

# EFFECTOS DEL POSACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN CORAZONES AISLADOS DE MACHOS Y HEMBRAS

## EFFECTS OF ISCHEMIC POSTCONDITIONING ON ISOLATED HEARTS OF MALES AND FEMALES

SERGIO SCURI<sup>1</sup>, ALEJANDRO CIOCCI PARDO<sup>2</sup>, SUSANA MOSCA<sup>3</sup>

### RESUMEN

Nuestro objetivo fue determinar los efectos del posacondicionamiento isquémico (PCI) sobre las alteraciones miocárdicas producidas por la isquemia-reperusión en ratas Wistar macho (M) y hembra (H). Los corazones aislados y perfundidos por el sistema de Langendorff, fueron asignados a los grupos: 1) Control no isquémico (C): perfusión durante 90 minutos (min); 2) Control isquémico (CI): 30 min de isquemia global (IG) y 60 min de reperusión (R); 3) PCI: 3 ciclos de 30 segundos (s) de IG y 30 s de R se aplicaron al inicio de R. Se midió el tamaño del infarto (TI). La función sistólica se evaluó a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y la velocidad máxima de ascenso de la presión (+dP/dt<sub>max</sub>); la diastólica a través de la velocidad máxima de descenso de la presión (-dP/dt<sub>max</sub>), el tiempo hasta la mitad de la relajación (t50), la constante de tiempo de relajación (τ) y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI). En CI el TI fue mayor en M que en H (40 ± 2% vs. 29 ± 4%, p<0,05). Los valores de PDVI y +dP/dt<sub>max</sub> fueron 19 ± 4% y 23 ± 5% en M y de 55 ± 3% y 59 ± 7% en H (p<0,05). La -dP/dt<sub>max</sub> fue 21 ± 4% para M y 54 ± 7% para H (p<0,05) y la PDFVI fue 50 ± 4 mmHg para M y 26 ± 8 mmHg para H (p<0,05). El t50 no mostró cambios: aumentó a los 5 y 10 min de R y se normalizó al final de R sólo en M. El PCI disminuyó el TI en M y H (16 ± 1% y 15 ± 1%, p<0,05), pero aumentó la recuperación posisquémica de la función miocárdica sólo en M. Estos resultados muestran que: 1) el TI fue menor y la recuperación contráctil posisquémica fue mayor en H que en M; 2) el PCI disminuyó el TI en M y H, pero mejoró la respuesta contráctil posisquémica sólo en M. Estos datos sugieren que el PCI es una herramienta cardioprotectora más efectiva en M que en H.

**Palabras clave:** isquemia, reperusión miocárdica, macho, hembra.

### ABSTRACT

Our objective was to determine the effects of ischemic postconditioning (IPC) on myocardial alterations caused by ischemia-reperfusion in male (M) and female (F) young adult (4-5 months old) Wistar rats. After a 20-min stabilization period, isolated hearts perfused by the Langendorff system were assigned to the following experimental groups: 1) Non-ischemic control (NIC): perfusion for 90 min; 2) Ischemic control (IC): 30-min global ischemia (GI) and 60-min reperfusion (R); 3) IPC: 3 cycles of 30 sec of GI and 30 sec of R at the beginning of R. Infarction size (IS) was determined by TTC staining technique. Systolic function was assessed by the developed pressure of left ventricle (LVDP) and the maximum rate of rise of left ventricular pressure (+dP/dt<sub>max</sub>). Diastolic function was measured using the maximum rate of decrease of left ventricular pressure (-dP/dt<sub>max</sub>), half-relaxation time (t50), time constant of relaxation (τ) and left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) as an index of diastolic stiffness. In the IC group the IS was significantly higher in M than F (40 ± 2% vs. 29 ± 4%, respectively; p<0.05). At the end of R, LVDP and +dP/dt<sub>max</sub> were higher in F compared to M. The values were 19 ± 4% and 23 ± 5% for M and 55 ± 3% and 59 ± 7% for F (p<0.05). Similarly the -dP/dt<sub>max</sub> was higher in F than M (54 ± 7% and 21 ± 4%, respectively; p<0.05). LVEDP was 50 ± 4 mmHg for M and 26 ± 8 mmHg for F (p<0.05). t50 did not change in M and F, increased at 5 and 10 min of R and normalized at the end of R only in M. IPC significantly decreased IS in hearts from both sexes (16 ± 1% and 15 ± 1% for M and F, respectively) but increased the post-ischemic recovery of systolic and diastolic myocardial function only in M. These results show that in Wistar rats young adults: 1) IS and post-ischemic myocardial function was significantly higher in M than F; 2) IPC decreased IS in hearts from both sexes; 3) IPC improved post-ischemic recovery of myocardial function in M but did not modify it in F. These data suggest that IPC is a more effective cardioprotective tool in M than in F.

**Keywords:** ischemia, myocardial reperfusion, male, female.

REVISTA CONAREC 2017;33(138):43-47 | VERSIÓN WEB WWW.REVISTACONAREC.COM.AR

### INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad isquémica es la causa más frecuente de muerte en hombres y mujeres, y es responsable de más de la mitad de todos los eventos cardiovasculares<sup>1</sup>.

Estudios epidemiológicos muestran que en la mujer premenopáusia el comienzo de la enfermedad isquémica cardíaca ocurre, en promedio, 10 años más tarde que en el hombre, teniendo lugar el infarto miocárdico 20 años después<sup>2,3</sup>. A pesar de estos datos, existe escasa información sobre la respuesta del miocardio a una lesión aguda de isquemia-reperusión en hombres y mujeres<sup>4,5</sup>. A nivel experimental, en la mayoría de las investigaciones se muestra que los corazones de animales machos son menos resistentes a los eventos isquémicos<sup>6-8</sup>. El posacondicionamiento isquémico (PCI), propuesto por Zhao et al. es una estrategia de protección que se basa en que la aplicación de episodios breves de isquemia-reperusión al comienzo de la reperusión disminuiría las alteraciones posisquémicas. El PCI representa una estrategia extrapolable al ámbito clínico, particularmente a pacientes con un infarto agudo de miocardio sometidos a terapias de reperusión<sup>9,10</sup>. Numerosos trabajos realizados en distintos modelos experimentales en animales machos proponen al PCI como una herramienta para disminuir la muerte celular posisquémica. En una revisión reciente se mencionan estos estudios y se analizan los posibles meca-

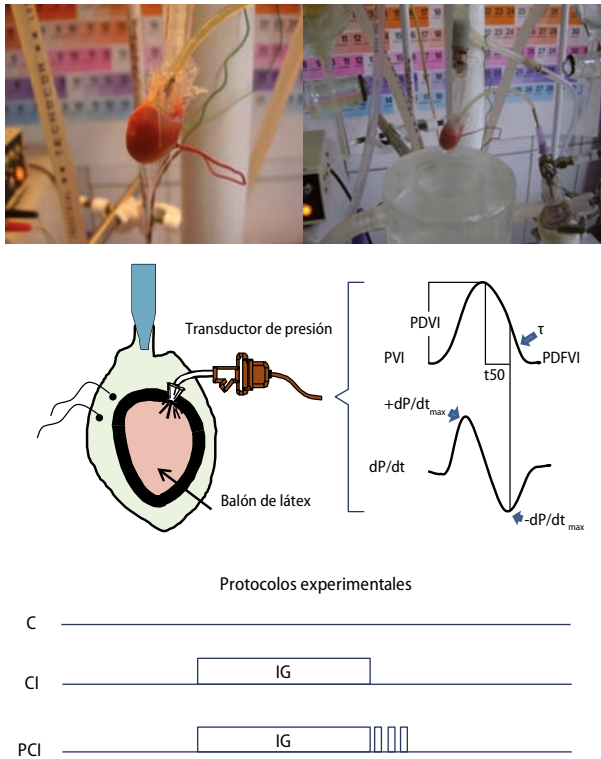
1. Residente del Hospital Italiano
2. Becario doctoral de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
3. Investigador Independiente del Consejo nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Centro de Investigaciones Cardiovasculares "Dr Horacio E. Cingolani", Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, 60 y 120. La Plata, Rep. Argentina

✉ **Correspondencia:** Sergio Raúl Scuri, 64 N° 820 e/ 11 y 12, Piso 8 dto.: 2, código postal 1900, sergioscuri@hotmail.com.

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 08/11/2016 | Aceptado: 15/01/2017



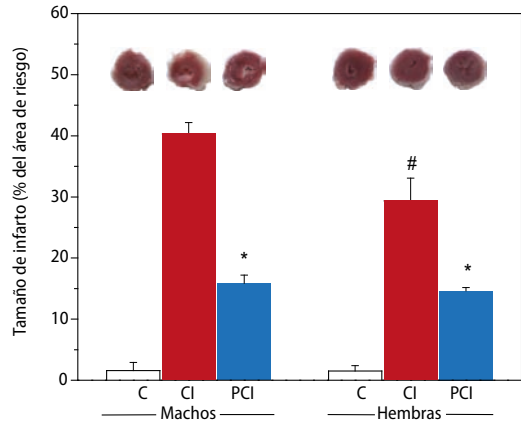
**Figura 1.** Esquema del preparado y de los protocolos experimentales. C: control. CI: control isquémico. PCI: posacondicionamiento isquémico. IG: isquemia global. PDI: presión ventrículo izquierdo. PDVI: presión diastólica ventrículo izquierdo. PDFVI: presión diastólica final del ventrículo izquierdo.

nismos responsables de la cardioprotección dada por el PCI<sup>11</sup>. Sin embargo, los datos bibliográficos acerca de los efectos del PCI en animales hembra no son concluyentes.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar la función sistólica y diastólica de corazones aislados de ratas Wistar macho y hembra sometidos a 30 min de isquemia global y 60 min de reperusión; y 2) evaluar los efectos del PCI en los corazones de ambos sexos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar machos (M) y hembras (H) de 4-5 meses de vida de las cuales, una vez anestesiadas, se aisló la aorta y a través de una cánula se conectó a un sistema de perfusión de Langendorff. El corazón fue perfundido con una solución de Ringer compuesta por: ClNa 120 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 1,35 mM, ClK 4,7 mM, SO<sub>4</sub>Mg 1,2 mM, CO<sub>3</sub>HNa 20 mM y glucosa 11,1 mM, termostatzada a 37°C y equilibrada a pH=7,40. La frecuencia cardíaca se mantuvo constante en un valor de 280 ± 10 lat/min. Para evaluar la actividad mecánica se colocó un balón de látex en el ventrículo izquierdo y se conectó a un transductor de presión (AD Instruments) que permitió medir la presión del ventrículo izquierdo (PVI) (**Figura 1**). El globo de látex se llenó con un volumen de agua suficiente para lograr una presión diastólica final (PDFVI) entre 8-12 mmHg. La presión de perfusión coronaria fue ajustada a valores entre 60 y 75 mmHg y el flujo coronario entre 10 y 12 ml/min. La PVI fue adquirida usando un conversor analógico-digital y el programa de adquisición Chart V4.2.3 (AD Instruments).



**Figura 2.** Trozos de corazones representativos y valores medios del tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo (AR), de los grupos C (control), CI (control isquémico) y PCI (posacondicionamiento isquémico) en machos y hembras. \*  $p < 0,05$  machos (M) vs. hembras (H). IG: isquemia global.

## PROTOS COLOS EXPERIMENTALES

Después de un período de estabilización de 20 min, los corazones de los animales de ambos sexos fueron sometidos a los siguientes protocolos (**Figura 1**): 1) Control (C, n=6): los corazones fueron perfundidos con solución Ringer durante 90 min; 2) Control isquémico (CI, n=8 M y n=6 H): se realizó una isquemia global (IG) de 30 min (por interrupción total del flujo coronario) y se reperfundió durante 60 min; 3) Posacondicionamiento isquémico (PCI, n=7 M, n=6 H): después de la IG de 30 min y al comienzo de la reperusión se realizaron 3 ciclos de IG-R de 30 segundos cada uno y luego se siguió la reperusión hasta completar los 60 min.

## PARÁMETROS MEDIDOS

### Determinación del tamaño del infarto

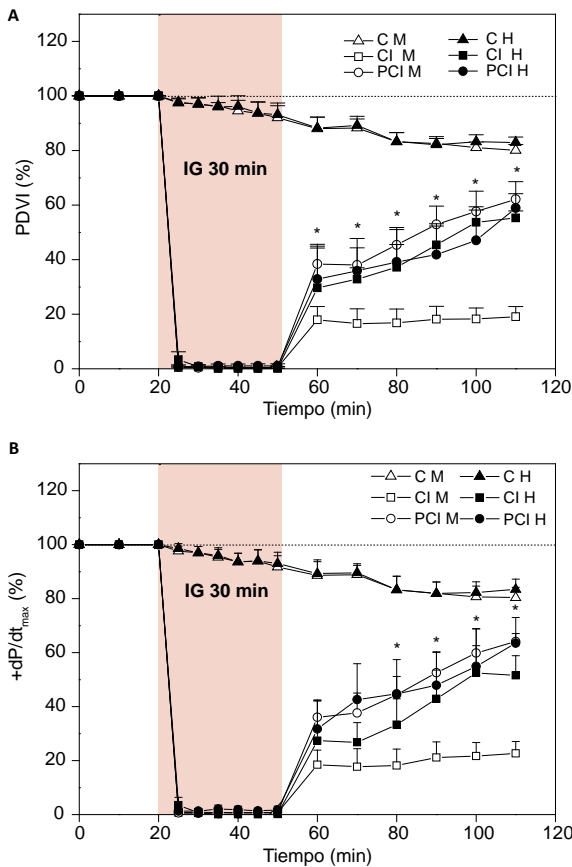
Al término del período de reperusión el corazón fue retirado del sistema de perfusión de Langendorff y el ventrículo izquierdo (VI), una vez pesado, se congeló a -20 °C por una hora. Al cabo de este tiempo el VI fue cortado en trozos de 2 mm de espesor los cuales fueron pesados y sumergidos en una solución al 1% de cloruro de trifetil-tetrazolio (TTC) durante 15 min. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área de riesgo (área total).

### Función sistólica

La función sistólica fue evaluada a través de la presión desarrollada del VI (PDVI) que se calculó restando a la PVI la PDFVI y de la velocidad máxima de ascenso de la presión ventricular (+dP/dt<sub>max</sub>).

### Función diastólica

- Rigidez diastólica.** Puesto que nuestro modelo experimental es una preparación isovolúmica, la PDFVI fue usada como índice de rigidez diastólica ventricular.
- Relajación isovolúmica.** Para evaluar la relajación isovolúmica realizamos las siguientes medidas:



**Figura 3.** Cambios de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDI, **panel A**) y de la máxima velocidad de ascenso de la presión (+dP/dt<sub>máx</sub>, **panel B**), expresadas como porcentaje del valor preisquémico, durante la isquemia-reperfusión de los grupos C (control), CI (control isquémico) y PCI (posacondicionamiento isquémico) en machos (M) y hembras (H). Nota que solo en el grupo CI los valores de dichos parámetros fueron significativamente mayores en las H, comparados con los observados en los M. \*  $p < 0,05$  M vs. H. IG: isquemia global.

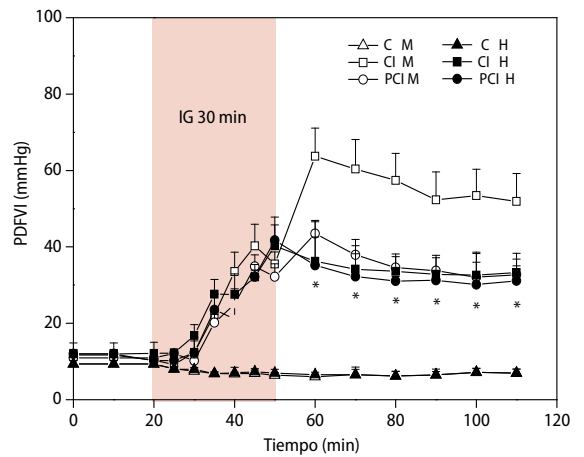
1. La velocidad máxima de descenso de la presión ventricular ( $-dP/dt_{máx}$ );
2. El tiempo hasta alcanzar el 50% de la presión pico ( $t_{50}$ );
3. La constante de tiempo de relajación ( $\tau$ ). Esta constante fue calculada usando una ecuación monoexponencial con asíntota variable:

$$P = P_0 \times e^{-t/\tau} + P_b$$

donde P es la presión ventricular medida desde el  $-dP/dt_{máx}$  hasta que la PDFVI alcance el valor de 5 mmHg;  $P_b$  es el valor asíntótico;  $P_0$  es el valor de la presión ventricular a tiempo=0 durante la relajación;  $\tau$  es el tiempo que dura la relajación y  $t$  es la constante de tiempo de relajación.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Para establecer las diferencias significativas entre dos grupos experimentales se utilizó la prueba de t de Student. Para la comparación de más de dos grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. En todos los casos el valor de 0,05 se consideró como el límite de significación estadística.



**Figura 4.** Cambios de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI), expresada en mmHg, durante la isquemia-reperfusión de los grupos C (control), CI (control isquémico) y PCI (posacondicionamiento isquémico) en machos (M) y hembras (H). Observar que solo en el grupo CI los valores de PDFVI fueron significativamente menores en H que en M. \*  $p < 0,05$  M vs. H. IG: isquemia global.

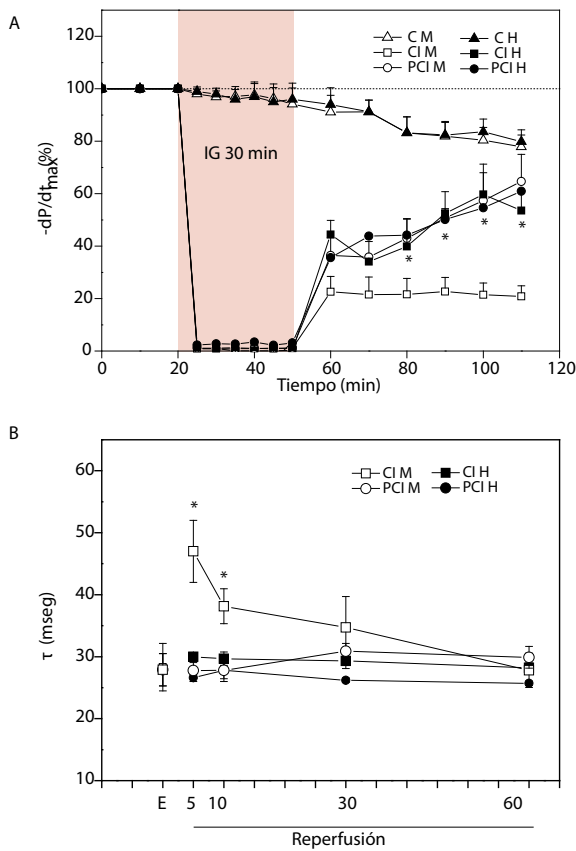
**RESULTADOS**

En el grupo C el valor promedio del tamaño del infarto (TI) fue aproximadamente 1,5%. Después de la isquemia-reperfusión el TI aumentó, siendo significativamente mayor en los M que en las H ( $40 \pm 2\%$  vs.  $29 \pm 4\%$ ). El PCI disminuyó significativamente el TI en ambos sexos, alcanzando un valor de aproximadamente 15% (**Figura 2**).

La recuperación posisquémica de la función sistólica fue significativamente mayor en H que en M. En el grupo CI, los valores de PDI y  $+dP/dt_{máx}$  al final de la reperfusion fueron mayores en H que en M ( $55 \pm 3\%$  y  $59 \pm 7\%$  para H y  $19 \pm 4\%$  y  $23 \pm 5\%$  para M;  $p < 0,05$ ). En los corazones posaconicionados (grupo PCI) la recuperación posisquémica de la función sistólica aumentó significativamente en M y no se modificó en H. En este grupo y al final de la reperfusion, los valores de PDI y de  $+dP/dt_{máx}$  fueron de  $62 \pm 6\%$  y  $64 \pm 9\%$ , respectivamente, para M, y de  $59 \pm 5\%$  y de  $64 \pm 4\%$ , respectivamente, para H (**Figura 3 A y B**).

La PDFVI aumentó durante la isquemia y la reperfusion, adquiriendo en M valores significativamente mayores que en H. Es decir, la rigidez diastólica posisquémica fue mayor en M que en H. En el grupo CI y al final de la reperfusion, la PDFVI fue de  $50 \pm 4$  mmHg y  $26 \pm 8$  mmHg para M y H, respectivamente. El valor preisquémico de PDFVI fue de aproximadamente 11 mmHg para ambos sexos. En los corazones posaconicionados (grupo PCI), la rigidez diastólica disminuyó sólo en M, alcanzando valores semejantes a los observados en H. En este grupo y al final de los 60 min de reperfusion, la PDFVI fue de  $33 \pm 4$  mmHg para M y  $31 \pm 4$  mmHg para H (**Figura 4**).

Con respecto al  $-dP/dt_{máx}$  también se observaron valores significativamente mayores durante la reperfusion en H que en M. A los 60 min de reperfusion, el valor promedio fue  $54 \pm 7\%$  para H y  $21 \pm 4\%$  para M. De manera similar a lo que ocurrió con los parámetros anteriormente mencionados, el PCI aumentó la recuperación del  $-dP/dt_{máx}$  solamente en los M sin modificarse en las H (**Figura 5 A**).



**Figura 5. Panel A.** Cambios durante la isquemia-reperfusión de la máxima velocidad de descenso de la presión ( $-dP/dt_{max}$ ), expresada como porcentaje del valor preisquémico, de los grupos C (control), CI (control isquémico) y PCI (posacondicionamiento isquémico) en machos (M) y hembras (H). **Panel B.** Valores de la constante de tiempo de relajación ( $\tau$ ) en el período de estabilización (E) y a los 5, 10, 30 y 60 min de reperfusión. \*  $p < 0,05$  M vs. H. IG: isquemia global.

El valor preisquémico de  $t_{50}$  en M y en H no fue diferente ( $58 \pm 1$  ms y  $55 \pm 3$  ms, respectivamente). A los 5 min de la reperfusión,  $t_{50}$  aumentó ligeramente en los M sin alcanzar significación estadística. Sin embargo, en las H no se observó ningún cambio. Estos valores no se modificaron en los corazones posaconicionados de ambos sexos. En cuanto a la constante  $\tau$ , en M, desde un valor preisquémico de  $28 \pm 3$  ms, aumentó a  $48 \pm 5$  ms a los 5 min de la reperfusión, siguió elevado a los 10 min y paulatinamente se normalizó al finalizar dicho período. Sin embargo, en H  $\tau$  no se modificó durante toda la reperfusión. El PCI anuló los cambios observados en los M y en H no mostró cambios (**Figura 5 B**).

## DISCUSIÓN

En este trabajo observamos que la aplicación de un período severo de isquemia global (30 min) seguido de 60 min de reperfusión a corazones aislados de ratas adultas jóvenes produjo un daño miocárdico mayor en machos que en hembras. Esto es evidenciado por un mayor tamaño de infarto, una menor recuperación de la función sistólica, un aumento de la rigidez diastólica durante la reperfusión

y un empeoramiento de la relajación isovolúmica. Otro hallazgo interesante es que, en los corazones de M, el posacondicionamiento isquémico logró atenuar la muerte celular y la disfunción sistólica y diastólica posisquémica. En cambio, en H, esta intervención solo logró disminuir el tamaño del infarto sin modificar la respuesta contráctil durante la reperfusión.

Con respecto a la respuesta a la isquemia de M y H, aunque algunos estudios no observaron diferencias en el tamaño del infarto originado por episodios de isquemia aguda, la mayoría de las investigaciones experimentales muestran que los corazones de hembras toleran o poseen una mayor resistencia frente a la isquemia-reperfusión<sup>6-8,12,13</sup>. Nuestros datos concuerdan con estos últimos resultados. Los mecanismos responsables no han sido aún dilucidados y los datos de este estudio no nos permiten dar conclusiones al respecto. No obstante, mencionaremos algunas de las hipótesis que hasta el momento se han considerado. Algunos autores reportan diferencias en el acoplamiento excitación-contracción y en los procesos de manejo del calcio en los cardiomiocitos entre hombres y mujeres<sup>14,15</sup>. Diferencias en las vías dependientes de quinasas tales como proteína quinasa B (PKB o Akt) y/o proteína quinasa C (PKC), producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como diferencias en la apoptosis y la autofagia entre machos y hembras y en los mecanismos dependientes del óxido nítrico, son algunos de los mecanismos propuestos<sup>6,16-19</sup>.

Con respecto al PCI en machos y hembras, la bibliografía existente hasta la actualidad es escasa y contradictoria. Así, un estudio previo realizado en corazones aislados de rata macho y hembra muestra que la aplicación de distintos protocolos de PCI no mejora la tolerancia a la isquemia-reperfusión ni disminuye el tamaño del infarto<sup>20</sup>. Otra investigación demuestra que el PCI reduce el tamaño del infarto después de 10 min de reperfusión solo en hembras<sup>21</sup>. Resultados obtenidos por Crisostomo et al. muestran que el PCI es cardioprotector en rata macho pero no en hembra después de 25 min de isquemia, resaltando que los beneficios del PCI dependen de la duración de la isquemia<sup>22</sup>.

## CONCLUSIONES

Nuestros datos evidencian la existencia de una sensibilidad diferente del miocardio de rata macho y hembra a la aplicación de un período severo de isquemia global. Este dimorfismo sexual se manifiesta por una mayor disminución en la recuperación de la función sistólica y diastólica posisquémica en el macho que en la hembra. Los datos de PCI también muestran que esta herramienta cardioprotectora fue más eficiente en machos que en hembras. Estudios posteriores serán necesarios para dilucidar los mecanismos responsables de todas las diferencias observadas.

## AGRADECIMIENTOS

Los experimentos fueron realizados utilizando el subsidio asignado al proyecto 11/M169 de la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, dirigido por la Dra. Susana Mosca.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Steg PG, Greenlaw N, Tardif JC, Tendera M, Ford I, Kääb S, et al. Women and men with stable coronary artery disease have similar clinical outcomes: insights from the international prospective CLARIFY registry. *Eur Heart J* 2012;33(22):2831-40.
2. Duvall WL. Cardiovascular disease in women. *Mt Sinai J Med* 2003;70(5):293-305.
3. Bassuk SS, Manson JE. Gender-specific aspects of selected coronary heart disease risk factors: a summary of the epidemiologic evidence. En: Legato MJ, editor. *Principles of Gender-Specific Medicine*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier Inc; 2010, pp. 162-74.
4. Bell JR, Bernasocchi GB, Varma U, Raaijmakers AJ, Delbridge LM. Sex and sex hormones in cardiac stress-Mechanistic insights. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 137:124-35.
5. Bell JR, Porrello ER, Huggins CE, Harrap SB, Delbridge LM. The intrinsic resistance of female hearts to an ischemic insult is abrogated in primary cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(4):1514-22.
6. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res* 2010;06(11):1681-91.
7. Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007;75(3):478-86.
8. Ross JL, Howlett SE. Age and ovariectomy abolish beneficial effects of female sex on rat ventricular myocytes exposed to simulated ischemia and reperfusion. *PLoS One* 2012;7(6) e38425.
9. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):579-88.
10. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112(14):2143-8.
11. Goyeneche MA, Donato M, Gelpi RJ. Posacondicionamiento isquémico: mecanismos, comorbilidades y posible aplicación clínica. *Revista del Consejo Argentino de Residentes de Cardiología (CONAREC)* 2016;32(133):21-9.
12. Przyklenk K, Ovize M, Bauer B, Kloner RA. Gender does not influence acute myocardial infarction in adult dogs. *Am Heart J* 1995;129(6):1108-13.
13. Li Y, Kloner RA. Is there a gender difference in infarct size and arrhythmias following experimental coronary occlusion and reperfusion? *J Thromb Thrombolysis* 1995;2(3):221-5.
14. Parks RJ, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2013;465(5):747-63.
15. Curl CL, Wendt IR, Kotsanas G. Effects of gender on intracellular  $[Ca^{2+}]$  in rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2001;441(5):709-16.
16. Bae S, Zhang L. Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315(3):1125-35.
17. Edwards AG, Rees ML, Gioscia RA, Zachman DK, Lynch JM, Browder JC, et al. PKC-permitted elevation of sarcolemmal KATP concentration may explain female-specific resistance to myocardial infarction. *J Physiol* 2009;587(23):5723-37.
18. Chen C, Hu LX, Dong T, Wang GQ, Wang LH, Zhou XP, et al. Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Life Sci* 2013;93(7):265-70.
19. Fukumoto T, Yamashita N, Tawa M, Ohkita M, Matsumura Y. Sex differences in postischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat heart: the role of estrogen against myocardial ischemia-reperfusion damage via an NO-mediated mechanism. *Cardiovasc Pharmacol* 2012;60(3):269-75.
20. Lee DS, Steinbaugh GE, Quarrie R, Yang F, Talukder H, Zweier JL, et al. Ischemic preconditioning does not provide cardioprotection from long term ischemic injury in isolated male or female rat hearts. *J Surg Res* 2010;164(2):175-81.
21. Penna C, Tullio F, Merlino A, Moro F, Raimondo S, Rastaldo R, et al. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol* 2009;104(4):390-402.
22. Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, Terrell AM, Meldrum DR. Postconditioning in females depends on injury severity. *J Surg Res* 2006;134(2):342-7.