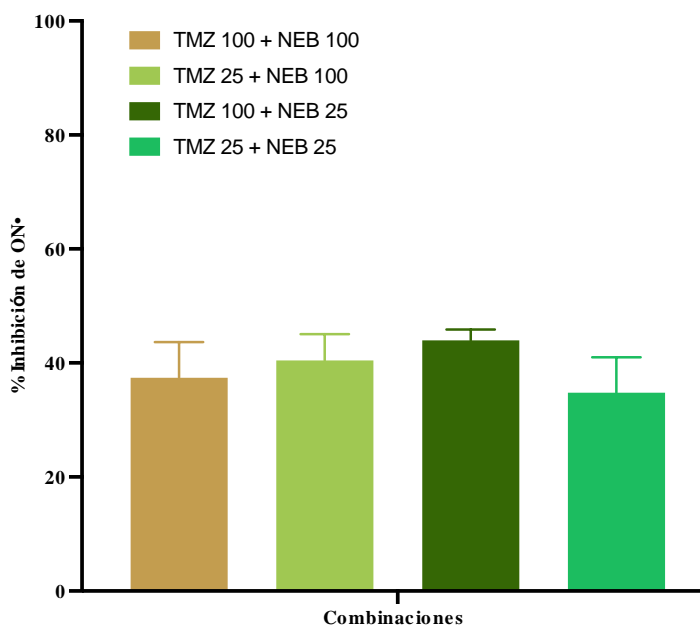
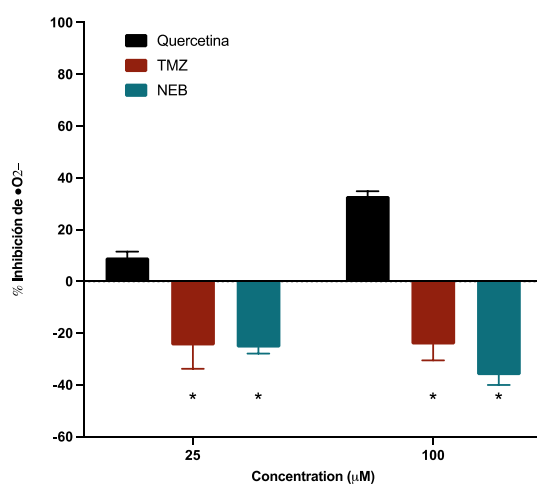


Gráfico 14. Actividad antioxidante de extractos de Nebivolol , Trimetazidina y sus combinaciones frente al radical ON. n= 3; X±ES.* p<0.05 vs Quercetina.

12.1. Actividad antiradicalaria frente a ASO

El porcentaje de inhibición máximo alcanzado que fue de un 33.01 ± 1.82 %, este efecto se obtuvo con Control (Quercetina) 100 μ M. A la concentración de 25 μ M, el control, alcanzó un 9.23 ± 2.30 %. Los fármacos individuales y en combinación no mostraron efecto antiradicalario frente al anión superóxido. (Gráfica 14)

A



B

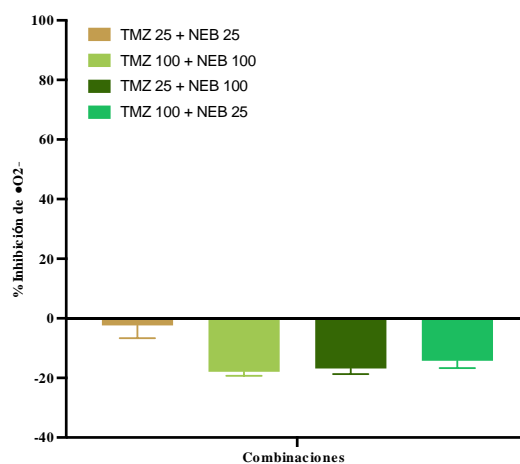


Gráfico 15. Actividad antioxidante de extractos de Nebivolol , Trimetazidina y sus combinaciones frente al radical ASO. $n=3$; $\bar{X} \pm \text{ES}$. * $p < 0.05$ vs Quercetina.

XIV. Discusión

14. Efecto cardioprotector vascular y antioxidante de Trimetazidina

14.1. Efecto cardioprotector

La TMZ es conocida por su función como un fármaco regulador del metabolismo cardíaco y que es eficaz como un agente antianginoso. En la última década, este fármaco ha despertado el interés en los investigadores para demostrar su utilidad en condiciones tanto de isquemia reperfusión, como en la hipoxia y reoxigenación. Entre los estudios publicados en este campo se ha visto que la TMZ es capaz de modular la lesión por la I/R en distintos tejidos y órganos. Un ejemplo de esto son los resultados obtenidos al estudiar la I/R ovárica. En este estudio, la TMZ fue capaz de disminuir el estrés oxidativo y la inflamación, al modular las vías de TLR4 y NF- κ B (Ozturk et al., 2022). Por otra parte, en una investigación de trasplante autólogo de riñón en cerdos, se demostró que cuando TMZ fue agregada a la solución de preservación de riñones, es capaz de disminuir los efectos deletéreos inducidos por el modelo I/R renal en frío; los autores explican este efecto por la capacidad que posee la TMZ de mantener la función mitocondrial de las nefronas (Faure et al., 2003). Mientras que cuando se realizó en estudio empleando el modelo de I/R renal cálida en riñones porcinos, la TMZ fue capaz de reducir el daño temprano y a largo plazo en los riñones isquémicos sometidos a un solo episodio de I/R (Cau et al., 2008; Jayle et al., 2007).

En cuanto a los modelos de hipoxia y reoxigenación celular, la TMZ también ha demostrado eficacia en reducir los daños relacionados a esa condición. El experimento realizado por Yang en el 2015, reveló que la exposición a TMZ es capaz de aumentar la expresión de microRNA-21 en células H9C2 expuestas a la hipoxia / reoxigenación, la exposición a TMZ reguló la actividad de señalización de Akt mediante la supresión de la expresión de la proteína PTEN. El aumento de la actividad de la señalización de Akt disminuyó la relación de Bax/Bcl-2 y la expresión de caspasa-3 y finalmente, inhibió la apoptosis inducida por hipoxia / reoxigenación

(Yang et al., 2015). Un efecto similar fue encontrado en células madre mesenquimales, en donde las células madre pretratadas con TMZ mejoraron su supervivencia frente a estímulos hipóxicos, a través de la regulación ascendente de HIF1- α (Hu et al., 2015). Esta información publicada nos sustenta en gran medida la posibilidad de que la TMZ sea capaz de tener un efecto cardioprotector frente a la I/R. Nuestros hallazgos en el modelo de corazón perfundido sugieren un efecto protector de la TMZ, en especial a la concentración de 25 μ M, frente a los periodos de hipoxia y posterior reperfusión. Aunque en modelos levemente diferentes al nuestro, otros autores también han reportado el efecto protector de la TMZ observado en nuestro estudio. Así, en un estudio que utilizó el modelo de ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, los autores encontraron que la TMZ era capaz de disminuir la apoptosis celular mediante la regulación de la expresión de Bax y Bcl-2 (He et al., 2018)

En otro estudio utilizando el modelo de ligadura de la arteria coronaria en ratones se demostró que la TMZ fue capaz de recuperar la función cardiaca, disminuir la apoptosis y disminuir el trastorno metabólico en corazones isquémicos. Además, se redujo significativamente con este fármaco los niveles de Bax y caspasa-3 escindida y promovió la expresión de Bcl-2. Además, TMZ aumentó la producción de trifosfato de adenosina (ATP) y la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y disminuyó los niveles de lipoperóxidos (LPO), ácidos grasos libres (Raffaella et al.) y ON de una manera dependiente de la concentración. Los autores relacionan estos efectos a la capacidad de la TMZ de activar la vía SIRT1-AMPK (Luo et al., 2021). Distintos estudios han concluido que la administración de TMZ es capaz de promover la activación de la vía AMPK.

Si relacionamos los efectos cardioprotectores con las vías de señalización que son moduladas por la TMZ tenemos que la AMPK, es una proteína que funciona como un sensor energético celular que mide los niveles de AMP. Si la relación AMP/ATP esta aumentada, la AMPK va a desactivar vías anabólicas y a encender vías catabólicas como la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos (Cantó et al., 2009). Molecularmente, la AMPK va a aumentar la expresión de Glut-4 y la inhibición de la acetil coA carboxilasa (ACC). En condiciones de ejercicio, estrés o de isquemia

la AMPK puede activarse como un mecanismo cardioprotector, al aumentar la producción de ATP proveniente de la vía glucolítica y, de esta forma mantener el gradiente electrolítico en las células (Qi & Young, 2015). Adicionalmente, la activación de la AMPK puede activar otras vías de señalización como la sirtruin 1 (SIRT1). La SIRT1, es una histona desacetilasa dependiente de NAD, esta proteína tiene funciones como factor de transcripción y regula funciones neuroendocrinas, protege contra el estrés oxidativo y promueve la estabilidad del ADN (Elibol & Kilic, 2018). La acción protectora de TMZ en las enfermedades cardiovasculares está mediada por una resistencia al estrés oxidativo, que es resultado del aumento de la expresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) mediante la desacetilación de p53 inducida por SIRT1 (Alcendor et al., 2007)

Otros mecanismos propuestos para explicar el efecto cardioprotector durante la I/R han sido establecidos a través de diferentes variaciones experimentales. Así, en un estudio de oclusión coronaria se encontró que la TMZ mejoró la función cardíaca, alivió la lesión miocárdica y el estrés oxidativo, y redujo el área del infarto de miocardio y la apoptosis, estos efectos se lograron mediante la capacidad de la TMZ para inhibir la autofagia excesiva al activar la vía de la Akt/ mTOR. En ese estudio también, se observó que la TMZ era capaz de disminuir el EO cardíaco mediante la disminución de los niveles de ERO y MDA; y un aumento en los niveles plasmáticos de SOD y glutatión peroxidasa. Adicionalmente, el fármaco logro reducir el tamaño de infarto en los corazones expuestos a TMZ. (S. Wu et al., 2018)

Por su parte Khan et al. (2010) al administrar TMZ después de ligar la arteria coronaria y antes de realizar la reperfusión, evidenciaron que el fármaco mejoraba la fracción de eyección y reducía el área de infarto. Esta protección parece estar mediada por la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 y la vía de señalización Akt (Khan et al., 2010). Por su parte, un estudio de I/R con el modelo de ligadura coronaria, encontró que la TMZ fue capaz de proteger significativamente la función cardíaca y reducir el tamaño del infarto en ratas después de una lesión por I/R cardíaca. Además, la TMZ promovió significativamente la expresión de la proteína Akt fosforilada, y redujo la relación Bcl-2 / Bax en ratas después de la lesión

cardíaca (Hollander et al., 2016). Otra vía de señalización modificada por la TMZ es la de Akt-mTOR, la activación de Akt proporciona cardioprotección a través de la regulación de una serie de moléculas de señalización descendente, como eNOS, FOXO, GSK-3b, mTOR entre otras. La sobreexpresión cardíaca de mTOR suprime la necrosis, atenúa la respuesta inflamatoria tras la I/R *ex vivo*. Se ha descrito que mTOR estimula el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular, así como el metabolismo, mediante la regulación de la síntesis de proteínas y lípidos y la inhibición de la autofagia excesiva (Yao et al., 2014). Las diferentes vías de señalización explicadas previamente y que son activadas por parte de la TMZ, sustentan los efectos cardioprotectores de este fármaco en nuestros resultados.

14.2. Vascular

Desde su introducción, aparte de su efecto sobre el metabolismo celular, a TMZ se le ha considerado un fármaco provisto de actividad vasodilatadora, sin embargo, este mecanismo de acción vascular es desconocido y ha sido pobremente estudiado. Los primeros reportes de su actividad vasodilatadora indican un efecto principalmente en venas de diferentes especies (Taira, 1980 #3835;(Mackenzie, 1977 #3834). Otros autores, por su parte han demostrado efecto vasorelajante en arterias, sin generar cambios hemodinámicos significativos, lo que se ha sido asociado a una corta duración del efecto y que se manifiesta independientemente del agente presor empleado en la experimentación (Toda, 1982 #3837;(Garnier, 1985 #3827);(Asano et al., 1983)). Nuestro estudio demuestra un leve efecto vasodilatador, en anillos de aorta de ratas a concentraciones altas; sin embargo, la incubación con TMZ a concentraciones menores de las empleadas en la curva concentración dependiente (100 μ M), generó una inhibición de la contracción inducida por NA. Considerando que NA induce un efecto contráctil por incremento del calcio intracelular y el cual está mediado por diversos mecanismos intracelulares, podríamos sugerir que TMZ podría interferir con ese aumento de calcio intracelular, tal como fue demostrado en estudios de miocitos ventriculares de cobayo (Kiyosue et al., 1986). Esta propiedad relajante y bloqueante de calcio inducida por TMZ ha sido reportada en músculo liso detrusor de rata, donde el fármaco parece inhibir tanto el influjo como el eflujo de calcio a la célula muscular

lisa (Engin et al., 2022). Otros hallazgos realizados en cultivos celulares de HL60, indican que la TMZ suprime canales SOCs (Store-Operated Ca²⁺ channels), corriente que es activada como consecuencia del agotamiento de las reservas del Ca²⁺ del retículo sarcoplasmico/ endoplásmico y cuya existencia ha sido demostrada en diferentes tipos de tejidos incluyendo células vasculares lisas (Baudel et al., 2020). Adicionalmente, se ha demostrado que esta corriente SOCs es activada por receptores acoplados a proteína Gq (Albert & Large, 2003). Considerando que los receptores alfa1-adrenérgicos, diana para la actividad contráctil de NA, utilizan el mecanismo de señalización Gq, todo lo anterior explicaría el efecto observado en nuestros resultados, y que son más intensos durante la pre-incubación que cuando se ha generado la contracción con agonistas de estos receptores, en la cual ya los mecanismos intracelulares están activados. Por otro lado, demostramos que la pre-incubación con TMZ a la mayor concentración empleada (100 uM), causó un deterioro de la relajación inducida por ACh, en anillos de aorta. Debido a que el efecto relajante de este agonista depende de la activación de receptores M3 endoteliales y que están acoplados a proteína Gq, por todo lo expuesto previamente, estos resultados corroboran el efecto inhibitorio que ejerce TMZ sobre las corrientes de calcio, lo que impediría la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) y en consecuencia la relajación. Es importante señalar que para células endoteliales también se ha descrito la existencia de canales SOCs (Moccia et al., 2023), la que podría estar implicada en la acción de TMZ y en consecuencia en los resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo.

14.3. Antioxidante

Nuestro estudio se orientó a identificar la capacidad atrapadora *in-vitro* de la TMZ frente a diferentes radicales libres. Los estudios publicados sobre la capacidad atrapadora de la TMZ se han enfocado en el anión superóxido. En este sentido, la TMZ no generó en nuestro estudio, un porcentaje de inhibición frente al anión superóxido (-24.74 ± 9.04 %). Khan et al, midieron la capacidad antiradicalaria de la TMZ mediante el método de espectroscopia de EPR. Ellos ensayaron la TMZ a una

concentración de 1 mM (1000 μ M, en otras palabras, una concentración 10 veces mayor a la evaluada por nosotros) y obtuvieron un porcentaje de reducción de la señal de DEPMPO-OOH del 20% (Khan et al., 2010). En otro estudio donde utilizaban la misma metodología y concentración de TMZ (1 mM), demostraron que la TMZ no era capaz de inhibir significativamente la señal generada por el anión superóxido, el autor explica este pobre efecto a que estructuralmente el grupo -NH secundario en el anillo de piperazina de la TMZ no posee una buena actividad atrapadora para el anión superóxido (Kalai et al., 2006) . Estos resultados son comparables a los nuestros ya que a pesar de que evalúan concentraciones mayores los efectos de la inhibición del radical libres no son significativos.

Para la capacidad atrapadora frente al DPPH y el óxido nítrico no se encontraron estudios con resultados que evalúen este efecto. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una capacidad antioxidante moderada frente al DPPH (32.1 ± 5.1 %) con TMZ 100 μ M. Frente al óxido nítrico el efecto de la concentración de 100 μ M (34.3 ± 2.3 %) fue mejor que el patrón positivo Quercetina a la misma concentración (24.5 ± 4.6 %).

15. Efecto cardioprotector vascular y antioxidante de Nevibolol

14.1. Efecto cardioprotector

Una de las propiedades descritas experimentalmente para el NEB es su utilidad para disminuir la injuria causada por la I/R de diferentes órganos y tejidos.

Esta característica se ve reflejada en el estudio realizado por Colak y col. en 2020, quienes sugieren que el NEB posee un efecto protector frente a la lesión por I/R inducida por la torsión de ovarios en ratas. Aunque los autores no ahondan en los mecanismos moleculares del efecto protector se lo atribuyen a las propiedades antioxidantes, anti apoptóticas y antiinflamatorias del NEB (Colak et al., 2020). Otro autor que estudió el efecto del NEB en el estrés oxidativo inducido por la torsión testicular en ratas encontró que el NEB es capaz de disminuir el estrés oxidativo y aumentar los niveles de paraoxonasa (marcador del sistema antioxidante del organismo) y la capacidad antioxidante total en el tejido testicular (Yuvanc et al.,

2018). En la I/R cerebral el NEB también ha demostrado eficacia para combatir los mecanismos lesivos involucrados en esta patología, donde el aumento en la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) y la disminución de la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) median un efecto de salvaguarda en este tejido, resaltando que este efecto es dependiente de la dosis. Otros efectos reportados en este mismo estudio para el NEB, reflejan la capacidad de este fármaco en modular a la baja los niveles de MDA, SOD y LDH. Finalmente concluyeron que estos mecanismos comentados permitieron al NEB reducir significativamente el volumen del infarto y aliviar los cambios histopatológicos inducidos por la I/R cerebral (Heeba & El-Hanafy, 2012). Empleando un modelo de oclusión de la aorta abdominal para generar una I/R en vejigas de ratas, se evidenció que el pretratamiento con NEB (0.4 mg/Kg) suprimió el aumento del EO y los niveles de IL-6, donde estas acciones contribuyeron a la mejora de la respuesta contráctil de la vejiga (Altunkaynak-Camca & Yazihan, 2021).

La variedad de estudios donde se evalúa los efectos del NEB sobre la I/R en diferentes tejidos, sustentan la posibilidad de que el NEB sea capaz de disminuir los daños asociados a la I/R en el tejido cardíaco. De las concentraciones de NEB ensayadas en nuestro modelo de corazón aislado sometido a I/R, la de 10 μ M fue la que generó un porcentaje de recuperación mayor del 90 % en los parámetros de PDVI, Max dP/dt y mayor del 85% en el Min dP/dt lo que se traduce en una recuperación de la actividad mecánica cardíaca. En un estudio en corazones de conejos en el modelo de “working heart”, donde se someten los corazones a una isquemia global y posteriormente a una perfusión, el NEB demostró capacidad para recuperar todos los parámetros cardíacos evaluados (Vandeplassche et al., 1991). Cabe resaltar que el DP, con la concentración de NEB 10 μ M, fue el único parámetro cardíaco evaluado en nuestro estudio que presentó un porcentaje de recuperación menor del 70 %. Este resultado se puede explicar por las propiedades farmacológicas del NEB, ya que este fármaco es capaz de disminuir la frecuencia cardíaca y por ende, el valor del DP. Este efecto también fue observado por Vandeplassche, ya que el reportó una disminución de la frecuencia cardíaca con la

perfusión del NEB (Vandeplassche et al., 1991). En otro estudio donde se evaluaba la cardioprotección de antagonistas del receptor β adrenérgico capaces de inhibir las metaloproteinasas como carvedilol y nebibolol, se encontró que el Nebivolol (0.005, 0.05 y 0.5 μ M) mostraba una tendencia no significativa a recuperar la capacidad contráctil y mecánica del corazón (Skrzypiec-Spring et al., 2021)

El NEB también se ha evaluado en un modelo de I/R en animal entero, donde la I/R se realizaba por medio de la oclusión/apertura de la arteria coronaria izquierda y las especies utilizadas fueron ratones C57BL6/J, ratones deficiente de eNOS (eNOS $^{-/-}$) y ratones deficiente de receptor adrenérgico (β_3 -AR $^{-/-}$). En este estudio los autores concluyen que la administración aguda de NEB podría tener aplicación clínica en pacientes que han sufrido una isquemia miocárdica. Los autores atribuyen este efecto a la capacidad del NEB de aumentar la biodisponibilidad del ON al modular la actividad de NOS e mediante el agonismo del receptor adrenérgico β_3 (Aragón et al., 2011). Adicionalmente se ensayó la capacidad del NEB para disminuir la apoptosis en un modelo de I/R en ratas Sprague-Dawley. Los autores encontraron que la administración aguda de NEB disminuía la apoptosis miocárdica al disminuir la formación de peroxinitritos (Mercanoglu et al., 2008). A pesar de que en la actualidad se han realizado pocos estudios que confirmen la eficacia de NEB para reducir los daños relacionados a la I/R cardiaca en diferentes modelos animales; todos los estudios publicados hasta hoy, incluidos nuestros resultados experimentales, han evidenciado la capacidad cardioprotectora del NEB.

Como hemos descrito anteriormente, las propiedades benéficas del NEB evidenciadas en nuestro estudio se pueden asociar a la capacidad del fármaco de aumentar la biodisponibilidad del ON. Entre los mecanismos involucrados en estas acciones podemos mencionar 1) La capacidad del fármaco de inhibir la actividad NOS i y al agotamiento de L-arginina que se produce como resultado de una sobreproducción de ON. Estos dos eventos favorecen la producción de ERO a través de la consecuente formación del peroxinitrito (Mercanoglu et al., 2015), lo que a su vez causa el desacoplamiento de la NOS e ; 2) se ha demostrado que el

NEB es capaz de aumentar la actividad de la NOSe inhibida por el EO durante el periodo de I/R tanto en lechos vasculares como en los miocitos, mejorando la biodisponibilidad del ON (Mercanoglu et al., 2015). Como último mecanismo, 3) mediante el agonismo β_3 , el NEB es capaz de modular la acción de la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn) presente en las terminaciones nerviosas que inervan al corazón. El ON producido por esta isoforma ha demostrado ser capaz de reducir la frecuencia cardiaca (Takimoto et al., 2000) y regular la contracción cardiaca mediante el control del Ca^{2+} (Sears et al., 2003), aunque es claro que este último mecanismo poco influye en los efectos descritos en nuestro modelo experimental. Adicionalmente, el ON generado por la acción del NEB es capaz de actuar de manera directa sobre la mitocondria. En estudios con mitocondrias aisladas, la exposición a ON generó una disminución del daño nitrooxidativo sobre estructuras mitocondriales. Así mismo, el ON también generó la inhibición del complejo IV (Citocromo C oxidasa) y complejo III (Citocromo b y c) (Andreadou et al., 2020). Las altas concentraciones mitocondriales de ON en presencia de pequeñas cantidades de anión superóxido, desencadena en una compleja reacción de varios pasos en la que el ON se convierte en un potente agente nitrosante (N_2O_3), lo que conduce a la S-nitrosilación de proteínas. Durante la isquemia, las proteínas S-nitrosiladas se inactivan, pero también se protegen frente al daño oxidativo irreversible. Luego, durante la reperfusión, debido al aumento de la formación de superóxido, las proteínas S-nitrosiladas pueden desnitrosilarse y recuperar sus estructuras y funciones nativas (Andreadou et al., 2020). Por último, la capacidad del nebivolol, evidenciada en nuestro estudio, de disminuir el área de infarto se ha relacionado con la disminución de la apoptosis durante la I/R. El mecanismo propuesto para explicar también está relacionado con la capacidad del NEB de inhibir la sobreproducción de ON generada por la NOSi y de mejorar la actividad de la NOSe en el miocardio (Mercanoglu et al., 2008; Zhang et al., 2014)

14.2. Efecto Vascular

La capacidad que tiene el NEB para actuar en otros tejidos, como el vascular, nos llevó a evaluar la reactividad vascular de este fármaco, solo y en presencia de ligandos endógenos como ACh y NA. Para la evaluación de la actividad vascular del NEB se realizó una CCR en aorta torácica de rata. En nuestro estudio el NEB en anillos precontractados con FE, generó una vasodilatación dependiente de la concentración. Este efecto vasodilatador del Nebivolol fue descrito desde principios del siglo XXI por Ignarro y colaboradores (2002), quienes reportan que la administración de NEB causó relajación de anillos aislados de arteria coronaria y arteria pulmonar de perro, efectos mediados por mecanismos dependientes del endotelio, como el aumento en la producción de ON y los niveles nucleótidos cíclicos (GMPc) (Ignarro et al., 2002). Este efecto vasodilatador también fue descrito por Wang y colaboradores en el 2009, al demostrar que el NEB generaba una vasodilatación concentración dependiente en aortas aislada de rata, arteria carótida, arteria femoral y arteria renal (Wang et al., 2009). Otros estudios, demostraron que la vasodilatación inducida por NEB es capaz de mantenerse en pacientes con hipertensión arterial o insuficiencia cardiaca a pesar de presentar un deterioro en la función endotelial (de Groot et al., 2007). Al investigar el mediador responsable del aumento del ON, Tran y col. (2009), se propusieron descubrir las dianas farmacológicas involucradas en los mecanismos relajantes del NEB utilizando sus enantiómeros D y L. Sus resultados señalan que el NEB actúa en diferentes objetivos o dianas, así el D-nebivolol induce vasodilatación al activar los receptores β_2 y β_3 adrenérgicos, mientras que el L-nebivolol indujo vasorelajación al activar exclusivamente los receptores β_3 adrenérgicos (Tran Quang et al., 2009).

Cuando se evaluó la interacción del NEB en la construcción de una CCR a NA, en nuestros resultados se evidenció un desplazamiento a la derecha que era dependiente de la concentración de NEB incubado. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Tran y col. (2009), donde encontraron que el NEB era capaz de antagonizar los receptores adrenérgicos α_1 , esto al desplazar significativamente a la derecha CCR de fenilefrina, un agonista α_1 -adrenoceptor, de una manera dependiente de la concentración (Tran Quang et al., 2009). Para

nuestro caso, las concentraciones de NEB fueron mayores (10 y 25 μM) lo que generó un mayor efecto inhibitorio de la contracción inducida por NA.

Otro resultado interesante de nuestro estudio fue la modificación de la relajación inducida por ACh en presencia de incubación con NEB. En esta sección se observó que el β -bloqueante moviliza la curva hacia la izquierda, lo que se traduce en una disminución de la CE_{50} del agonista colinérgico y en un efecto sinérgico. Esta interacción puede explicarse debido a que por un lado la relajación ejercida por ACh es dependiente de la activación de receptores M_3 en el endotelio, los que a su promueven la liberación de ON, mientras que la acción agonista de NEB sobre receptores β_2 y β_3 generaría también el incremento del mediador responsable de la relajación, el ON (Tran Quang et al., 2009). Adicionalmente, existe evidencia que la estimulación de receptores β_2 en el endotelio aumenta la captación de L-arginina, sustrato necesario para la síntesis de ON (Conti et al., 2013).

Por lo discutido anteriormente, el incremento en la biodisponibilidad del ON, tanto en el tejido cardiaco como en el vascular, inducido por la acción del NEB es capaz preparar al corazón y sus mitocondrias, para afrontar los procesos deletéreos de la I/R , reduciendo la apoptosis y mejorando la recuperación del miocardio y la función de bomba.

14.3. Efecto Antioxidante

Otra de las propiedades experimentales descritas para el NEB es su capacidad antioxidante, de ahí que decidiéramos evaluar la capacidad atrapadora del NEB frente a diferentes radicales libres. Para el NEB se ha demostrado su capacidad antioxidante mediante una acción atrapadora de radicales libres (Antoine et al., 2022), en nuestro estudio el NEB demostró una leve actividad antiradicalaria frente al DPPH y al ON. Sin embargo, cuando se evaluó la actividad antiradicalaria frente al O_2^- , se evidencia una pérdida del efecto antioxidante del NEB. Este resultado se puede explicar ya que el NEB en un ambiente con demasiado EO se puede degradar, así como fue evidenciado por De Groot, 2004; al demostrar que la exposición del NEB a ERO causó una disminución en la concentración del NEB en

el medio y por consiguiente, un aumento de un metabolito oxidado del NEB (de Groot et al., 2004).

Un mecanismo antioxidante propuesto para el NEB es su capacidad de donación de protones y estabilización de electrones en membranas lipídicas, interfiriendo así con la formación y propagación de radicales lipídicos (Mason et al., 2006), lo que sustenta el estudio de este compuesto en modelos de lipoperoxidación. Cabe destacar que la capacidad antioxidante del NEB no solo depende de su capacidad antiradicalaria directa, ya que posee una serie de mecanismos que involucran desde la inhibición de la actividad y expresión de la NADPH oxidasa y su consecuente disminución de la producción de O_2^- (Soares et al., 2019) hasta la disminución del desacople y aumento de la actividad de la eNOS, lo que resulta en un aumento en la biodisponibilidad de ON (Antoine, 2022; Li, 2013). Estas razones sustentan las intenciones de continuar el estudio de la actividad antioxidante del NEB en modelos *ex vivo* o *in vivo*.

16. Efecto cardioprotector vascular y antioxidante del tratamiento combinado Nevibolol y Trimetazidina

Poder encontrar un fármaco o una combinación de fármacos, ya sean nuevos o conocidos, que sean capaces de pre/post acondicionar al miocardio frente al daño por I/R, se vuelve relevante en nuestra realidad (Mewton et al., 2011).

El instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (NHBLI, por sus siglas en inglés) recomienda que en los estudios preclínicos enfocados a la cardioprotección farmacológica de los daños relacionados a I/R se enfoquen en definir intervenciones cardioprotectoras efectivas y el momento apropiado para su administración; mediante la evaluación de la eficacia de terapias combinadas en comparación con las terapias individuales (Schwartz Longacre et al., 2011).

Cabe resaltar que este es el primer estudio que considera evaluar ambos fármacos en el modelo de I/R en el corazón aislado. Nuestros resultados sugieren que la

mezcla de NEB y TMZ es capaz de generar una mejora en los parámetros cardiacos medidos durante el experimento. Sin embargo, esa mejoría no es significativamente mayor que la producida por los acciones individuales de cada fármaco. Este efecto evidenciado en los experimentos de corazón aislados parece estar comandado principalmente por la acción del NEB. Por lo que su actividad como agonista β_2 y β_3 con el consecuente aumento de la biodisponibilidad de ON y la estabilización de la NADPH oxidasa parecen jugar un papel más inmediato en la cardioprotección que la manipulación del metabolismo cardiaco y la activación de vías de señalización relacionadas como AMPK- SIRT-1, Akt-mTOR, p38, etc.

Para las acciones vasculares, la combinación de fármacos fue capaz desplazar incrementar la CE_{50} y desplazar significativamente a la derecha la CCR de NA. Este desplazamiento fue significativamente mayor que lo alcanzado por TMZ y levemente mayor que lo observado con NEB. Nosotros teorizamos que el efecto antagonista α_1 del NEB, el aumento del ON vascular y la reducción de radicales libres se sinergizan con la capacidad de la TMZ de interferir con el aumento del calcio intracelular y de esta manera reducir la respuesta del tejido a la NA.

Finalmente, para ambos fármacos está bien descrita su capacidad antioxidante, estas acciones cobran relevancia en sistemas *in-vivo*, donde estos fármacos pueden modular sistemas enzimáticos como la NADPH oxidasa y los complejos mitocondriales que participan en la respiración celular. Los capacidad antiradicalaria evidenciada para la mezcla de NEB y TMZ, no es significativamente mayor que los porcentajes de inhibición particulares de cada fármaco. Este resultado se fundamenta en que, si nos basamos en sus estructuras química, ningún fármaco posee una estructura química que sea capaz de amortiguar la cantidad de radicales libres que se inducen en los modelos de actividad antioxidante puramente químicos, por lo que no es posible llegar a una conclusión definitiva en relación con las posibles propiedades antioxidantes *in vivo* que puedan tener la combinación de estos dos agentes.

XV. Conclusiones

A partir de este trabajo de investigación podemos concluir:

1. Los tratamientos individuales de NEB y TMZ generan un efecto cardioprotector; sin embargo, cuando se administran ambos fármacos el efecto cardioprotector no se potencia.
2. Las concentraciones más bajas de NEB y TMZ fueron las que más redujeron el área de infarto, y la combinación de estos fue más eficaz en disminuir el infarto.
3. Ambos fármacos pueden modular las acciones vasculares de ligandos fisiológicos como lo son la NA y la ACh. Adicionalmente, al realizar la CCR de cada fármaco, estos fueron capaces de generar una vasodilatación.
4. Tanto NEB como TMZ tienen pobre capacidad antioxidante directa, ya que ningún fármaco posee una estructura ideal para la captación de radicales libres.

XVI. Referencias

- Albert, A. P., & Large, W. A. (2003). Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 33(5-6), 345-356. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(03\)00048-4](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(03)00048-4)
- Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*, 100(10), 1512-1521. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000267723.65696.4a>
- Alexander, E. D., Aldridge, J. L., Burleson, T. S., & Frasier, C. R. (2022). Teriflunomide treatment exacerbates cardiac ischemia reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*. <https://doi.org/10.1007/s10557-022-07341-z>
- Altunkaynak-Camca, H. O., & Yazihan, N. (2021). The pretreatment of rats with nebivolol ameliorates bladder contractile dysfunction caused by ischemia-reperfusion injury. *Low Urin Tract Symptoms*, 13(1), 183-188. <https://doi.org/10.1111/luts.12338>
- 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. *J Cell Mol Med*, 24(12), 6510-6522. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15279>
- Andrienko, T. N., Pasdois, P., Pereira, G. C., Ovens, M. J., & Halestrap, A. P. (2017). The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. *J Mol Cell Cardiol*, 110, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.06.016>
- Antoine, M. H., Husson, C., Yankep, T., Mahria, S., Tagliatti, V., Colet, J. M., & Nortier, J. (2022). Protective Effect of Nebivolol against Oxidative Stress Induced by Aristolochic Acids in Endothelial Cells. *Toxins (Basel)*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/toxins14020132>
- Aragón, J. P., Condit, M. E., Bhushan, S., Predmore, B. L., Patel, S. S., Grinsfelder, D. B., Gundewar, S., Jha, S., Calvert, J. W., Barouch, L. A., Lavu, M., Wright, H. M., & Lefer, D. J. (2011). Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *J Am Coll Cardiol*, 58(25), 2683-2691. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.033>
- Asano, M., Ohkubo, C., & Sawanobori, K. (1983). Vasodilator effect of trimetazidine on cutaneous microcirculation of normal conscious rabbits. *Jpn J Pharmacol*, 33(4), 891-893. <https://doi.org/10.1254/jjp.33.891>
- Baudel, M., Shi, J., Large, W. A., & Albert, A. P. (2020). Insights into Activation Mechanisms of Store-Operated TRPC1 Channels in Vascular Smooth Muscle. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010179>
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 50, pp. 940-950).
- Bordicchia, M., Pocognoli, A., D'Anzeo, M., Siquini, W., Minardi, D., Muzzonigro, G., Dessì-Fulgheri, P., & Sarzani, R. (2014). Nebivolol induces, via β₃ adrenergic receptor, lipolysis, uncoupling protein 1, and reduction of lipid droplet size in human adipocytes. *J Hypertens*, 32(2), 389-396. <https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000000024>

- Borghetti, G., von Lewinski, D., Eaton, D. M., Sourij, H., Houser, S. R., & Wallner, M. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. Beyond Glycemic Control. *Front Physiol*, 9, 1514. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01514>
- Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 76(5), 1713-1719. <https://doi.org/10.1172/jci112160>
- Buja, L. M. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*, 14(4), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.03.006>
- Bulluck, H., Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2016). Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart*, 102(5), 341-348. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307855>
- Cadenas, S. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radical Biology and Medicine*, 117(January), 76-89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024>
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056-1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Cassar, A., Holmes, D. R., Jr., Rihal, C. S., & Gersh, B. J. (2009). Chronic coronary artery disease: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc*, 84(12), 1130-1146. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0391>
- Castrejón-Téllez, V., Del Valle-Mondragón, L., Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., Pastelín-Hernández, G., Ruiz-Ramírez, A., Díaz-Juárez, J. A., Varela-López, E., Oidor-Chan, V. H., Vargas-González, A., Martínez-Memije, R., Flores-Chávez, P., León-Ruíz, B., Arriaga-Carrillo, S., & Torres-Narváez, J. C. (2022). TRPV1 Contributes to Modulate the Nitric Oxide Pathway and Oxidative Stress in the Isolated and Perfused Rat Heart during Ischemia and Reperfusion. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031031>
- Cau, J., Favreau, F., Tillement, J. P., Lerman, L. O., Hauet, T., & Goujon, J. M. (2008). Trimetazidine reduces early and long-term effects of experimental renal warm ischemia: a dose effect study. *J Vasc Surg*, 47(4), 852-860. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2007.10.036>
- Chazelas, P., Steichen, C., Favreau, F., & et al. (2021). Oxidative stress evaluation in ischemia reperfusion models: Characteristics, limits and perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, pp. 1-21): MDPI AG.
- Cheema, Y., Sherrod, J. N., Zhao, W., Zhao, T., Ahokas, R. A., Sun, Y., Gerling, I. C., Bhattacharya, S. K., & Weber, K. T. (2011). Mitochondriocentric pathway to cardiomyocyte necrosis in aldosteronism: cardioprotective responses to carvedilol and nebivolol. *J Cardiovasc Pharmacol*, 58(1), 80-86. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31821cd83c>
- Chen, A., Li, W., Chen, X., Shen, Y., Dai, W., Dong, Q., Li, X., Ou, C., & Chen, M. (2016). Trimetazidine attenuates pressure overload-induced early cardiac energy dysfunction via regulation of neuropeptide Y system in a rat model of abdominal aortic constriction. *BMC Cardiovasc Disord*, 16(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12872-016-0399-8>
- Chen, X., Xia, X., Dong, T., Lin, Z., Du, L., & Zhou, H. (2022). Trimetazidine Reduces Cardiac Fibrosis in Rats by Inhibiting NOX2-Mediated Endothelial-to-

- Mesenchymal Transition. *Drug Des Devel Ther*, 16, 2517-2527. <https://doi.org/10.2147/dddt.S360283>
- Colak, S., Gurlek, B., Topcu, A., Tumkaya, L., Mercantepe, T., & Yilmaz, A. (2020). Protective effects of nebivolol on ovarian ischemia-reperfusion injury in rat. *J Obstet Gynaecol Res*, 46(11), 2407-2416. <https://doi.org/10.1111/jog.14503>
- Conti, V., Russomanno, G., Corbi, G., Izzo, V., Vecchione, C., & Filippelli, A. (2013). Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. *Front Physiol*, 4, 321. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00321>
- Coutinho, D. C. O., Santos-Miranda, A., Joviano-Santos, J. V., Foureaux, G., Santos, A., Rodrigues-Ferreira, C., Martins-Júnior, P. A., Resende, R. R., Medei, E., Vieyra, A., Santos, R. A. S., Cruz, J. S., & Ferreira, A. J. (2022). Diminazene Aceturate, an angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activator, promotes cardioprotection in ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Peptides*, 151, 170746. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170746>
- de Groot, A. A., Mathy, M. J., van Zwieten, P. A., & Peters, S. L. (2004). Antioxidant activity of nebivolol in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43(1), 148-153. <https://doi.org/10.1097/00005344-200401000-00022>
- de Groot, A. A., Mathy, M. J., van Zwieten, P. A., & Peters, S. L. (2007). Vasodilator effects of nebivolol in a rat model of hypertension and a rabbit model of congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 50(1), 56-60. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3180587e35>
- de Nigris, F., Rienzo, M., Schiano, C., Fiorito, C., Casamassimi, A., & Napoli, C. (2008). Prominent cardioprotective effects of third generation beta blocker nebivolol against anthracycline-induced cardiotoxicity using the model of isolated perfused rat heart. *Eur J Cancer*, 44(3), 334-340. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.12.010>
- Dedkova, E. N., Seidlmayer, L. K., & Blatter, L. A. (2013). Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 59, 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.016>
- Di Lisa, F., & Bernardi, P. (2006). Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res*, 70(2), 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.01.016>
- Di Napoli, P., Chierchia, S., Taccardi, A. A., Grilli, A., Felaco, M., De Caterina, R., & Barsotti, A. (2007). Trimetazidine improves post-ischemic recovery by preserving endothelial nitric oxide synthase expression in isolated working rat hearts. *Nitric Oxide*, 16(2), 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.09.001>
- do Vale, G. T., da Silva, C. B. P., Sousa, A. H., Gonzaga, N. A., Parente, J. M., Araújo, K. M., Castro, M. M., & Tirapelli, C. R. (2021). Nebivolol Prevents Up-Regulation of Nox2/NADPH Oxidase and Lipoperoxidation in the Early Stages of Ethanol-Induced Cardiac Toxicity. *Cardiovasc Toxicol*, 21(3), 224-235. <https://doi.org/10.1007/s12012-020-09614-1>
- do Vale, G. T., Simplicio, J. A., Gonzaga, N. A., Yokota, R., Ribeiro, A. A., Casarini, D. E., de Martinis, B. S., & Tirapelli, C. R. (2018). Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis*, 274, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.041>

- Elibol, B., & Kilic, U. (2018). High Levels of SIRT1 Expression as a Protective Mechanism Against Disease-Related Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 614. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00614>
- Engin, S., Kaya Yasar, Y., Barut, E. N., Getboga, D., Erac, Y., & Sezen, S. F. (2022). The inhibitory effect of trimetazidine on detrusor contractility - a potential repositioning of trimetazidine for the treatment of overactive bladder. *J Pharm Pharmacol*, 74(1), 94-102. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab072>
- Faure, J. P., Baumert, H., Han, Z., Goujon, J. M., Favreau, F., Dutheil, D., Petit, I., Barriere, M., Tallineau, C., Tillement, J. P., Carretier, M., Mauco, G., Papadopoulos, V., & Hauet, T. (2003). Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: targeting inflammation and nephron mass. *Biochem Pharmacol*, 66(11), 2241-2250. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.07.011>
- Ferraro, E., Giammarioli, A. M., Caldarola, S., Lista, P., Feraco, A., Tinari, A., Salvatore, A. M., Malorni, W., Berghella, L., & Rosano, G. (2013). The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes. *Febs j*, 280(20), 5094-5108. <https://doi.org/10.1111/febs.12484>
- Grandi, E., & Ripplinger, C. M. (2019). Antiarrhythmic mechanisms of beta blocker therapy. *Pharmacol Res*, 146, 104274. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104274>
- Grebe, A., Hoss, F., & Latz, E. (2018). NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circ Res*, 122(12), 1722-1740. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.311362>
- Guan, X., Lu, C., Shang, B., Zhao, Y., Meng, Y., & Zhang, Z. (2020). Nebivolol combined with tetrahydrobiopterin affects diastolic function in spontaneously hypertensive rats via the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signalling pathway. *BMC Pharmacol Toxicol*, 21(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s40360-020-00460-z>
- Guarini, G., Huqi, A., Morrone, D., Capozza, P. F. G., & Marzilli, M. (2018). Trimetazidine and Other Metabolic Modifiers. *Eur Cardiol*, 13(2), 104-111. <https://doi.org/10.15420/ecr.2018.15.2>
- Gunata, M., & Parlakpınar, H. (2021). A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. *Cell Biochem Funct*, 39(2), 190-217. <https://doi.org/10.1002/cbf.3587>
- Guo, B., Cao, J., Liu, Y., Wang, Y., Qian, Y., Chen, G., & Zhu, W. (2022). Cardiac Protection of a Novel Lupane-Type Triterpenoid from Injuries Induced by Hypoxia-Reperfusion. *Int J Mol Sci*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169473>
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 92-100. <https://doi.org/10.1172/jci62874>
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2016). Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nature Reviews Cardiology*, 13(4), 193-209. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.5>

- He, C., Cao, S., Tong, Z., Wang, W., Zhang, Y., & Guo, C. (2018). Trimetazidine ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Pak J Pharm Sci*, 31(4(Special)), 1691-1696. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30203764>
- Heeba, G. H., & El-Hanafy, A. A. (2012). Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci*, 90(11-12), 388-395. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.001>
- Herr, D. J., Aune, S. E., & Menick, D. R. (2015). Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. *J Vis Exp*(101), e52908. <https://doi.org/10.3791/52908>
- Heusch, G. (2020). Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol*, 17(12), 773-789. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0403-y>
- Hohensinner, P. J., Lenz, M., Haider, P., Mayer, J., Richter, M., Kaun, C., Goederle, L., Brekalo, M., Salzmann, M., Sharma, S., Fischer, M. B., Stojkovic, S., Ramsdayer, D., Hengstenberg, C., Podesser, B. K., Huber, K., Binder, C. J., Wojta, J., & Speidl, W. S. (2021). Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation reduces atherosclerosis progression by suppression of macrophage NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Pharmacol*, 190, 114634. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114634>
- Hollander, M. R., De Waard, G. A., Konijnenberg, L. S. F., Meijer-Van Putten, R. M. E., Van Den Brom, C. E., Paauw, N., De Vries, H. E., Van De Ven, P. M., Aman, J., Van Nieuw-Amerongen, G. P., Hordijk, P. L., Niessen, H. W. M., Horrevoets, A. J. G., & Van Royen, N. (2016). Dissecting the effects of ischemia and reperfusion on the coronary microcirculation in a rat model of acute myocardial infarction. *PLoS ONE*, 11(7), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157233>
- Honka, H., Solis-Herrera, C., Triplitt, C., Norton, L., Butler, J., & DeFronzo, R. A. (2021). Therapeutic Manipulation of Myocardial Metabolism: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*, 77(16), 2022-2039. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.02.057>
- Hu, X., Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y., Li, M., Shen, Z., & Hui, J. (2015). Mesenchymal stem cells preconditioned with trimetazidine promote neovascularization of hearts under hypoxia/reoxygenation injury. *Int J Clin Exp Med*, 8(9), 16991-17005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629255>
- Ibanez, B., Vilahur, G., & Badimon, J. J. (2007). Plaque progression and regression in atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 292-299. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02483.x>
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Trinh, K., Sisodia, M., & Buga, G. M. (2002). Nebivolol: a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide*, 7(2), 75-82. [https://doi.org/10.1016/s1089-8603\(02\)00112-x](https://doi.org/10.1016/s1089-8603(02)00112-x)
- Ito, W. D., Schaarschmidt, S., Klask, R., & et al. (1997). *Infarct Size Measurement by Triphenyltetrazolium Chloride Staining Versus In Vivo Injection of Propidium Iodide* (Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Issue).
- Jayle, C., Favreau, F., Zhang, K., Doucet, C., Goujon, J. M., Hebrard, W., Carretier, M., Eugene, M., Mauco, G., Tillement, J. P., & Hauet, T. (2007). Comparison

- of protective effects of trimetazidine against experimental warm ischemia of different durations: early and long-term effects in a pig kidney model. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(3), F1082-1093. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00338.2006>
- Jia, G., Hill, M. A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*, 122(4), 624-638. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.311586>
- Kalai, T., Khan, M., Balog, M., Kutala, V. K., Kuppusamy, P., & Hideg, K. (2006). Structure-activity studies on the protection of Trimetazidine derivatives modified with nitroxides and their precursors from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Bioorg Med Chem*, 14(16), 5510-5516. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.04.040>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kamp, O., Metra, M., Bugatti, S., Bettari, L., Dei Cas, A., Petrini, N., & Dei Cas, L. (2010). Nebivolol: haemodynamic effects and clinical significance of combined beta-blockade and nitric oxide release. *Drugs*, 70(1), 41-56. <https://doi.org/10.2165/11530710-000000000-00000>
- Kantor, P. F., Lucien, A., Kozak, R., & Lopaschuk, G. D. (2000). The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res*, 86(5), 580-588. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.5.580>
- Khan, M., Meduru, S., Mostafa, M., Khan, S., Hideg, K., & Kuppusamy, P. (2010). Trimetazidine, administered at the onset of reperfusion, ameliorates myocardial dysfunction and injury by activation of p38 mitogen-activated protein kinase and Akt signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 333(2), 421-429. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.165175>
- Khan, M. U., Zhao, W., Zhao, T., Al Darazi, F., Ahokas, R. A., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Gerling, I. C., & Weber, K. T. (2013). Nebivolol: a multifaceted antioxidant and cardioprotectant in hypertensive heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 62(5), 445-451. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182a0b5ff>
- Kiyosue, T., Nakamura, S., & Arita, M. (1986). Effects of trimetazidine on action potentials and membrane currents of guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 18(12), 1301-1311. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(86\)80433-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(86)80433-3)
- Kolwicz, S. C., Jr., Purohit, S., & Tian, R. (2013). Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*, 113(5), 603-616. <https://doi.org/10.1161/circresaha.113.302095>
- Kolwicz, S. C., & Tian, R. (2010). Assessment of cardiac function and energetics in isolated mouse hearts using ³¹P NMR spectroscopy. *J Vis Exp*(42). <https://doi.org/10.3791/2069>
- Kozlovski, V. I., Lomnicka, M., Bartus, M., Sternak, M., & Chlopicki, S. (2015). Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of β 2 receptors and COX-2/PGI2 pathways. *Pharmacol Rep*, 67(5), 1041-1047. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.008>

- Kwong, J., & Molkenin, J. (2015). Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. In *Cell Metabolism* (Vol. 21, pp. 206-214): Cell Press.
- Lanas, F., Serón, P., & Lanás, A. (2013). Coronary heart disease and risk factors in latin america. *Glob Heart*, 8(4), 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2013.11.005>
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflüger, Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Thiere*, 61(6), 291-232. <https://doi.org/doi:10.1007/bf01812150>
- Liao, R., Podesser, B. K., & Lim, C. C. (2012). The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(2), H156-167. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00333.2012>
- Lindsey, M. L., Bolli, R., Canty, J. M., Du, X. J., Frangogiannis, N. G., Frantz, S., Gourdie, R. G., Holmes, J. W., Jones, S. P., Kloner, R. A., Lefer, D. J., Liao, R., Murphy, E., Ping, P., Przyklenk, K., Recchia, F. A., Longacre, L. S., Ripplinger, C. M., Van Eyk, J. E., & Heusch, G. (2018). Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 314(4), H812-H838. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00335.2017>
- Lionetti, V., Stanley, W. C., & Recchia, F. A. (2011). Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc Res*, 90(2), 202-209. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr038>
- Lipsic, E., & van Veldhuisen, D. J. (2010). Nebivolol in chronic heart failure: current evidence and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother*, 11(6), 983-992. <https://doi.org/10.1517/14656561003694650>
- Liu, W., Huang, L., Liu, X., Zhu, L., Gu, Y., Tian, W., Zhang, L., Deng, S., & Yu, T. (2022). Urocortin I Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Sustaining Respiratory Function and Cardiolipin Content via Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel Opening. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 7929784. <https://doi.org/10.1155/2022/7929784>
- Liu, Y., & Zhang, J. (2015). Nox2 contributes to cardiac fibrosis in diabetic cardiomyopathy in a transforming growth factor- β dependent manner. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(9), 10908-10914.
- Liu, Z., Chen, J. M., Huang, H., Kuznicki, M., Zheng, S., Sun, W., Quan, N., Wang, L., Yang, H., Guo, H. M., Li, J., Zhuang, J., & Zhu, P. (2016). The protective effect of trimetazidine on myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK and ERK signaling pathway. *Metabolism*, 65(3), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.022>
- Lopaschuk, G. D., Barr, R., Thomas, P. D., & Dyck, J. R. (2003). Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circ Res*, 93(3), e33-37. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000086964.07404.a5>
- Lu, H. R., Remeysen, P., & De Clerck, F. (1994). Antiarrhythmic effects of nebivolol in experimental models in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*, 24(6), 986-993. <https://doi.org/10.1097/00005344-199424060-00018>

- Luo, X. Y., Zhong, Z., Chong, A. G., Zhang, W. W., & Wu, X. D. (2021). Function and Mechanism of Trimetazidine in Myocardial Infarction-Induced Myocardial Energy Metabolism Disorder Through the SIRT1-AMPK Pathway. *Front Physiol*, 12, 645041. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.645041>
- Mahfoudh-Boussaid, A., Hadj Ayed Tka, K., Zaouali, M. A., Roselló-Catafau, J., & Ben Abdennebi, H. (2014). Effects of trimetazidine on the Akt/eNOS signaling pathway and oxidative stress in an in vivo rat model of renal ischemia-reperfusion. *Ren Fail*, 36(9), 1436-1442. <https://doi.org/10.3109/0886022x.2014.949765>
- Malakar, A. K., Choudhury, D., Halder, B., Paul, P., Uddin, A., & Chakraborty, S. (2019). A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J Cell Physiol*, 234(10), 16812-16823. <https://doi.org/10.1002/jcp.28350>
- Marzilli, M., Vinereanu, D., Lopaschuk, G., Chen, Y., Dalal, J. J., Danchin, N., Etriby, E., Ferrari, R., Gowdak, L. H., Lopatin, Y., Milicic, D., Parkhomenko, A., Pinto, F., Ponikowski, P., Seferovic, P., & Rosano, G. M. C. (2019). Trimetazidine in cardiovascular medicine. *Int J Cardiol*, 293, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.05.063>
- Mason, R. P., Kubant, R., Jacob, R. F., Walter, M. F., Boychuk, B., & Malinski, T. (2006). Effect of nebivolol on endothelial nitric oxide and peroxynitrite release in hypertensive animals: Role of antioxidant activity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 48(1), 862-869. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000238593.67191.e2>
- McCarthy, C. P., Mullins, K. V., & Kerins, D. M. (2016). The role of trimetazidine in cardiovascular disease: beyond an anti-anginal agent. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2(4), 266-272. <https://doi.org/10.1093/ehjcvp/pvv051>
- Mercanoglu, G., Safran, N., Ahishali, B. B., Uzun, H., Yalcin, A., & Mercanoglu, F. (2015). Nitric oxide mediated effects of nebivolol in myocardial infarction: the source of nitric oxide. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(24), 4872-4889. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744880>
- Mercanoglu, G., Safran, N., Gungor, M., Pamukcu, B., Uzun, H., Sezgin, C., Mercanoglu, F., & Fici, F. (2008). The effects of nebivolol on apoptosis in a rat infarct model. *Circ J*, 72(4), 660-670. <https://doi.org/10.1253/circj.72.660>
- Mewton, N., Elbaz, M., Piot, C., & Ovize, M. (2011). Infarct size reduction in patients with STEMI: why we can do it! *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 16(3-4), 298-303. <https://doi.org/10.1177/1074248411412379>
- Moccia, F., Brunetti, V., Perna, A., Guerra, G., Soda, T., & Berra-Romani, R. (2023). The Molecular Heterogeneity of Store-Operated Ca(2+) Entry in Vascular Endothelial Cells: The Different roles of Orai1 and TRPC1/TRPC4 Channels in the Transition from Ca(2+)-Selective to Non-Selective Cation Currents. *Int J Mol Sci*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043259>
- Olawi, N., Krüger, M., Grimm, D., Infanger, M., & Wehland, M. (2019). Nebivolol in the treatment of arterial hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 125(3), 189-201. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13248>
- Ong, S. B., Samangouei, P., Kalkhoran, S. B., & Hausenloy, D. J. (2015). The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.005>

- Ovide-Bordeaux, S., Bescond-Jacquet, A., & Grynberg, A. (2005). Cardiac mitochondrial alterations induced by insulin deficiency and hyperinsulinaemia in rats: targeting membrane homeostasis with trimetazidine. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32(12), 1061-1070. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04293.x>
- Ozturk, A., Topcu, A., Deniz, E., Duman Ozturk, S., Arpa, M., & Kutlu Yilmaz, E. (2022). The protective effects of trimetazidine against ovary ischemia-reperfusion injury via the TLR4/Nf-kB signal pathway. *J Biochem Mol Toxicol*, 36(8), e23114. <https://doi.org/10.1002/jbt.23114>
- Pagan, E., Chatenoud, L., Rodriguez, T., Bosetti, C., Levi, F., Malvezzi, M., La Vecchia, C., Negri, E., & Bertuccio, P. (2017). Comparison of Trends in Mortality from Coronary Heart and Cerebrovascular Diseases in North and South America: 1980 to 2013. *Am J Cardiol*, 119(6), 862-871. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.11.040>
- Pantos, C., Bescond-Jacquet, A., Tzeis, S., Paizis, I., Mourouzis, I., Moraitis, P., Malliopoulou, V., Politi, E. D., Karageorgiou, H., Varonos, D., & Cokkinos, D. V. (2005). Trimetazidine protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury in an experimental timing-dependent manner. *Basic Res Cardiol*, 100(2), 154-160. <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0505-4>
- Piper, H. M., García-Dorado, D., & Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 38(2), 291-300. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00033-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00033-9)
- Pombal, S., Hernandez, Y., Diez, D., Mondolis, E., Mero, A., Morin-Pinzon, J., Guerrero, E. I., & Rodilla, J. M. (2017). Antioxidant Activity of Carvone and Derivatives against Superoxide Ion. *Nat Prod Commun*, 12(5), 653-655. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30496668>
- Pombal, S., Roncero, A., Tobal, I., García, N., Silva, L. c., Diez, D., Mondolis, E., Mero, A., Morán-Pinzón, J., Guerrero, E., & Rodilla, J. (2020). Antioxidant Activity of New Carvone Derivatives. *Natural Product Communications*, 15(2), 1-6 <https://doi.org/10.1177/1934578X20908081>
- Qi, D., & Young, L. H. (2015). AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab*, 26(8), 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.05.010>
- Raedschelders, K., Ansley, D. M., & Chen, D. D. Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 133, pp. 230-255).
- Raffaella, R., Claudia, P., Sandra, C., & et al. (2006). Ischemic postconditioning: an effective strategy of myocardial protection? *Giornale italiano di cardiologia*, 7,7, 464-473.
- Ralapanawa, U., & Sivakanesan, R. (2021). Epidemiology and the Magnitude of Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome: A Narrative Review. *J Epidemiol Glob Health*, 11(2), 169-177. <https://doi.org/10.2991/jeqh.k.201217.001>
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340(2), 115-126. <https://doi.org/10.1056/nejm199901143400207>
- Salud, M. d. (2019). Indicadores básicos de salud en la Republica de Panamá. In.

- Schwartz Longacre, L., Kloner, R. A., Arai, A. E., Baines, C. P., Bolli, R., Braunwald, E., Downey, J., Gibbons, R. J., Gottlieb, R. A., Heusch, G., Jennings, R. B., Lefer, D. J., Mentzer, R. M., Murphy, E., Ovize, M., Ping, P., Przyklenk, K., Sack, M. N., Vander Heide, R. S., . . . Yellon, D. M. (2011). New horizons in cardioprotection: recommendations from the 2010 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. *Circulation*, 124(10), 1172-1179. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.032698>
- 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. *Circ Res*, 92(5), e52-59. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000064585.95749.6D>
- Shu, H., Hang, W., Peng, Y., Nie, J., Wu, L., Zhang, W., Wang, D. W., & Zhou, N. (2021). Trimetazidine Attenuates Heart Failure by Improving Myocardial Metabolism via AMPK. *Front Pharmacol*, 12, 707399. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.707399>
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 55(2), 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>
- Skrzypiec-Spring, M., Urbaniak, J., Sapa-Wojciechowska, A., Pietkiewicz, J., Orda, A., Karolko, B., Danielewicz, R., Bil-Lula, I., Wozniak, M., Schulz, R., & Szelag, A. (2021). Matrix Metalloproteinase-2 Inhibition in Acute Ischemia-Reperfusion Heart Injury-Cardioprotective Properties of Carvedilol. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/ph14121276>
- Soares, R. O. S., Losada, D. M., Jordani, M. C., Évora, P., & Castro-E-Silva, O. (2019). Ischemia/reperfusion injury revisited: An overview of the latest pharmacological strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205034>
- Sorriento, D., De Luca, N., Trimarco, B., & Iaccarino, G. (2018). The Antioxidant Therapy: New Insights in the Treatment of Hypertension. *Front Physiol*, 9, 258. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00258>
- Takimoto, Y., Aoyama, T., Keyamura, R., Shinoda, E., Hattori, R., Yui, Y., & Sasayama, S. (2000). Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol*, 76(2-3), 135-145. [https://doi.org/10.1016/s0167-5273\(00\)00394-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5273(00)00394-6)
- Tang, S. G., Liu, X. Y., Wang, S. P., Wang, H. H., Jovanović, A., & Tan, W. (2019). Trimetazidine prevents diabetic cardiomyopathy by inhibiting Nox2/TRPC3-induced oxidative stress. *J Pharmacol Sci*, 139(4), 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.01.016>
- Toblli, J. E., DiGennaro, F., Giani, J. F., & Dominici, F. P. (2012). Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. *Vasc Health Risk Manag*, 8, 151-160. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s20669>
- Tran Quang, T., Rozec, B., Audigane, L., & Gauthier, C. (2009). Investigation of the different adrenoceptor targets of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta.

- Br J Pharmacol*, 156(4), 601-608. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00074.x>
- Türck, P., Nemec-Bakk, A., Talwar, T., Suntres, Z., Belló-Klein, A., da Rosa Araujo, A. S., & Khaper, N. (2022). Blueberry extract attenuates norepinephrine-induced oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiac cells. *Mol Cell Biochem*, 477(3), 663-672. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04313-z>
- Vandeplassche, G., Lu, H. R., Wouters, L., Flameng, W., & Borgers, M. (1991). Normothermic ischemic cardiac arrest in the isolated working rabbit heart: effects of dl-nebivolol and atenolol. *Basic Res Cardiol*, 86(1), 21-31. <https://doi.org/10.1007/BF02193868>
- Virdis, A., Ghiadoni, L., & Taddei, S. (2011). Effects of antihypertensive treatment on endothelial function. *Curr Hypertens Rep*, 13(4), 276-281. <https://doi.org/10.1007/s11906-011-0207-x>
- Wang, F., Wang, H., Liu, X., & et al. (2021). Neuregulin-1 alleviate oxidative stress and mitigate inflammation by suppressing NOX4 and NLRP3/caspase-1 in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25, 1783-1795. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16287>
- Wang, Y., Zhang, F., Liu, Y., Yin, S., Pang, X., Li, Z., & Wei, Z. (2017). Nebivolol alleviates aortic remodeling through eNOS upregulation and inhibition of oxidative stress in I-NAME-induced hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 39(7), 628-639. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1306539>
- Wang, Y., Zhang, M., Liu, Y., Li, J., Song, E., Niu, L., & Cheng, N. (2009). Neither K⁺ channels nor PI3K/Akt mediates the vasodilative effect of nebivolol on different types of rat arteries. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 14(4), 332-338. <https://doi.org/10.1177/1074248409350138>
- Wang, Z., Wu, G., Liu, H., & et al. (2017). Cardioprotective effect of the xanthenes from *Gentianella acuta* against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 626-635. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.06.068>
- Wehland, M., Grosse, J., Simonsen, U., Infanger, M., Bauer, J., & Grimm, D. (2012). The effects of newer beta-adrenoceptor antagonists on vascular function in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*, 10(3), 378-390. <https://doi.org/10.2174/157016112799959323>
- Wong, G. W., Boyda, H. N., & Wright, J. M. (2016). Blood pressure lowering efficacy of beta-1 selective beta blockers for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), Cd007451. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007451.pub2>
- Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., & et al. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1650-1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., Li, C. Y., & Li, C. J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*, 46(4), 1650-1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Wu, S., Chang, G., Gao, L., Jiang, D., Wang, L., Li, G., Luo, X., Qin, S., Guo, X., & Zhang, D. (2018). Trimetazidine protects against myocardial

- ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy. *J Mol Med (Berl)*, 96(8), 791-806. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1664-3>
- Xiang, Y. L., He, L., Xiao, J., Xia, S., Deng, S. B., Xiu, Y., & She, Q. (2012). Effect of trimetazidine treatment on the transient outward potassium current of the left ventricular myocytes of rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*, 45(3), 205-211. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500019>
- Yan, H. F., Tuo, Q. Z., Yin, Q. Z., & Lei, P. (2020). The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zoological Research*, 41(3), 220-230. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042>
- Yang, M., Linn, B. S., Zhang, Y., & Ren, J. (2019). Mitophagy and mitochondrial integrity in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865(9), 2293-2302. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.05.007>
- Yang, Q., Yang, K., & Li, A. Y. (2015). Trimetazidine protects against hypoxia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by increasing microRNA-21 expression. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(4), 3735-3741. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097555>
- Yang, Y., Li, N., Chen, T., Zhang, C., Liu, L., Qi, Y., & Bu, P. (2019). Trimetazidine ameliorates sunitinib-induced cardiotoxicity in mice via the AMPK/mTOR/autophagy pathway. *Pharm Biol*, 57(1), 625-631. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1657905>
- Yao, H., Han, X., & Han, X. (2014). The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Am J Cardiovasc Drugs*, 14(6), 433-442. <https://doi.org/10.1007/s40256-014-0089-9>
- Yao, M., Wang, Z., Jiang, L., Wang, L., Yang, Y., Wang, Q., Qian, X., Zeng, W., Yang, W., Liang, R., & Qian, J. (2022). Oxytocin ameliorates high glucose- and ischemia/reperfusion-induced myocardial injury by suppressing pyroptosis via AMPK signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 153, 113498. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113498>
- Yuvanc, E., Tuglu, D., Ozan, T., Kisa, U., Balci, M., Batislam, E., & Yilmaz, E. (2018). Investigation of the antioxidant effects of pheniramine maleate and nebivolol on testicular damage in rats with experimentally induced testis torsion. *Acta Cir Bras*, 33(2), 125-133. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180020000004>
- Zhang, L., Ding, W. Y., Wang, Z. H., Tang, M. X., Wang, F., Li, Y., Zhong, M., Zhang, Y., & Zhang, W. (2016). Early administration of trimetazidine attenuates diabetic cardiomyopathy in rats by alleviating fibrosis, reducing apoptosis and enhancing autophagy. *J Transl Med*, 14(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0849-1>
- Zhang, Z., Ding, L., Jin, Z., Gao, G., Li, H., Zhang, L., Lu, X., Hu, L., Lu, B., Yu, X., & Hu, T. (2014). Nebivolol protects against myocardial infarction injury via stimulation of beta 3-adrenergic receptors and nitric oxide signaling. *PLoS ONE*, 9(5), e98179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098179>
- Zhao, L. (2019). Protective effects of trimetazidine and coenzyme Q10 on cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Anatol J Cardiol*, 22(5), 232-239. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2019.83710>

- Zheng, S., Du, Y., Peng, Q., Fan, X., Li, J., & Chen, M. (2018). Trimetazidine Protects Against Atherosclerosis by Changing Energy Charge and Oxidative Stress. *Med Sci Monit*, 24, 8459-8468. <https://doi.org/10.12659/msm.911317>
- Zhong, Y., Zhong, P., He, S., Zhang, Y., Tang, L., Ling, Y., Fu, S., Tang, Y., Yang, P., Luo, T., Chen, B., Chen, A., & Wang, X. (2017). Trimetazidine Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Promoting AMP-activated Protein Kinase-dependent Autophagic Flux. *J Cardiovasc Pharmacol*, 69(6), 389-397. <https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000487>
- Zimmer, H. G. (2000). Modifications of the isolated frog heart preparation in Carl Ludwig's Leipzig Physiological Institute: Relevance for cardiovascular research. *Canadian Journal of Cardiology*, 16(1).
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909-950. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00026.2013>