

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

**ACTIVACIÓN DE CALPAÍNAS DURANTE LA
REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA. IMPORTANCIA
COMO SISTEMA EFECTOR DE MUERTE
CELULAR Y COMO DIANA TERAPÉUTICA**

Memoria presentada por Víctor Hernando Martínez para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesis doctoral realizada en el Laboratorio de Patología Cardiocirculatoria del Àrea del Cor del Hospital Vall d'Hebron e Institut de Recerca bajo la direcció del Dr. David García-Dorado García y del Dr. Javier Inserte Igual.

Tesis adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, en el programa de doctorado en Bioquímica i Biologia Molecular con la tutoría del Dr. Simó Schwartz Riera.

El doctorando,

Víctor Hernando Martínez

Director de la tesis,

Director de la tesis,

Tutor de la tesis

Dr. David García-Dorado

Dr. Javier Inserte

Dr. Simó Schwartz

Barcelona, Marzo del 2010

AGRADECIMIENTOS

Después de 5 años hay mucho que agradecer y es difícil hacer justicia en pocas palabras, mucha gente con la que se ha compartido este tiempo y poca voluntad de escribir una novela. Así que perdonad mi brevedad.

Para empezar por el principio, le agradezco a David García-Dorado que en la entrevista, por algún motivo que ignoro, me considerara apto para realizar esta tesis y hasta el día de hoy no le haya notado arrepentido. También le agradezco la dirección que ha hecho de esta tesis y la buena cara con la que me ha recibido siempre que le he ido a molestar.

No menos importante es Javier Inserte, mi otro director de tesis, que sin escogerme tuvo que enseñarme lo que debía aprender, ayudarme con lo que debía hacer y no sabía, guiarme a lo largo de estos años y, lo más difícil, aguantarme todos los días con mis dudas, todo eso sin hacerme trabajar en fines de semana ni en vacaciones y dejándome comer (deprisa). Sin él esta tesis no sería la mitad de lo que es, y se lo agradezco.

También he de agradecer al Dr. Simó Schwartz su amabilidad y disponibilidad para ser tutor de esta tesis, sin olvidar a la Dra. Margarita Sentís, que fue mi tutora hasta que se jubiló.

Alejándome paulatinamente de la oficialidad hay mucho que agradecer a Ignasi, sin el cual los experimentos en el RMN no habrían sido posibles, a Carmem, sin la cual hubiera necesitado otra tesis para poder hacer los experimentos *in vivo*, y a Iratxe, sin cuyas enseñanzas no tendría nada bonito que poner en la portada. También debo mucho a M^a Ángeles, Ángeles, Lourdes, Jessica y Mónica, técnicos cuyo trabajo ha sido de gran ayuda para mí. Y a Gemma, Marta y Giuliana, por su amabilidad y presteza para ayudarme con ese monstruo llamado burocracia.

No todos los agradecimientos son por “trabajos prestados”; el buen ambiente que he encontrado en este laboratorio se los he de agradecer a todos mis compañeros, a los que ya he mencionado y a los que aún no, que no son pocos: Alberto, Alejandra, Antonio, Arancha, Bet, Celia, Diego, Dorita, Eduardo, Elena, Eli, Esperanza, Ignasi, Inma, Jordi, Jose, Luis, Marcos, M^a Ángeles, Maribel, Marisol, Merche, Míriam, Neus, Noelia, Paula, Pepe, Teresa y Víctor, así como todos aquellos que por el motivo que fuera han pasado por el laboratorio. Ordenados por riguroso orden alfabético, pues no es fácil hacer distinciones entre ellos, aunque algunos se fueran hace tiempo y otros hayan llegado hace poco, aunque con algunos haya compartido más tiempo que con otros; todos han contribuido a hacer tan agradable el trabajo en este laboratorio y se lo agradezco.

Y para el final dejo a la familia, que no se queja ni pide nada, excepto saber a qué me he dedicado estos 5 años, y eso es algo que rara vez les he explicado. Por la paciencia que han tenido conmigo, en esto y en todo, les doy las gracias.

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	19
1. Mecanismos celulares del daño por reperfusión.....	21
1.1. Pérdida de la homeostasis catiónica.....	21
1.1.1. Transportadores de Na ⁺ en el cardiomiocito.....	21
1.1.2. Pérdida de la homeostasis catiónica en la isquemia y la reperfusión.....	24
1.2. ROS.....	26
1.3. Edema celular.....	28
2. Mecanismos de muerte celular inmediata dependientes de calcio.....	30
2.1. Hipercontractura.....	30
2.2. Disfunción mitocondrial.....	32
2.3. Activación de sistemas proteolíticos.....	33
2.3.1. Sistema lisosomal.....	33
2.3.2. Sistema ubiquitina-proteosoma.....	34
2.3.3. Caspasas.....	34
2.3.4. Calpaínas y fragilidad sarcolemal.....	35
3. La μ -calpaína y la m-calpaína.....	37
3.1. Expresión.....	37
3.2. Estructura.....	39
3.2.1. Estructura de la subunidad reguladora.....	39
3.2.2. Estructura de la subunidad catalítica.....	40
3.2.3. Estructura cuaternaria.....	41
3.3. Regulación de la actividad fisiológica.....	41
3.3.1. Ca ²⁺	42
3.3.2. Autólisis.....	43
3.3.3. Translocación a membrana.....	43
3.3.4. Calpastatina.....	44
3.3.5. Proteínas reguladoras.....	47
3.3.6. Fosforilación.....	47
3.4. Substratos y funciones fisiológicas.....	49
3.4.1. Determinantes de la afinidad por sustrato.....	49
3.4.2. Substratos y funciones de la actividad.....	50
3.4.3. Patologías con alteración de la actividad de las calpaínas.....	53
4. Las calpaínas en el miocardio reperfundido.....	54
4.1. Actividad de las calpaínas en el miocardio.....	54
4.2. Papel de las calpaínas en el daño por reperfusión.....	54
4.2.1. Fragilidad sarcolemal y degradación del citoesqueleto de membrana.....	55
4.2.2. Homeostasis del Ca ²⁺	55
4.2.3. Estabilidad lisosomal.....	57
4.2.4. Apoptosis.....	57

4.2.5. Aturdimiento.....	57
5. Mecanismos endógenos de protección miocárdica.....	58
5.1. Precondicionamiento isquémico.....	58
5.1.1. Iniciadores del precondicionamiento isquémico.....	59
5.1.2. Mediadores del precondicionamiento isquémico.....	59
5.1.3. Efectores del precondicionamiento isquémico.....	60
5.2. Postcondicionamiento isquémico.....	61
5.2.1. Mecanismos de la cardioprotección.....	62
5.2.2. El papel del pH intracelular.....	62
5.2.3. Utilidad terapéutica en el infarto de miocardio.....	63
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
Hipótesis.....	67
Objetivos.....	68
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
Materiales.....	71
Métodos.....	72
1. Modelos experimentales.....	72
2. Protocolos experimentales.....	76
3. Técnicas de análisis.....	89
RESULTADOS.....	97
1. Activación y regulación de las calpaínas durante la isquemia y reperfusión miocárdicas.....	97
1.1. Implicación de las calpaínas en la muerte celular por reperfusión.....	97
1.2. Momento de activación de las calpaínas durante la isquemia/reperfusión.....	98
1.3. Translocación de las calpaínas a membrana.....	100
1.4. Dependencia del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la activación de las calpaínas y la translocación de la m-calpaína.....	105
1.5. Efecto de la acidosis intracelular en la actividad y translocación de las calpaínas.....	107
1.6. Relación entre translocación y activación de la m-calpaína.....	108
1.7. Calpastatina en isquemia y reperfusión.....	110
2. Contribución de las calpaínas a la pérdida de la homeostasis catiónica.....	113
3. Papel de las calpaínas en la cardioprotección.....	118
3.1. Papel de las calpaínas en la protección por precondicionamiento isquémico.....	118
3.2. Papel de las calpaínas en el postcondicionamiento isquémico.....	122
3.3. Cardioprotección farmacológica con el inhibidor de las calpaínas.....	129
DISCUSIÓN.....	133
1. Activación y regulación de las calpaínas durante la isquemia y reperfusión miocárdicas.....	133
1.1. La activación de las calpaínas contribuye de manera relevante al daño miocárdico por isquemia/reperfusión.....	133
1.2. Las calpaínas se activan exclusivamente durante la reperfusión.....	133

1.3. La m-calpaína transloca a membrana durante la isquemia.....	134
1.4. La activación y translocación de las calpaínas es dependiente de Ca ²⁺ ...	135
1.5. La acidosis inhibe la actividad de las calpaínas.....	136
1.6. La inhibición de la translocación de m-calpaína a membrana no reduce la actividad de las calpaínas.....	137
1.7. La calpastatina es degradada durante la reperfusión.....	137
2. Contribución de las calpaínas a la pérdida de la homeostasis catiónica.....	139
3. Papel de las calpaínas en la cardioprotección.....	142
3.1. El preconditionamiento isquémico preserva la actividad Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa en el inicio de la reperfusión mediante la inhibición de las calpaínas...	142
3.2. El postcondicionamiento isquémico retrasa la normalización del pH intracelular e inhibe las calpaínas en el inicio de la reperfusión.....	143
3.3. La inhibición farmacológica y postisquémica de las calpaínas previene el daño por reperfusión <i>in vivo</i>	147
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	151
Resumen de resultados.....	151
Conclusiones.....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	157

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
AMPc	Adenosín 5'-monofosfato cíclico
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asp	Aspartato
Atg5	Gen relacionado con autofagia 5
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
AZT	3'-azido-2',3'-deoxitimidina
BDM	2,3-butanediona monoxima
C	Citosina
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II
CaMKIV	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina IV
CCD	Dispositivo de acoplamiento de carga
CsA	Ciclosporina A
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FAK	Cinasa de adhesión focal
FC	Frecuencia cardíaca
G	Guanina
Glu	Glutamato
GMPc	Guanosín 5'-monofosfato cíclico
GSK3β	Cinasa de glicógeno sintasa 3 beta
HSP	Proteína de choque térmico
I	Corazón sometido a isquemia sin reperfusión
IL-6	Interleucina-6

ABREVIATURAS

IPC	Precondicionamiento isquémico
IR	Corazón sometido a isquemia y reperfusión
JAK	Cinasa Janus
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
LGMD2A	Distrofia muscular de cinturas tipo 2A
LVP	Presión del ventrículo izquierdo
LVdevP	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
LVEDP	Presión telediastólica del ventrículo izquierdo
Lys	Lisina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
mitoK _{ATP}	Canales mitocondriales de K ⁺ dependientes de ATP
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBC	Cotransportador Na ⁺ /HCO ₃ ⁻
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
Nx	Corazón aislado perfundido normóxicamente
³² P	Isótopo de fósforo de masa atómica 32
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAM	Presión arterial media
PBS	Tampón fosfato salino
PD	Presión diastólica
PEEP	Presión positiva al final de la espiración
PEG-400	Polietilenglicol-400
pHi	pH intracelular
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PKM	Proteína cinasa M
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
Pro	Prolina
PS	Presión sistólica
PTP-1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
mPTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
RISK	Cinasa de supervivencia al daño por reperfusión
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la muestra
Ser	Serina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarcoplasmático/endoplasmico
SPK	Cinasa de esfingosina
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
T	Timina
TBS	Tampón Tris salino
Thr	Treonina
TmDOTP ⁵⁻	N,N',N'',N'''-tetra(metilenofosfonato) de tulio(III)-1,4,7,10-tetraaciclododecano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
Tyr	Tirosina
Val	Valina

RESUMEN

En el infarto agudo de miocardio el tejido isquémico no sobrevive a no ser que se restaure el flujo coronario. Sin embargo, esta restauración del flujo causa por sí misma la muerte de cardiomiocitos que han sobrevivido al periodo isquémico, reduciendo notablemente los beneficios de las terapias de reperfusión. Este fenómeno es conocido como daño letal por reperfusión y se caracteriza por una muerte celular de tipo necrótico que tiene lugar principalmente en los primeros minutos de la reperfusión y cuya extensión depende de la duración del episodio isquémico.

La sobrecarga de Ca^{2+} citosólico es uno de los principales determinantes del daño por reperfusión. El Ca^{2+} contribuye a la inducción de necrosis a través de tres mecanismos principales: la hipercontractura, la disfunción mitocondrial y la activación de enzimas entre las que se encuentran las calpaínas. Las calpaínas son proteasas dependientes de Ca^{2+} cuya activación se ha demostrado que aumenta la fragilidad del sarcolema en la isquemia/reperfusión. Esta fragilidad facilita la ruptura del sarcolema y se debe a la degradación de proteínas estructurales como la fodrina, que forma la base del citoesqueleto de membrana. Las calpaínas también juegan un papel en mecanismos endógenos de protección como el preconditionamiento isquémico, el cual inhibe estas proteasas y reduce la fragilidad sarcolema.

La primera parte de esta tesis evalúa la idoneidad de las calpaínas como diana terapéutica en un modelo de corazón aislado de rata. En este trabajo se descarta por primera vez la activación de las calpaínas durante la isquemia, situación que haría inútil cualquier tratamiento realizado durante la reperfusión. En cambio se observa translocación de la m-calpaína a membrana durante la isquemia; la posibilidad de que este fenómeno implicara un estado de preactivación es descartada al no inhibirse su activación durante la reperfusión cuando se reduce su translocación mediante la desestabilización de *lipid rafts*. En un modelo de sobrecarga de Ca^{2+} sin isquemia el pH ácido inhibe la actividad de las calpaínas, demostrándose que la acidosis es uno de los factores que previenen la activación de las calpaínas durante la isquemia. En conjunto estos resultados indican que las calpaínas se activan exclusivamente durante la reperfusión y, por tanto, su inhibición farmacológica postisquémica podría ser una estrategia eficaz frente al daño por reperfusión.

La segunda parte de la tesis propone un nuevo mecanismo de daño por reperfusión mediado por las calpaínas. La actividad proteolítica de las calpaínas durante la reperfusión provoca la degradación de la fodrina y la anquirina, dando lugar a la disociación de las subunidades α de la Na^+/K^+ -ATPasa del citoesqueleto de membrana y con ello a una disminución en su actividad. La reducida actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa impide una rápida

normalización del gradiente de Na^+ favoreciendo con ello la entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ y por tanto la muerte por reperfusión.

La tercera parte de la tesis estudia el papel de las calpaínas en la cardioprotección. Por un lado demuestra que el preconditionamiento isquémico a través de la inhibición de las calpaínas protege la función de la Na^+ / K^+ -ATPasa, lo que mejora la cinética de recuperación del Na^+ en el inicio de la reperfusión y reduce la muerte celular. Por otro lado se demuestra que el retraso en la normalización del pH intracelular es esencial en la cardioprotección otorgada por el postcondicionamiento isquémico, así como que uno de los efectos de la prolongación de la acidosis en la reperfusión es la inhibición de las calpaínas, cuya actividad se correlaciona con la muerte celular. Finalmente, la inhibición farmacológica de las calpaínas exclusivamente en la reperfusión es capaz de proteger el miocardio en riesgo en un modelo de rata *in vivo*, demostrando el potencial de las calpaínas como diana terapéutica dirigida a reducir el tamaño del infarto.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis demuestran la importancia de las calpaínas en el daño por reperfusión así como la posible utilidad terapéutica de su inhibición en el infarto agudo de miocardio.

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica constituye una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países industrializados y su prevalencia aumenta continuamente en el conjunto de la población mundial (Murray and Lopez, 1997). La muerte de células miocárdicas que sigue a una oclusión coronaria aguda es la responsable directa de la mayoría de las complicaciones que pueden causar la muerte de los pacientes que ingresan en el hospital con un síndrome coronario agudo (Thompson et al., 1979).

La extensión de la muerte celular (tamaño del infarto) depende principalmente del tamaño del territorio distal a la placa coronaria responsable (área en riesgo), de la presencia y magnitud del flujo residual (en forma de oclusión parcial, irrigación colateral o ambas) y de la duración de la isquemia (Reimer et al., 1977; Garcia-Dorado et al., 1987). Por tanto, el principal objetivo terapéutico frente a una oclusión coronaria es la rápida restauración del flujo coronario, o reperfusión, ya sea mediante intervención coronaria percutánea o mediante trombolisis, para reducir en lo posible la duración de la isquemia y la extensión de la muerte celular. Cuando la reperfusión se produce muy precozmente (antes de que hayan transcurrido 20-30 minutos de isquemia severa), previene la muerte celular. Si se produce más tardíamente, salvará sólo parte del miocardio, tanto menor cuanto más tarde se produzca, mientras que el resto de las células morirá. Cuando la restauración del flujo se produce tras varias horas de isquemia no modifica de forma apreciable el tamaño final del infarto. En la práctica clínica la reperfusión se produce casi siempre demasiado tarde para prevenir la existencia de muerte celular pero dentro de un intervalo en el que ésta es reducida significativamente (Garcia-Dorado and Theroux, 2004).

Está sólidamente demostrado que cuando la reperfusión se realiza durante este intervalo, en el que se salva algo pero no todo el miocardio isquémico, la muerte celular ocurre predominantemente durante los primeros minutos después de la restauración del flujo sanguíneo, en forma de necrosis, y es causada por mecanismos desencadenados durante la reperfusión (Piper et al., 1998). Este hecho, conocido como daño letal por reperfusión, ofrece la posibilidad de añadir a la restauración del flujo tratamientos farmacológicos que aumenten su eficacia y reduzcan la muerte celular, aunque, de momento, las numerosas estrategias ensayadas sólo han demostrado su utilidad en condiciones experimentales. El desarrollo de tratamientos eficaces y clínicamente aplicables para la prevención de la muerte celular por reperfusión constituye un objetivo prioritario en la lucha para disminuir el impacto social y sanitario de la cardiopatía isquémica (Rodríguez-Sinovas et al., 2007). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares responsables de este tipo de muerte celular, aunque ha progresado

muy rápidamente en los últimos años, está lejos de ser completo (Garcia-Dorado et al., 2009).

De los diversos tipos celulares presentes en el corazón esta tesis se centra en los cardiomiocitos dado que su supervivencia es crítica para la función cardíaca y su contractilidad e interconectividad los hace muy susceptibles al daño por reperfusión. En concreto, el papel que las calpaínas tienen en la muerte del cardiomiocito por isquemia/reperfusión y en los mecanismos endógenos de protección, así como la regulación de su actividad durante la isquemia y la reperfusión, son los principales objetivos del trabajo experimental realizado en esta tesis.

1. MECANISMOS CELULARES DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN

La investigación de los procesos que desencadenan la muerte de los cardiomiocitos inducida por la reperfusión ha señalado diversos mecanismos como responsables, pero la atención se ha centrado principalmente en tres fenómenos como desencadenantes: la pérdida de la homeostasis catiónica, la producción de radicales de oxígeno (ROS) y el edema celular durante el inicio de la reperfusión.

1.1. PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS CATIÓNICAS

La elevada concentración de Ca^{2+} presente en el citoplasma del cardiomiocito durante los primeros minutos de la reperfusión es probablemente el factor más relevante en la inducción de muerte celular (Steenbergen et al., 1990). El incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el inicio de la reperfusión se debe principalmente a la acumulación de Na^+ intracelular en el citoplasma durante la isquemia y el inicio de la reperfusión, situación que provoca que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ actúe en modo reverso, expulsando Na^+ de la célula e introduciendo Ca^{2+} (Inserate et al., 2002).

1.1.1. Transportadores de Na^+ en el cardiomiocito

La concentración citosólica de Na^+ libre es muy inferior a la extracelular (4-16 mM por 140 mM, respectivamente), lo que junto a la diferencia de potencial a través de la membrana produce un gradiente electroquímico muy favorable a la entrada de sodio en la célula. La energía almacenada en este gradiente es utilizada en las células excitables para la propagación del potencial de acción y para el transporte secundario activo, que utiliza el gradiente electroquímico del Na^+ para introducir o expulsar moléculas o iones en contra de su gradiente (Bers et al., 2003).

En el cardiomiocito, la salida de Na^+ intracelular está regulada principalmente por la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa sarcolemal, el mecanismo que mantiene el gradiente transmembranal, mientras que su entrada a través de la membrana plasmática se produce básicamente a través de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y Na^+/H^+ , y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Bers et al., 2003). Además de ser transportado entre los compartimentos intra y extracelular, el Na^+ puede ser transferido entre células a través de las uniones tipo *gap* (Ruiz-Meana et al., 1999).

1.1.1.1. La bomba de Na⁺

La bomba de Na⁺ (o Na⁺/K⁺-ATPasa) se compone de dos subunidades principales, α y β , con una tercera subunidad, γ , de menor tamaño y que sólo ha sido detectada en algunos tejidos. La subunidad α es la mayor y tiene los lugares de unión a ATP, Na⁺ y K⁺; la subunidad β modula la actividad de la bomba y la correcta inserción en membrana. La actividad de la bomba consume la mayoría del ATP sintetizado en la célula; expulsa 3 iones de Na⁺ e introduce 2 iones de K⁺ por cada molécula de ATP que hidroliza, manteniendo los gradientes químicos del Na⁺ y el K⁺ y por tanto el potencial de reposo de la membrana celular. En condiciones fisiológicas el ATP no es un factor limitante para su actividad, por lo que su actividad está regulada por las concentraciones de Na⁺ intracelular y de K⁺ extracelular (Bers et al., 2003). Sin embargo, durante el periodo isquémico la energía libre de hidrólisis de ATP se reduce debido a la ausencia de fosforilación oxidativa y a la carencia de suministro de nutrientes para la glucólisis, lo que conduce a un desplazamiento del potencial de reversión (E_{rev}) de la bomba hacia valores más positivos y una reducción de la expulsión de Na⁺ a través de la bomba (Glitsch and Tappe, 1995). Por tanto, en ausencia de ATP la Na⁺/K⁺-ATPasa no expulsa Na⁺, aunque tampoco es plausible que lo introduzca sintetizando ATP, dada la despolarización de la membrana que se da durante la isquemia (Rodríguez-Sinovas et al., 2003) y la acumulación de Na⁺ intracelular causada por la falta de actividad de la bomba y la corrección del pH intracelular (como se describirá más adelante).

1.1.1.2. Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje

Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje son los responsables de la rápida y breve entrada de Na⁺ característica de los potenciales de acción. Estos canales se abren cuando la despolarización de la membrana supera el umbral de activación, y con su apertura habilitan una despolarización rápida y marcada. Tras milisegundos los canales adoptan una conformación cerrada, y es necesaria la repolarización de la membrana durante un periodo de tiempo (del orden de milisegundos) para que el canal recupere la conformación de reposo (activable). Este fenómeno está detrás del periodo refractario característico de las células excitables que en los cardiomiocitos tiene una especial relevancia, permitiendo la relajación del miocardio y, por tanto, el llenado de las cavidades cardíacas (Bers et al., 2003).

1.1.1.3. El intercambiador Na^+/H^+

El intercambiador Na^+/H^+ (NHE) cumple un papel fundamental en la regulación del pH intracelular. Hay seis isoformas identificadas, una de ellas mitocondrial y el resto de membrana plasmática. Actúa como extrusor de H^+ intercambiándolo por Na^+ con una estequiometría de 1:1 y con una clara dependencia del pH intracelular. El intercambiador Na^+/H^+ está inactivo a pH neutro, pero a medida que el citosol se acidifica es activado alostéricamente por H^+ a la par que el intercambio se vuelve termodinámicamente favorable. La acidosis extracelular, en cambio, inhibe el transporte a través del NHE, ya sea por la reducción del gradiente de H^+ o por la competición del H^+ con el Na^+ por el lugar de unión externo. La concentración intracelular de Na^+ sólo tiene un efecto inhibitor relevante en la actividad del intercambiador cuando presenta valores alejados de los fisiológicos (Bers et al., 2003). A pesar de que el NHE es uno de los transportadores responsables de la entrada de Na^+ en el cardiomiocito durante la isquemia/reperfusión, el bloqueo de la entrada de Na^+ a través del NHE no previene la sobrecarga de Na^+ durante la reperfusión por la actividad de sus alternativas, y no se ha demostrado protector durante la reperfusión miocárdica (Inserte et al., 2009).

1.1.1.4. El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$

El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) es otro de los principales sistemas reguladores del pH intracelular; se activa a pH ácido e introduce Na^+ y HCO_3^- en el citosol. La estequiometría del cotransporte parece variar entre especies, y en el caso de la forma cardíaca se ha detectado como 1:1 (e insensible a voltaje) en algunas y como 1:2 (y sensible a voltaje) en otras, entre ellas la rata. El NBC tiene una actividad de similar magnitud a la del NHE en condiciones de acidosis leve, pero a medida que el pH del citosol baja, el NHE se activa en mayor grado y gana peso en la corrección de la acidosis, siendo así el responsable mayoritario de la entrada de Na^+ en el citosol en acidosis cuando el pH es inferior a 6.8 (Bers et al., 2003).

1.1.1.5. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) es la principal vía de salida del Ca^{2+} al medio extracelular. Hay tres isoformas del intercambiador, de las cuales NCX1 es la presente en tejido cardíaco. Se considera que la estequiometría del NCX es de tres iones entrantes de Na^+ por un ión saliente de Ca^{2+} , aunque se han descrito estequiometrías de 2:1 y 4:1. Su

principal función fisiológica en el cardiomiocito es mantener el gradiente transarcolema de Ca^{2+} expulsando el que entra durante el potencial de acción. No obstante, tiene la particularidad de ser reversible en determinadas condiciones que se dan tanto fisiológicamente como en situaciones patológicas. Su potencial de reversión está en -40 mV para los gradientes químicos de los iones presentes en condiciones de reposo, por lo que durante el potencial de acción hay un corto periodo de tiempo (antes de que el Ca^{2+} se eleve) en el que actúa en modo reverso, introduciendo Ca^{2+} y expulsando Na^+ . Este funcionamiento reverso se puede dar también en el caso de que los potenciales de equilibrio del Ca^{2+} y del Na^+ cambien debido a alteraciones en la concentración de alguno de ellos o ambos; el potencial de reversión depende de estos potenciales y puede desplazarse a valores más negativos que el potencial de membrana, lo que cambia la dirección del intercambio (Figura 1) (Bers et al., 2003). Esta situación se da durante la isquemia cuando se acumula Na^+ intracelular, y es la principal causa de la sobrecarga de Ca^{2+} inductora de daño por reperfusión (Ladilov et al., 1999; Inserte et al., 2002).

1.1.1.6. Uniones tipo *gap*

Las uniones tipo *gap* son áreas de la membrana plasmática con canales que conectan los citosoles de dos células adyacentes. En los cardiomiocitos estas uniones se encuentran en los discos intercalares y tienen una función fundamental en la transmisión del impulso eléctrico a través del miocardio. Es esta permeabilidad a cationes la que hace que la sobrecarga de Na^+ de un cardiomiocito pueda ser transmitida a otro adyacente, tal y como se ha demostrado en parejas de cardiomiocitos aislados (Ruiz-Meana et al., 1999).

1.1.2. Pérdida de la homeostasis catiónica en la isquemia y la reperfusión

Los transportadores anteriormente presentados son los principales responsables de los cambios en la concentración intracelular de Na^+ que ocurren durante la isquemia (Figura 1). Durante los primeros minutos de la isquemia se produce un aumento en la concentración de Na^+ intracelular que se puede prevenir bloqueando los canales dependientes de voltaje (ten Hove et al., 2007), aunque la causa de la acumulación es la reducción de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa inducida por el descenso en la disponibilidad de ATP. A medida que el tiempo pasa se desarrollan dos fenómenos determinantes y relacionados: la depleción de ATP a causa de la detención de la fosforilación oxidativa y la falta

de suministro de nutrientes, y la acidificación del citosol causada por la producción de lactato en la glucólisis anaeróbica y la liberación de fosfato procedente de ATP hidrolizado (Allen and Orchard, 1987). La carencia de ATP disponible conduce a la inactivación de la Na^+/K^+ -ATPasa, a la despolarización de la membrana celular (Rodríguez-Sinovas et al., 2003) y a la inhibición de la contractilidad y la aparición de rigor isquémico (el descenso del ATP inhibe la relajación del sarcómero y conduce a un aumento sostenido de la tensión) (Allshire et al., 1987). La acidosis citosólica, además de inhibir la actividad contráctil, induce un incremento en la concentración citosólica de Na^+ debido a la activación de los mecanismos correctores de pH (los transportadores NHE y NBC) (Bauza et al., 1995). Esta sobrecarga de Na^+ , en conjunción con la despolarización de la membrana, provoca que la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cambie de sentido y expulse Na^+ a costa de introducir Ca^{2+} en la célula (Ladilov et al., 1999; Schafer et al., 2001). El efecto de los otros mecanismos reguladores de la concentración de Ca^{2+} intracelular es reducido durante la isquemia. El otro extrusor de Ca^{2+} presente en el sarcolema, la ATPasa de Ca^{2+} , tiene una actividad reducida por falta de ATP (Vrbjar et al., 1993). Por otro lado, la carencia de ATP inhibe la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCA) y, por tanto, el retículo durante la isquemia no almacena Ca^{2+} y no atenúa, sino que quizá aumente, la sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol (Fiolet and Baartscheer, 2000). Por último, las mitocondrias atenúan la sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol captándolo a través del uniporter de Ca^{2+} de las mitocondrias, con lo que éstas también ven aumentada su concentración de Ca^{2+} en la matriz (Miyata et al., 1992; Ruiz-Meana et al., 2006).

Durante la reperusión se dan dos cambios principales que afectan a las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} del cardiomiocito: por un lado, la reoxigenación y la disponibilidad de substratos para el metabolismo energético, y por el otro, la neutralización del pH extracelular. La supresión de la acidosis extracelular potencia la actividad del NHE y produce un incremento brusco en la concentración de Na^+ intracelular favoreciendo la entrada de Ca^{2+} a través del NCX durante los primeros minutos de reperusión. A medida que el pH citosólico se neutraliza y la respiración mitocondrial recupera la síntesis de ATP (y se reduce el catabolismo anaeróbico), la actividad del NHE y el NBC se reduce y la entrada de Na^+ disminuye. Paralelamente el ATP permite reactivar a la Na^+/K^+ -ATPasa reduciendo la sobrecarga de Na^+ y repolarizando la membrana. La normalización del gradiente transarcolemal de Na^+ favorece que el NCX funcione predominantemente expulsando Ca^{2+} , lo que permite al cardiomiocito recuperar sus niveles basales de Ca^{2+} (Piper et al., 1998). Todo esto ocurre si la célula no muere en los primeros minutos de reperusión a causa de la hipercontractura (inducida por la sobrecarga de Ca^{2+} y la presencia

de ATP, y que se discutirá con más detalle posteriormente), por lo que una rápida normalización, aunque sea parcial, de los niveles de Na^+ antes de la recuperación energética puede evitar un daño irreversible para la célula. Por tanto, la reactivación de la bomba de Na^+ es vital para la célula, pero su actividad está reducida durante el inicio de la reperfusión por causas no atribuibles a la baja disponibilidad de ATP y que están por determinar (Siegmund et al., 1990). El papel de las mitocondrias y del retículo sarcoplasmático en la homeostasis del calcio durante la reperfusión será descrito en el capítulo dedicado a los efectos de la sobrecarga de Ca^{2+} , dada la estrecha relación con dos de los fenómenos inducidos por el calcio, la apertura del poro de transición mitocondrial y la inducción de hipercontractura, respectivamente.

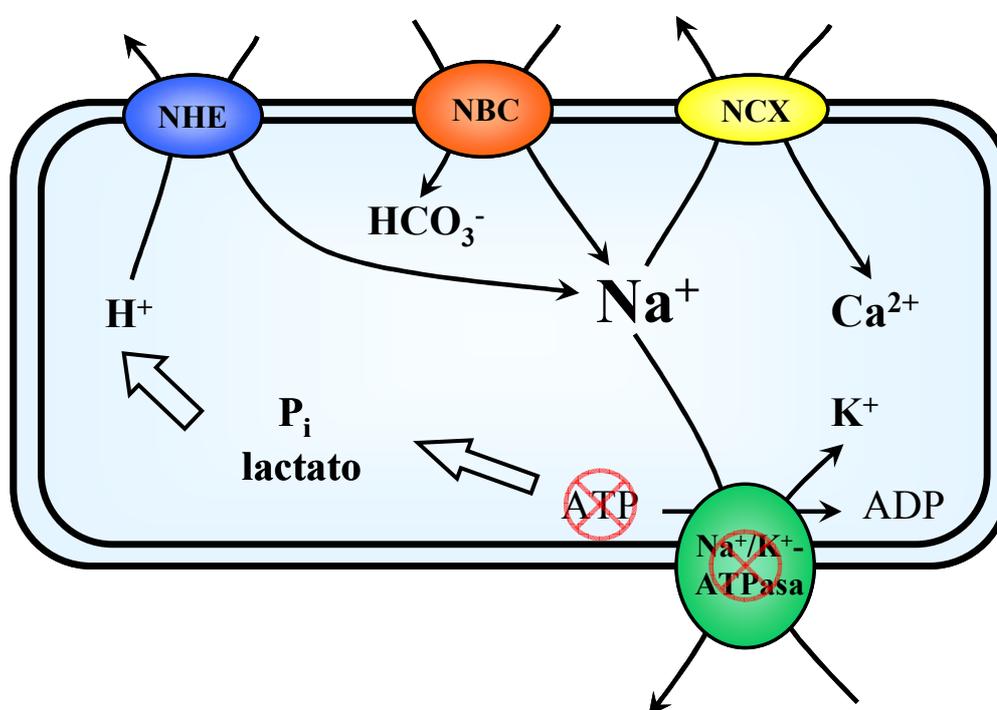


Figura 1. Esquema de los transportadores iónicos implicados en la sobrecarga de Ca^{2+} y de Na^+ en la isquemia y la reperfusión miocárdicas. Para más detalle consultar el texto.

1.2. ROS

La producción de radicales de oxígeno en el cardiomiocito aumenta en el inicio de la reperfusión debido a la entrada brusca de oxígeno en las células, cuyas mitocondrias generan estos radicales en la cadena respiratoria debido al daño recibido durante la isquemia en los complejos I y III, que bloquea la transferencia de electrones (Chen et al., 2008), así como a la reducción de la actividad de la citocromo oxidasa, causada por la depleción de citocromo c y cardiolipina también durante la isquemia (Becker, 2004).

Otras fuentes extramitocondriales de ROS son la actividad de la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa y, en determinadas circunstancias, la NO sintasa (Zweier and Talukder, 2006). Estos radicales tienen diversos efectos perjudiciales en la célula, como a) la oxidación de lípidos (aumentando la fragilidad de las membranas), proteínas (dañando la función contráctil, potenciando el modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) y ADN (induciendo apoptosis) (Becker, 2004; Soliman et al., 2009); b) daños en la cadena respiratoria (facilitando la producción de más radicales) (Becker, 2004); c) la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, siendo su principal inductor (Di Lisa and Bernardi, 1998); y d) la inducción de una respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y citocinas (Nian et al., 2004; Vinten-Johansen, 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos con el tratamiento antioxidante en diversos modelos animales y celulares de isquemia/reperfusión han sido contradictorios e incapaces de establecer su papel en la muerte celular por reperfusión (Becker, 2004), aunque es aceptado su papel en la disfunción contráctil, reversible e independiente de muerte celular, conocida como aturdimiento (Bolli, 1998).

El papel que tiene la inflamación en el daño inmediato por reperfusión es complejo y controvertido. Los ROS inducen la síntesis de moléculas de adhesión en células endoteliales y miocitos tanto directamente como a través de la síntesis de citocinas (como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6) y moléculas de complemento. Estas moléculas proinflamatorias actúan como factores quimiotácticos y activadores de neutrófilos, cuya adhesión a la pared vascular es a su vez favorecida por el aumento en la expresión de moléculas de adhesión. Estas citocinas tienen otros efectos sobre el miocardio, participando tanto en el proceso de remodelado del tejido (apoptosis, hipertrofia, disminución de la contractilidad) como en el de reparación tisular; por tanto, su acción puede ser tanto beneficiosa como perjudicial en función de la concomitancia de otros factores (Nian et al., 2004). En cuanto a los neutrófilos, éstos muestran un efecto mayoritariamente pernicioso para el tejido. Su activación provoca la génesis de ROS y su liberación, la secreción de enzimas proteolíticas que degradan componentes de la matriz extracelular y disfunción endotelial, mientras que su presencia en el vaso favorece la embolización de la microvasculatura (Vinten-Johansen, 2004). A pesar de estos efectos, el papel que los neutrófilos desempeñan en la muerte celular parece ser secundario. Tanto el hecho de que haya muerte celular en modelos de corazón aislado y, por tanto, en ausencia de neutrófilos, como los resultados contradictorios obtenidos con diversas estrategias de inhibición, el resultado negativo de los ensayos clínicos realizados, y la rápida aparición de necrosis en la reperfusión en comparación con la relativa lentitud del proceso de adhesión/extravasación de los neutrófilos

(1-6 horas), parecen descartar un papel protagonista de éstos en la inducción de necrosis aguda en el miocardio reperfundido (Vinten-Johansen, 2004). La infiltración y activación de los neutrófilos, por tanto, tendría un efecto agravante a medio y largo plazo, pero no sería un fenómeno determinante en el daño por reperfusión.

La activación del endotelio también provoca la adhesión de plaquetas a la vasculatura en el miocardio reperfundido (Laws et al., 1983; Barrabes et al., 1996a). Aunque los estudios *ex vivo* demuestran que las plaquetas no son necesarias para el daño por reperfusión, pueden agravarlo a través de mecanismos como la obstrucción de microvasos (Davies et al., 1986) y la potenciación de la respuesta inflamatoria (Kupatt et al., 2002); la posibilidad de que moléculas secretadas por las plaquetas, potencialmente tóxicas, puedan causar o contribuir a la muerte celular del cardiomiocito no ha sido suficientemente estudiada. A pesar de esta ausencia de datos, el efecto deletéreo de la acumulación de plaquetas en el miocardio se ha demostrado en corazón aislado de rata, en el cual la infusión con plaquetas activadas por diversos mecanismos incrementa la muerte celular (Mirabet et al., 2002), y este efecto se revierte bloqueando las selectinas tanto *ex vivo* como en un modelo porcino *in vivo* (Barrabes et al., 2005). La importancia de las plaquetas activadas en el daño por reperfusión es aumentada por la existencia de estudios clínicos que detectan un mayor nivel de activación en las plaquetas de pacientes con infarto agudo de miocardio (Langford et al., 1996; Ault et al., 1999; Coulter et al., 2000).

1.3. EDEMA CELULAR

Los cardiomiocitos reperfundidos tras isquemia prolongada sufren edema celular debido a la elevada osmolaridad de su citosol en comparación con la del medio extracelular. Esta hiperosmolaridad intracelular se debe a la acumulación de productos del catabolismo (lactato procedente de la glucólisis anaerobia y fosfato inorgánico procedente de la hidrólisis del ATP, principalmente) y la acumulación de Na^+ en el citosol que tienen lugar durante la isquemia. Esta acumulación de moléculas osmóticamente activas en el medio intracelular es compensada por la expulsión de éstas y otras moléculas al espacio intersticial, donde la ausencia de flujo coronario previene su lavado. La restauración del flujo conlleva el rápido lavado de los metabolitos presentes en el medio extracelular, lo que crea un gradiente osmótico en la membrana plasmática que no es disipado con la suficiente velocidad y, por tanto, provoca la entrada de agua en los cardiomiocitos (Piper et al., 1998).

La contribución del edema intracelular al daño por reperfusión está causada por el aumento en la presión osmótica secundario a la entrada de agua. La presión sobre la cara interna de la membrana plasmática (sarcolema) contribuye al incremento del estrés mecánico del sarcolema durante la reperfusión. Este estrés mecánico causado por el edema no es suficiente por sí solo para romper la membrana, el fenómeno definitorio de la necrosis. Sin embargo, cuando acontece en conjunción con otros eventos estresantes para la membrana (como la hipercontractura, de la que se hablará más adelante), así como con un aumento de la fragilidad del sarcolema, como ocurre durante el inicio de la reperfusión, el edema celular es uno de los mecanismos inductores de la necrosis, tal y como demuestran estudios con reperfusión hiperosmótica en los que se redujo la muerte celular (García-Dorado et al., 1992b; Piper et al., 1998).

2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR INMEDIATA DEPENDIENTES DE CALCIO

El calcio intracelular tiene un papel fundamental en la fisiología celular de todas las células y especialmente del cardiomiocito, pues además de sus funciones como segundo mensajero tiene una función esencial en el acoplamiento entre la excitación y la contracción (Kurihara, 1994; Bers and Guo, 2005). Por tanto, es previsible que una elevación en su concentración como la que se da en el inicio de la reperfusión tenga efectos deletéreos en la célula. Entre estos efectos, los tres principales son la hipercontractura, la disfunción de las mitocondrias, y la activación de proteasas y el aumento de la fragilidad sarcolemal (Garcia-Dorado et al., 2006).

2.1. HIPERCONTRACTURA

El estrés mecánico causado por la hipercontractura es probablemente el principal causante de la necrosis en isquemia/reperfusión, especialmente de aquella observada en los primeros minutos de la reperfusión. La hipercontractura consiste en una activación excesiva del aparato contráctil que conduce a un acortamiento brusco de los cardiomiocitos. Por tanto, produce un aumento de la tensión mecánica debido a la interacción entre miocitos adyacentes que puede producir la rotura del sarcolema y la consiguiente muerte celular que histológicamente se manifiesta como necrosis en bandas de contracción (Figura 2) (Ganote, 1983; Miyazaki et al., 1987; Garcia-Dorado et al., 1992a).

La hipercontractura se produce en los primeros minutos de la reperfusión cuando coincide la sobrecarga de Ca^{2+} con la recuperación parcial de la concentración de ATP, necesario para el ciclo de unión/liberación de la cabeza de la miosina (Holmes and Geeves, 2000), así como con la neutralización del pH ácido citosólico y la reducción en la concentración de fosfato inorgánico, que disminuyen la sensibilidad al Ca^{2+} de los elementos contráctiles (Kurihara, 1994). La recuperación de la función reguladora del Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático afecta al desarrollo de la hipercontractura. En el inicio de la reperfusión y con la recuperación energética, el retículo sarcoplasmático capta Ca^{2+} , lo que atenúa la sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol. Pero si la concentración de Ca^{2+} en el retículo es excesivamente alta, se inicia espontáneamente una serie de oscilaciones en el Ca^{2+} citosólico causadas por la liberación espontánea del catión por parte del retículo (Kurihara, 1994), seguida por su captación por la bomba SERCA. Estas oscilaciones pueden generar hipercontractura en casos en los que la concentración total de Ca^{2+} no sería sufi-

ciente para inducirla, como mostraron experimentos en los que se inhibió tanto la liberación como la captación de Ca^{2+} por parte del retículo y ambas estrategias lograron prevenir la hipercontractura (Siegmund et al., 1997).

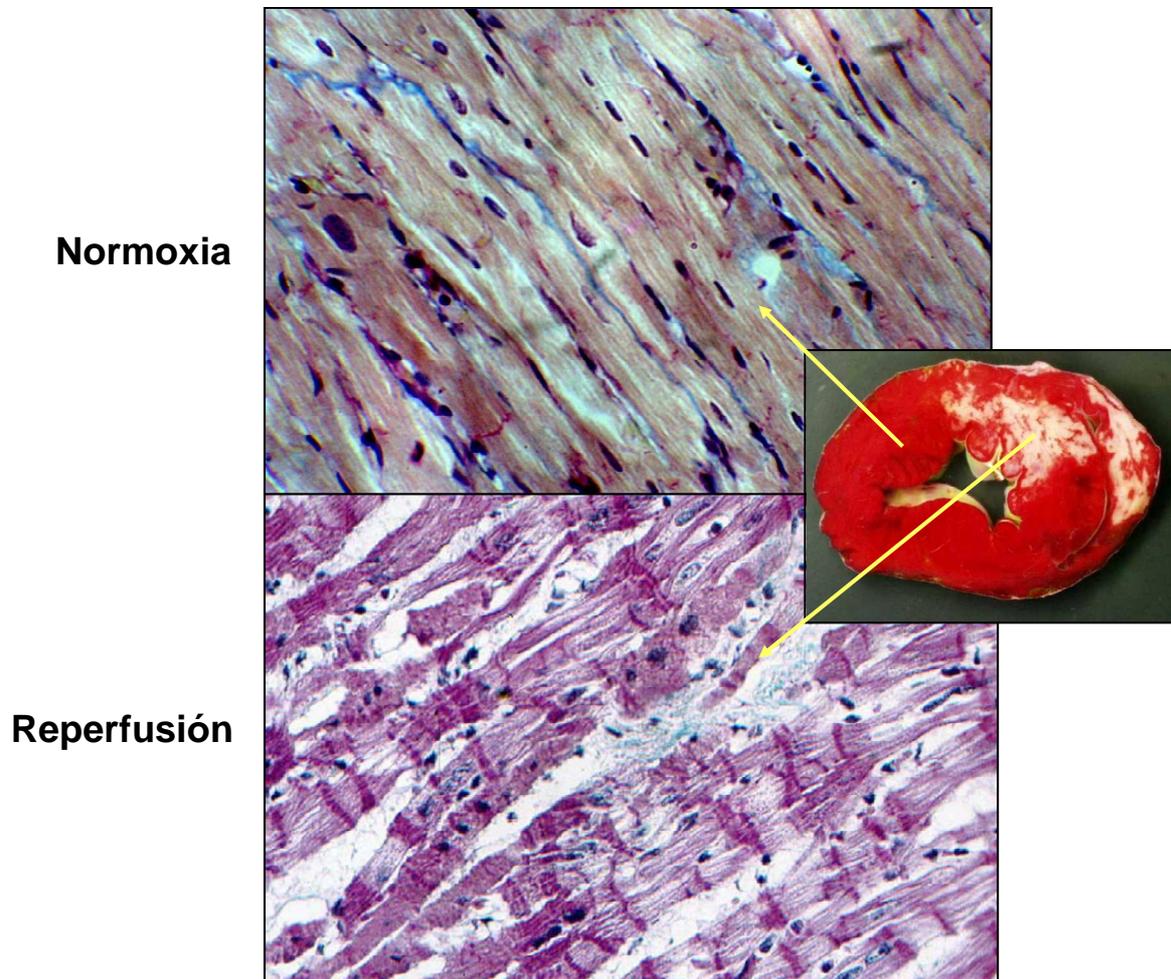


Figura 2. Imágenes representativas de tejido miocárdico de cerdo sometido a perfusión normóxica (arriba) o a isquemia y reperusión (abajo), en las que la tinción tricrómica de Masson muestra las características bandas de contracción en el tejido reperfundido e infartado.

La relevancia de la hipercontractura como causante de muerte celular en la reperusión está sustentada en varias evidencias. Por un lado, se ha demostrado su existencia en los primeros minutos de reperusión, en corazón aislado como aumento de la presión telediastólica e *in vivo* como acortamiento de segmento miocárdico (Barrabes et al., 1996b; Inserte et al., 2002). Por otro lado, la necrosis debida al daño letal por reperusión presenta un patrón histológico conocido como necrosis en bandas de contracción (Ganote, 1983; Miyazaki et al., 1987; Garcia-Dorado et al., 1992a), cuya extensión se correlaciona con la magnitud de la hipercontractura y el tamaño del infarto (Barrabes et al., 1996b). Por último, el desarrollo de hipercontractura coincide en el tiempo con la

liberación enzimática en el corazón aislado y esta liberación se retrasa con la inhibición temporal de la contracción con BDM, llegando a atenuarse la liberación enzimática total si la inhibición de la contracción se prolonga lo suficiente para que los cardiomiocitos reduzcan sus niveles de Ca^{2+} citosólico (García-Dorado et al., 1992a; Schlack et al., 1994). Sin embargo, al igual que en el caso del edema, la hipercontractura por sí sola no es capaz de producir necrosis si no coincide con un aumento de la fragilidad sarcolemal (Ruiz-Meana et al., 1995; Siegmund et al., 1997).

2.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) es un megacanal inespecífico que abierto permeabiliza la membrana mitocondrial a toda molécula de peso molecular inferior a 1.5 kDa, produciendo edema y despolarización mitocondriales, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y liberación de factores proapoptóticos. Su apertura es favorecida por la sobrecarga de Ca^{2+} , estrés oxidativo, depleción de nucleótidos de adenina y despolarización mitocondrial entre otros mecanismos, condiciones que se dan durante la isquemia y el inicio de la reperfusión. Sin embargo, la acidificación de la matriz mitocondrial, causada por el desacoplamiento de la respiración y la acidificación del citosol, previene la apertura del mPTP, manteniéndolo cerrado durante la isquemia (Halestrap et al., 2004; Ruiz-Meana et al., 2004).

La apertura del mPTP durante la reperfusión así como su relevancia se ha demostrado tanto en cardiomiocitos aislados como *ex vivo* en corazones aislados mediante la inhibición de su apertura, ya sea farmacológica (CsA, principalmente) o genética (ratones *knock-out* para Ciclofilina D) (Di Lisa et al., 2001; Halestrap et al., 2004; Baines et al., 2005). Más recientemente, se ha mostrado en un ensayo clínico piloto que la administración intravenosa de CsA en pacientes con infarto agudo de miocardio sometidos a angioplastia primaria es capaz de reducir el tamaño del infarto (Piot et al., 2008). La interrelación entre hipercontractura y la apertura del mPTP, propuesta para explicar el daño por reperfusión, no está todavía bien establecida y la importancia relativa de cada uno de ellos podría variar dependiendo de la duración del episodio isquémico. Se ha sugerido que la liberación de Ca^{2+} mitocondrial con la apertura del poro puede potenciar la inducción de hipercontractura (Ruiz-Meana et al., 2007).

2.3. ACTIVACIÓN DE SISTEMAS PROTEOLÍTICOS

La implicación de proteasas en el daño producido tanto por la isquemia como por la reperfusión en el miocardio reperfundido ha sido investigada desde hace décadas (Ichihara et al., 1987; Yoshida et al., 1990; Campbell et al., 1999; Holly et al., 1999). Existen cuatro sistemas proteolíticos intracelulares principales, todos los cuales han sido estudiados en el ámbito de la muerte celular por isquemia y reperfusión: el sistema lisosomal, el sistema ubiquitina-proteosoma, las caspasas y las calpaínas.

2.3.1. Sistema lisosomal

Los lisosomas son un sistema de orgánulos vacuolares cuya función es la degradación de proteínas presentes en aquellas vacuolas que se fusionan con ellos, como los fagosomas o los endosomas. Con la fusión, los lisosomas aportan tanto un medio ácido como multitud de proteasas, la mayoría de las cuales tienen su actividad máxima a pH ácido, lo que protegería a la célula frente a una liberación anómala del contenido lisosomal. En algunos estudios en miocardio isquémico se ha observado un vertido de proteasas lisosomales al citoplasma (Ichihara et al., 1987; Molchanova et al., 1991). No obstante, no existen estudios en miocardio en los que con una acción específica sobre los lisosomas o sus proteasas se haya demostrado su mediación en la muerte celular, aunque sí lo hay en neuronas (Yamashima et al., 1998).

2.3.1.1. Autofagia

Los lisosomas también participan en la autofagia, un sistema catabólico cuyo papel en el daño por reperfusión está últimamente creciendo en interés. La autofagia es un proceso fisiológico cuya función es la degradación de proteínas de vida larga y orgánulos dañados o excedentes. Las proteínas o estructuras a degradar son rodeadas por una membrana doble, formándose el autofagosoma que posteriormente se fusiona con el lisosoma (Gustafsson and Gottlieb, 2009). Tanto el nivel de activación de la autofagia durante la isquemia y la reperfusión como su efecto sobre la muerte celular son motivo de controversia, quizá debido a la disparidad de modelos utilizados (Gustafsson and Gottlieb, 2009). Se ha descrito tanto una disminución de la inducción de autofagia durante la isquemia con una recuperación parcial durante la reperfusión, como un aumento de la autofagia durante la isquemia/reperfusión. En aquellos estudios en los que se observa un aumento de la autofagia, los activadores sugeridos son el descenso en los niveles de

ATP, la hipoxia, la sobrecarga de Ca^{2+} , los ROS, la apertura del mPTP y el estrés del retículo sarcoplasmático (Gustafsson and Gottlieb, 2009).

2.3.2. Sistema ubiquitina-proteosoma

El sistema ubiquitina-proteosoma es una vía de degradación de proteínas encargada de la eliminación de la mayoría de proteínas intracelulares, especialmente de aquellas mal plegadas, desnaturalizadas o dañadas químicamente. La vía se inicia con la unión covalente de la proteína ubiquitina a la proteína a degradar, a la que se pueden unir más ubiquitinas para formar una cadena cuya forma y longitud determina el destino de la proteína. Si éste es la degradación, la proteína es degradada por el proteosoma, un complejo proteico de 2000 kDa que en su núcleo catalítico posee diferentes tipos de actividad proteolítica. Todo el proceso, tanto la ubiquitinación como la proteólisis, es dependiente de ATP. El papel del sistema en el daño por reperfusión no está claro. Por un lado, existen estudios que muestran que la inhibición experimental del proteosoma en isquemia/reperfusión reduce la muerte celular y mejora la recuperación funcional (Zolk et al., 2006). Sin embargo, también existen trabajos en los que la inhibición del proteosoma causa apoptosis en corazones en normoxia y empeora la recuperación funcional del corazón tras isquemia, mientras que la cardioprotección por preconditionamiento se asocia a un incremento de la actividad del proteosoma (Powell et al., 2000; Powell et al., 2005). Por tanto, se ignora el papel del proteosoma en la muerte celular durante la reperfusión, y si este papel es variable dependiendo de la duración de la isquemia y otras variables.

2.3.3. Caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas implicadas en la iniciación y ejecución de la apoptosis. Su forma nativa es la de precursores o procaspasas, son activadas por lisis proteica, e integran cascadas en las que hay caspasas, como la 8 y la 9, responsables de transmitir el estímulo apoptótico a caspasas efectoras, como la 3, que mediante su actividad proteolítica degrada proteínas estructurales y activa enzimas, dando lugar a los cambios bioquímicos y estructurales característicos de la apoptosis. La apoptosis es una vía de muerte celular programada altamente regulada y dependiente de ATP que se caracteriza por una disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y del núcleo, aparición de vesículas en la membrana plasmática y formación de los cuerpos apoptóticos (Gustafsson and Gottlieb, 2003).

2.3.3.1. Apoptosis en el miocardio reperfundido

Existen dos vías principales de inducción de apoptosis en las que participan las caspasas, la extrínseca o mediada por receptores de muerte celular, y la intrínseca o mitocondrial, que es la principal en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión y la que resulta afectada por el Ca^{2+} intracelular. Esta vía se inicia con la liberación por parte de las mitocondrias de citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF), Smac/Diablo, endonucleasa G y procaspasas (Gustafsson and Gottlieb, 2003). El Ca^{2+} puede activar esta vía a través de la inducción de la apertura del mPTP. Esta liberación de factores proapoptóticos puede ser apoyada por la activación citosólica de DNasa I (es dependiente de Ca^{2+}), de calcineurina, que en ciertas circunstancias puede inducir apoptosis, así como de calpaínas, cuyos efectos se detallarán más adelante (Gustafsson and Gottlieb, 2003).

La magnitud de la extensión de la apoptosis en el tejido miocárdico sometido a isquemia y reperfusión es controvertida. La principal causa de ello es el uso de técnicas para la identificación de células apoptóticas que detectan fenómenos, como la fragmentación del ADN, que también pueden tener lugar en la necrosis. Esta inespecificidad implica que sobretodo en los primeros estudios se pueda haber sobreestimado la prevalencia de la apoptosis en los cardiomiocitos isquémicos o reperfundidos (French et al., 2009). Asimismo, las estrategias utilizadas en estudios para la inhibición de la apoptosis y la consecuente reducción de la muerte celular, ya fueran farmacológicas o genéticas, han dado resultados poco concluyentes debido a una falta de efectividad o a dudas sobre la especificidad que hacen imposible descartar efectos sobre procesos causantes de necrosis. Por otra parte, aunque la apoptosis es un mecanismo esencial de muerte celular en células proliferativas, su relevancia en células diferenciadas terminalmente se ha puesto en cuestión, y hay datos que sugieren que la vía de la caspasa 3 no es operativa en neuronas o cardiomiocitos adultos (Sanchis et al., 2008). También está en contra de su interés terapéutico la posibilidad de que la inhibición de la apoptosis afecte al desarrollo de la inflamación y la reparación del tejido afectado, lo que podría reducir su efectividad como terapia cardioprotectora (Yaoita et al., 2000).

2.3.4. Calpaínas y fragilidad sarcolemal

Por último, las proteasas más directamente reguladas por el Ca^{2+} son las calpaínas, una familia de cisteín proteasas no lisosomales dependientes de Ca^{2+} . La actividad de estas proteasas durante la isquemia/reperfusión causa la degradación de proteínas estructurales (Yoshida et al., 1995; Inserte et al., 2004), la cual se ha asociado a un

INTRODUCCIÓN

aumento de la fragilidad del sarcolema (Armstrong et al., 2001; Inverte et al., 2004). Dada la relevancia que las calpaínas tienen en este trabajo, sus características y su implicación en el daño letal por reperfusión se detallan a continuación.

3. LA μ -CALPAÍNA Y LA m-CALPAÍNA

Las calpaínas son una amplia familia de cisteín proteasas no lisosomales dependientes de Ca^{2+} . En un principio se descubrieron dos proteasas, la μ -calpaína (o calpaína 1) y la m-calpaína (o calpaína 2), que son los dos miembros de la familia que se expresan ubicuamente en vertebrados y presentan las características consideradas como típicas de estas proteasas: son activadas por Ca^{2+} , su actividad es óptima a pH neutro, se localizan intracelularmente mayoritariamente en el citosol, y son heterodímeros que constan de una subunidad pequeña de 28 kDa, común a ambas y de función reguladora, y una subunidad grande de 80 kDa, de función catalítica y específica de la calpaína (Dayton et al., 1976; Goll et al., 2003). Estas dos calpaínas, conocidas como calpaínas clásicas o ubicuas, se distinguen entre sí por sus diferentes requisitos de Ca^{2+} , los cuales son del orden del micromolar en el caso de la μ -calpaína y del orden del milimolar para la m-calpaína. Estas dos calpaínas son importantes para el correcto desarrollo de diversos procesos fisiológicos en vertebrados, hasta el punto de que ratones *knock-out* para la m-calpaína no completan su desarrollo embrionario (Goll et al., 2003; Dutt et al., 2006).

Además de estas dos calpaínas, cuyas cadenas polipeptídicas están codificadas por tres genes, se han detectado en humanos otros 12 genes codificantes para polipéptidos con homología de secuencia con la subunidad grande o la pequeña de las calpaínas ubicuas. Estas calpaínas han sido estudiadas en menor medida y presentan diferencias respecto a la μ - y la m-calpaína en cuanto a la distribución de su expresión (específica de tejido para las calpaínas 3, 6, 8, 12 y 13), su expresión como monómeros u homodímeros (calpaínas 3, 6, 8 y 13), su dependencia del Ca^{2+} (dudosa en calpaínas 5, 6, 7, 10, 13 y 15) y la carencia de actividad catalítica (calpaína 6, aunque en otras aún no se ha confirmado la actividad proteolítica) (Figura 3) (Goll et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Ravulapalli et al., 2009).

3.1. EXPRESIÓN

Como se ha dicho, la μ - y la m-calpaína son codificadas por tres genes: *capn1* y *capn2*, respectivamente, para la subunidad catalítica, y *capn4* (también *cpns1*) para la subunidad reguladora. Aunque su expresión se considera ubicua, hay tejidos que no presentan cantidades detectables de m-calpaína (plaquetas y eritrocitos humanos) o de μ -calpaína (plaquetas bovinas y músculo liso vascular) (Goll et al., 2003). Estudios con ratones *knock-out* para la subunidad reguladora muestran que la expresión de esta

INTRODUCCIÓN

subunidad es necesaria para la correcta expresión proteica de la subunidad catalítica (Tan et al., 2006), lo que sugiere un papel de la subunidad pequeña en la estabilización de la grande, en concordancia con estudios *in vitro* (Yoshizawa et al., 1995; Meyer et al., 1996).

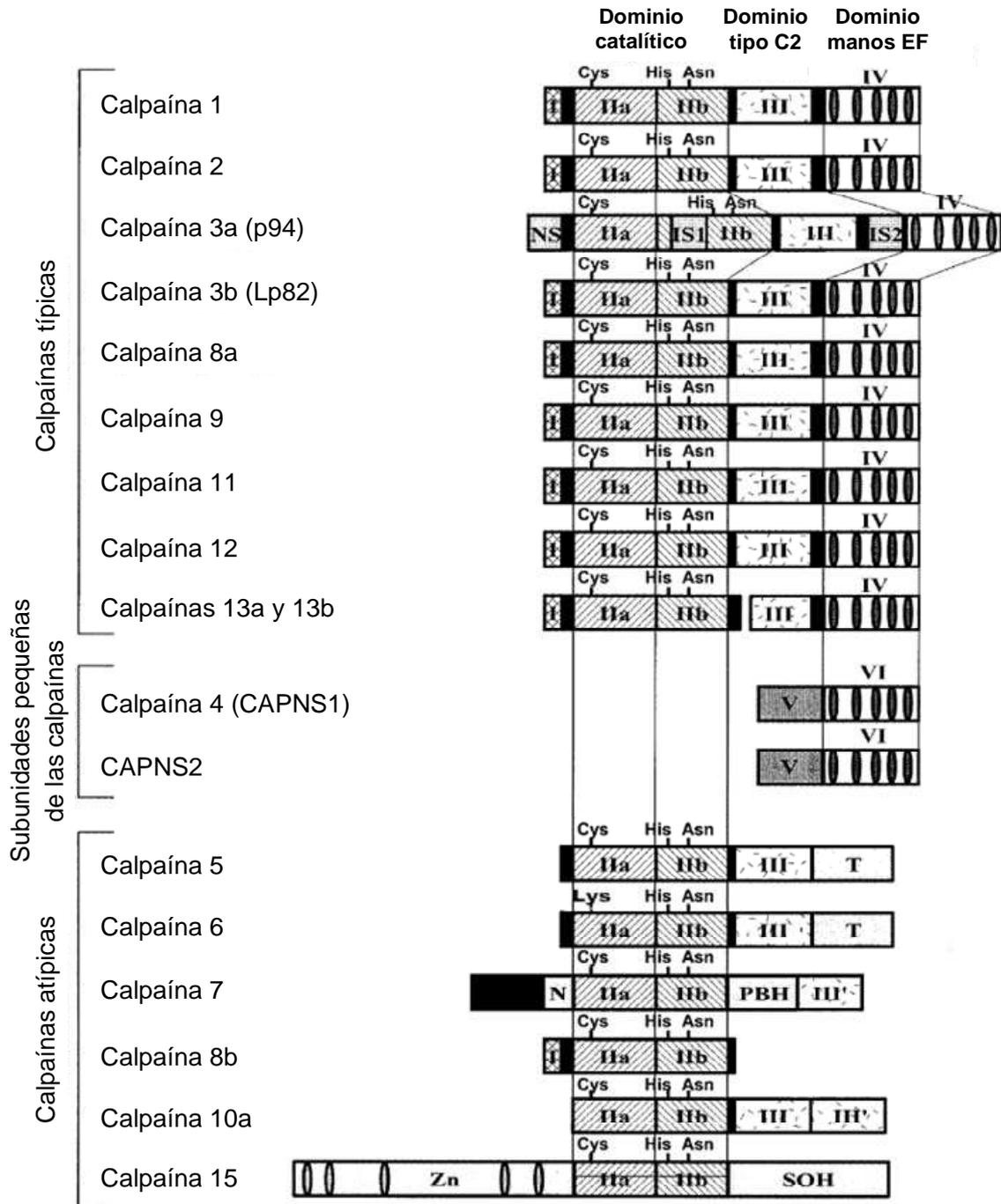


Figura 3. Proteínas de la familia de las calpaínas y dominios que presentan. La μ -calpaína y la m -calpaína se componen de la subunidad grande (Calpaína 1 y 2, respectivamente) y la pequeña (CAPNS1). Adaptado de Suzuki et al., 2004 .

La regulación de la expresión de estas calpaínas, dada su presencia de forma constitutiva en la mayoría de tejidos, no ha sido estudiada en detalle, y sólo hay información de los promotores de los genes humanos codificantes para la subunidad de 80 kDa de la m-calpaína y la subunidad de 28 kDa. Ambos genes carecen en sus regiones reguladoras de cajas TATA o CAAT, mientras que son ricas en GC, características típicas de genes de mantenimiento. En la subunidad de 80 kDa se han hallado cuatro elementos negativos sobre la transcripción, así como dos elementos promotores. Asimismo, la activación de proteína cinasa C (PKC) con TPA induce un aumento de la expresión de esta subunidad, que se debería a la presencia de un elemento similar al de respuesta al TPA de la colagenasa. Ambas subunidades presentan además secuencias de unión a los factores de transcripción AP-1 y Sp1, mientras que para la subunidad pequeña también se ha detectado la unión de NRF-1 (Asangani et al., 2008). En cuanto al *splicing*, no se han encontrado variantes para la μ - o la m-calpaína (Goll et al., 2003).

En corazón se expresan de forma abundante la μ -calpaína, la m-calpaína y su inhibidor endógeno, la calpastatina (Salamino et al., 1994; Sorimachi et al., 1997; Ilian et al., 1999; Sandmann et al., 2001; Farkas et al., 2003). Aun cuando según algunos estudios la calpaína 3, específica de músculo esquelético, también es expresada a nivel de ARNm en corazón (Poussard et al., 1996; Farkas et al., 2003), otro estudio no la ha detectado (Sorimachi et al., 1989), y la distrofia LGMD2A, causada por mutaciones en el gen para calpaína 3, no se acompaña de cardiopatía (Kramerova et al., 2007); por tanto, los datos actuales sugieren que la calpaína 3 no se expresa en miocardio en cantidad suficiente como para tener significado biológico, y son la μ -calpaína y la m-calpaína las calpaínas principalmente expresadas en el miocardio.

3.2. ESTRUCTURA

Ambas enzimas son heterodímeros y constan de seis dominios, cuatro de los cuales corresponden a la subunidad de 80 kDa mientras que los dominios V y VI corresponden a la subunidad de 28 kDa (Figuras 3 y 4).

3.2.1. Estructura de la subunidad reguladora

La subunidad de 28 kDa es idéntica en ambas calpaínas. La región aminoterminal de la subunidad o dominio V es formada por 101 residuos de los cuales una gran proporción son glicina o aminoácidos hidrofóbicos. Existen evidencias de que este dominio está

implicado en la interacción de las calpaínas con membranas (Fernandez-Montalvan et al., 2006). El dominio carboxiterminal VI presenta cinco secuencias de unión a Ca^{2+} de tipo mano EF y cierta homología con la calmodulina. Otras proteínas con cinco manos EF forman dímeros y se asocian a membranas, lo que sugiere un papel relevante de este dominio en estas dos propiedades de las calpaínas (Goll et al., 2003).

3.2.2. Estructura de la subunidad catalítica

Las subunidades de 80 kDa son diferentes para cada calpaína, aunque presentan una homología en sus secuencias de alrededor del 60%. Por secuencia aminoacídica se dividieron en cuatro dominios y aunque estudios cristalográficos posteriores en m-calpaína han identificado 6 dominios, dos son de tan solo 18 (región aminoterminal) y 17 aminoácidos (región *linker* entre dominios III y IV), por lo que se ha mantenido la división original (Goll et al., 2003).

El dominio I (aminoterminal) es relativamente pequeño en ambas enzimas (87 y 76 residuos para un total de 714 residuos en la μ -calpaína y 699 residuos en la m-calpaína, respectivamente) (Goll et al., 2003).

El dominio II está subdividido según resultados de estudios cristalográficos en dos subdominios, IIa y IIb. En estos se halla la tríada catalítica característica de las cisteín proteasas, consistente en un residuo de cisteína en posición 115 (μ -calpaína) o 105 (m-calpaína), en el dominio IIa, así como una histidina en 272 (μ -calpaína) o 262 (m-calpaína), y una asparagina en 296 (μ -calpaína) o 286 (m-calpaína), en el dominio IIb (Goll et al., 2003). Se ha mostrado mediante estudios con un fragmento de μ -calpaína compuesto de los dominios I y II que tanto el dominio IIa como el IIb presentan un lugar de unión a Ca^{2+} cada uno (Moldoveanu et al., 2002).

El dominio III, adicionalmente a su función de unión y transmisión de cambios conformacionales entre el dominio de unión a Ca^{2+} (IV) y el catalítico (II), parece mediar las interacciones con fosfolípidos que se han observado en las calpaínas. Su estructura recuerda la de dominios C2, los cuales son regiones de unión a Ca^{2+} y fosfolípidos en diversas proteínas (Suzuki et al., 2004). Presenta además una secuencia potencial de mano EF cerca del dominio II, pero que, tal y como se ha observado en la m-calpaína por cristalografía, no adopta una estructura de mano EF y, por tanto, en esta calpaína no une Ca^{2+} (Goll et al., 2003; Hanna et al., 2008).

El dominio IV (carboxiterminal), como el VI de la subunidad de 28 kDa, presenta cierto grado de homología con la calmodulina y cinco secuencias de unión a Ca^{2+} del tipo

mano EF. La dimerización de las dos subunidades está mediada por la quinta mano EF y los residuos carboxiterminales de los dominios IV y VI, que no sólo están altamente conservados sino que presentan una elevado grado de identidad entre ambas subunidades (Goll et al., 2003).

3.2.3. Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria de la m-calpaína en ausencia de unión de iones de Ca^{2+} es compacta (Figura 4). El dominio II, donde reside la actividad hidrolítica, presenta los dos subdominios (IIa y IIb) con una hendidura de unión a sustrato entre ellos, mientras que los residuos de la tríada catalítica permanecen separados por más de 10 Å. El dominio I interactúa con el VI y el III con el IIb, lo que estabiliza la conformación del núcleo proteolítico. Los dominios IV y VI, a través de la interacción de sus extremos carboxiterminales, mantienen la asociación de las dos subunidades. La conformación del dominio V es móvil por lo que su estructura cristalina no es observable. La estructura de la μ -calpaína, dadas las similitudes entre ambas proteínas, es asumida como muy similar a la de la m-calpaína (Goll et al., 2003; Suzuki et al., 2004).

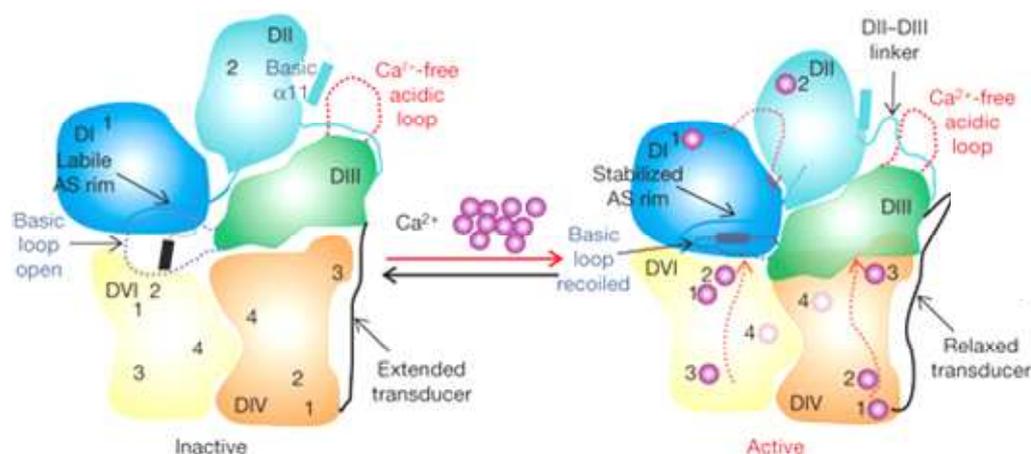


Figura 4. Esquema de la estructura obtenida por cristalografía de la m-calpaína en su conformación libre de Ca^{2+} (izquierda) y unida a Ca^{2+} (derecha). DI corresponde a los dominios I y IIA del texto, y DII al IIB; el dominio V no está representado al no ser detectable por cristalografía. Las flechas rojas y punteadas indican los cambios inducidos por la unión del Ca^{2+} . (Moldoveanu et al., 2008)

3.3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD FISIOLÓGICA

Las calpaínas fueron descritas como proteasas dependientes de Ca^{2+} y todos los estudios posteriores han confirmado el papel principal del Ca^{2+} en su activación. De hecho, entre todos los factores activadores que hasta el día de hoy han sido encontrados,

el Ca^{2+} es el único que puede activar las calpaínas *in vitro* por sí solo en ausencia de otros agentes. No obstante, la concentración de Ca^{2+} a la que estas proteasas se activan *in vitro*, especialmente en el caso de la m-calpaína, es inalcanzable mediante mecanismos fisiológicos, por lo que se sugiere que otros factores regulan la actividad de las calpaínas, ya sea reduciendo los requisitos de Ca^{2+} de la proteasa o colocándola en presencia de altas concentraciones locales de Ca^{2+} . Por tanto, la regulación de la actividad de la μ -calpaína y de la m-calpaína en situaciones fisiológicas es un sistema complejo y aún poco definido; de estos factores adicionales se ignora si todos ellos tienen relevancia fisiológica así como si participan en varios o todos los procesos celulares en los que se activan las calpaínas, o si los mecanismos de regulación de su actividad difieren entre tipos celulares. Incluso en aquellos casos en los que trastornos patológicos provocan una sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol, el resto de factores podrían continuar modulando la actividad de las proteasas y, por tanto, afectar al desarrollo de la enfermedad. Entre estos reguladores que se han descrito están la fosforilación, la interacción con fosfolípidos o su translocación a membrana, activadores proteicos y la calpastatina, su inhibidor endógeno (Goll et al., 2003).

3.3.1. Ca^{2+}

El Ca^{2+} activa las calpaínas mediante la inducción de cambios conformacionales en la subunidad de 80 kDa que a su vez provocan la alineación del centro catalítico. A partir de estudios cristalográficos de la estructura de la m-calpaína, este proceso de activación parece tener dos fases: en una primera, el Ca^{2+} se une a los dominios IV y VI (4 iones en cada dominio), lo que provoca un acercamiento de estos dominios hacia el núcleo catalítico (dominio II), un desplazamiento del dominio I, que se disociaría del dominio VI, y una interacción de los dominios IIa y III que estabilizaría el núcleo de la enzima; en una segunda fase, la unión de Ca^{2+} a los lugares de unión en el dominio II alinearía los dos subdominios de manera que el centro catalítico se formaría (Figura 4) (Moldoveanu et al., 2002; Hanna et al., 2008; Moldoveanu et al., 2008). A partir de estudios de sustitución de residuos consecutivos de la m-calpaína con la región equivalente de la μ -calpaína, se ha demostrado que las diferencias en cuanto a los requisitos de calcio están determinadas por la proteína completa, estando implicadas regiones que carecen de lugar de unión a Ca^{2+} . Se ha propuesto que la disociación de la subunidad catalítica de la reguladora es parte del proceso de activación de la proteasa; los resultados experimentales son contradictorios y tanto la existencia de esta disociación en condiciones fisiológicas, como su

posible función como parte del proceso de activación, o reduciendo la estabilidad de la proteasa (y, por tanto, inhibiendo su actividad), siguen por determinar (Goll et al., 2003).

3.3.2. Autolisis

La autolisis del extremo aminoterminal de las calpaínas es un fenómeno que tiene lugar en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} y cuyo papel en el proceso de activación de las proteasas no está claro. La autolisis se da tanto en la subunidad grande (dominio I) como en la pequeña (dominio V) de forma rápida y reduce la concentración de Ca^{2+} necesaria para que la proteasa sea activada (para la μ -calpaína, la concentración de Ca^{2+} para actividad semimáxima pasa de 3-50 μM a 0.5-2.0 μM , y para la m-calpaína, de 400-800 μM a 50-150 μM). Y en estudios cinéticos la autolisis precede a la actividad, sugiriendo que la autolisis es un paso del proceso de activación y que las calpaínas son proenzimas. No obstante, las concentraciones de Ca^{2+} necesarias para inducir esta proteólisis son similares a las requeridas para su activación (50-150 μM para la μ -calpaína, 550-800 μM para la m-calpaína), la autolisis reduce la estabilidad de la proteína, se ha observado actividad proteolítica en calpaínas no autolizadas, y la estructura de la m-calpaína descarta que los dominios I o V bloqueen el centro catalítico de la proteasa. Además, los resultados en células o tejidos que muestran actividad proteolítica de las calpaínas no permiten afirmar o negar la existencia de autolisis, por lo que el papel de ésta en la activación de las calpaínas continúa siendo controvertido (Goll et al., 2003).

3.3.3. Translocación a membrana

La translocación a membrana de las calpaínas ha sido observada en multitud de condiciones y modelos experimentales, aunque con disparidad en las condiciones de activación de las calpaínas en la membrana, la existencia de autolisis y la concentración de Ca^{2+} necesaria para la translocación. Mientras que en eritrocitos se observó que un aumento de la concentración de Ca^{2+} producía un aumento de la calpaína asociada a membrana (Inomata et al., 1989; Molinari et al., 1994), en otros modelos estos mecanismos han sido puestos en duda, observándose la translocación mediada por fosforilación en fibroblastos (Shao et al., 2006), la presencia de μ -calpaína en membrana de forma mayoritaria en neuronas corticales, sin translocación ni autolisis observables en su activación (Hewitt et al., 1998), la activación sin translocación ni autolisis en riñón dañado con

antimicina A (Liu et al., 2001), y la correlación inversa entre la presencia de calpaína en membrana y la degeneración de la fibra muscular en distrofia mdx murina (Spencer and Tidball, 1996). La naturaleza de esta interacción de las calpaínas con membranas tampoco está clara, pues no hay consenso sobre las moléculas a las que las calpaínas estarían unidas; hay estudios que proponen que son fosfolípidos (como PI y PIP₂), que *in vitro* y a elevada concentración reducen los requisitos de Ca²⁺ para la autólisis (Goll et al., 2003; Fernandez-Montalvan et al., 2006; Shao et al., 2006), mientras que otros afirman que son proteínas (Inomata et al., 1989; Melloni et al., 2000b; Shulga and Pastorino, 2006). La existencia de varios estudios que asocian a las calpaínas con *lipid rafts*, dominios de membrana plasmática de composición lipídica característica (como la elevada presencia de PIP₂) y con funciones (y proteínas que las realizan) específicas, podría explicar las divergencias de los resultados sobre las moléculas que median la translocación a membrana de las calpaínas (Morford et al., 2002; Goudenege et al., 2005; Nuzzi et al., 2007). Por otro lado, las regiones proteicas implicadas en la interacción con la membrana parecen ser el dominio III (Suzuki et al., 2004; Shao et al., 2006) y/o el dominio V (Fernandez-Montalvan et al., 2006).

El papel que la translocación a membrana tiene en la regulación de la actividad de las calpaínas está por determinar. La translocación de las calpaínas a membrana podría tener como finalidad reducir los requisitos de Ca²⁺ debido a la interacción con proteínas y/o lípidos, mantenerlas fuera del alcance de la calpastatina (Molinari and Carafoli, 1997), localizarlas en regiones celulares con elevadas concentraciones de Ca²⁺ (Hood et al., 2006), o ponerlas en contacto con sus substratos de membrana (Zalewska et al., 2004). Finalmente, también existen dudas sobre el lugar en el que las calpaínas translocadas realizan su actividad proteolítica; mientras que hay estudios que describen actividad de las calpaínas específicamente en membrana (Molinari et al., 1994; Youn et al., 2009), y muchos de los substratos de las calpaínas son proteínas de membrana o asociadas a ella (Goll et al., 2003), hay estudios que afirman que las calpaínas son liberadas y ejercen su actividad en el citosol (Inomata et al., 1989; Youn et al., 2009).

3.3.4. Calpastatina

La primera proteína que fue identificada como reguladora de la actividad de las calpaínas fue la calpastatina, y hasta el día de hoy es la única proteína conocida con una acción inhibitoria específica sobre las calpaínas ubicuas (quininógeno y α 2-macroglobulina inhiben varias proteasas, entre ellas las calpaínas). La calpastatina es una proteína

monomérica sin estructura determinada y codificada por un único gen que, debido al uso de diferentes promotores y al *splicing* alternativo, produce un elevado número de isoformas distintas. Su expresión es constitutiva y presente en todos los tipos celulares, aunque la isoforma expresada varía según tejido y especie (Goll et al., 2003).

3.3.4.1. Estructura de la calpastatina

El polipéptido de la calpastatina consta de 4 dominios inhibidores similares entre sí junto con dos dominios aminotermiales llamados XL y L, aunque la calpastatina expresada puede carecer del dominio XL, del XL y del L, o de ambos junto con el dominio I. Los dominios inhibidores presentan 3 subdominios o regiones (A, B y C), y estos tres subdominios son suficientes para unirse a la proteasa e inhibirla, lo que sugiere que una molécula de calpastatina tiene la capacidad de inhibir cuatro moléculas de calpaína simultáneamente (Goll et al., 2003; Hanna et al., 2007).

3.3.4.2. Unión calpastatina-calpaína

La unión de la calpastatina a la proteasa es reversible y dependiente de Ca^{2+} ; si bien la proteína en sí no une Ca^{2+} , solamente cuando la m-calpaína está en su conformación activa pueden las regiones A y C unirse respectivamente a los dominios IV y VI de la calpaína. Con esta unión la región B forma un bucle sobre el sitio activo de la proteasa, impidiendo la unión de substrato a la vez que manteniendo el polipéptido lejos del alcance de la actividad hidrolítica de la proteasa (Figura 5) (Hanna et al., 2008; Moldoveanu et al., 2008). Sin embargo, un estudio ha observado la asociación de calpastatina y calpaína a concentraciones de Ca^{2+} bajas, unión que depende del dominio L de la calpastatina y que es sensible a la fosforilación de la calpastatina por la PKC (Melloni et al., 2006).

3.3.4.3. Regulación de las calpaínas por calpastatina

El hecho de que la calpastatina se una a la calpaína cuando ésta se activa plantea dudas sobre cómo ejerce la calpastatina su función reguladora sobre la proteasa. Se ha propuesto que la función de la translocación a membrana sería poner a la calpaína más allá del alcance de la calpastatina (Molinari and Carafoli, 1997); pero siendo el Ca^{2+} el responsable reconocido tanto de la activación de la calpaína como de su translocación a membrana como de la unión de la calpastatina, y siendo la calpastatina substrato de la actividad catalítica de las calpaínas (Sorimachi et al., 1997; Doumit and Koohmaria,

1999; De Tullio et al., 2000), es necesaria la identificación de otros factores que aclaren el funcionamiento del sistema.

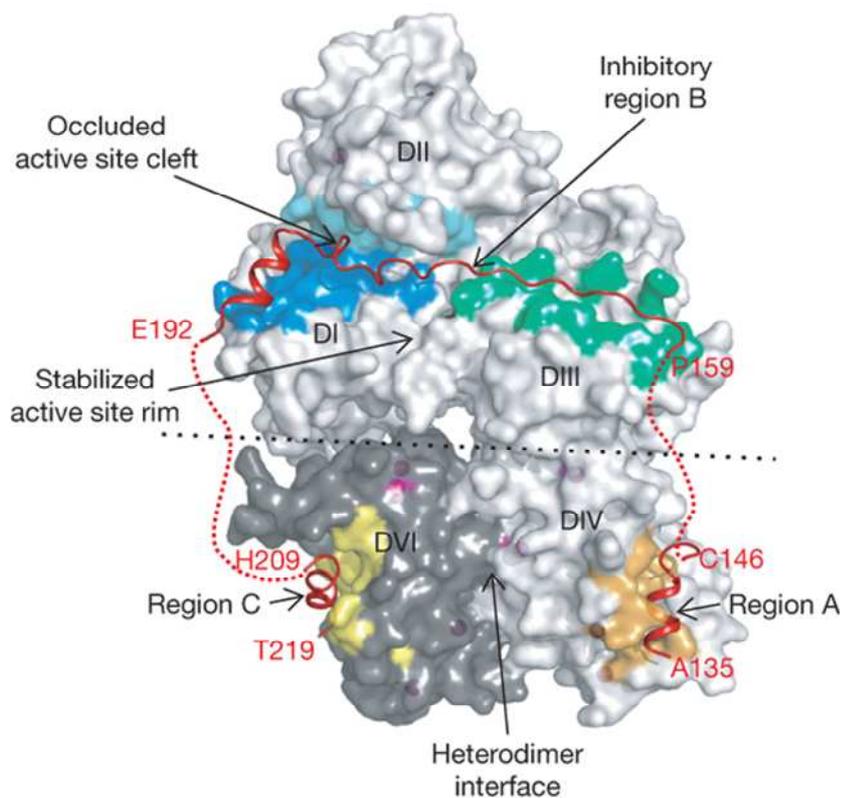


Figura 5. Estructura obtenida por cristalografía del complejo formado por la m-calpaína y el dominio I de la calpastatina (en rojo). DI corresponde a los dominios I y IIA del texto, y DII al IIB; el dominio V no está representado al no ser detectable por cristalografía. Las regiones A y C de la calpastatina se unen a los dominios IV y VI, respectivamente; la región B se une a los dominios IIA y III y forma un bucle sobre el sitio catalítico. (Moldoveanu et al., 2008)

Una de las hipótesis es que la calpastatina inhibiera la calpaína con una baja concentración de Ca^{2+} mientras que con altas concentraciones de Ca^{2+} la calpaína proteolizara a su inhibidor y quedara libre. A esta hipótesis se oponen dos objeciones principales; por un lado, la conformación de la calpaína unida a calpastatina es la de la proteasa activa, por lo que no serían esperables cambios en la proteasa con un aumento del Ca^{2+} (Hanna et al., 2008; Moldoveanu et al., 2008); además, la calpastatina degradada conserva su capacidad inhibidora mientras sus fragmentos contienen dominios íntegros (con subdominios A, B y C), lo que ocurre hasta que transcurre un tiempo considerable o aumenta la concentración de Ca^{2+} hasta el punto de activar la m-calpaína (De Tullio et al., 2000); si éste fuera el mecanismo regulador de las calpaínas ubicuas, ambas se activarían en las mismas situaciones y serían redundantes, lo que está descartado por los

resultados con ratones *knock-out* para μ -calpaína o m-calpaína (Azam et al., 2001; Dutt et al., 2006).

Otro posible mecanismo es la regulación de la cantidad de calpastatina en citosol: se ha descrito que la calpastatina se encuentra fosforilada y agregada cerca del núcleo; la elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular defosforila y solubiliza la calpastatina, mientras que la fosforilación por PKA la devuelve a su estado agregado (Averna et al., 2001). Sin embargo, si es verdad que en condiciones basales la calpastatina está unida a la calpaína, ninguno de estos modelos explicaría cómo se libera la proteasa de la inhibición de la calpastatina. Una posible explicación la puede dar un estudio en el que se observó que la caspasa 8 provoca la disrupción de la unión entre la m-calpaína y la calpastatina, permitiendo la activación de la proteasa (Barbero et al., 2009). La implicación de otras proteínas, por tanto, es posible y ayudaría a entender la función de la calpastatina, pero complicaría el modelo.

3.3.5. Proteínas reguladoras

La actividad de las calpaínas puede ser regulada a través de la interacción con proteínas que no son sustrato de su actividad catalítica. Aparte de la calpastatina se han detectado otras proteínas con efecto sobre la actividad de las calpaínas. Entre éstas hay que reducen los requisitos de Ca^{2+} de las calpaínas a través de su interacción en relación molar 1:1, lo que sugiere la necesidad de unión entre estas proteínas y no una actividad enzimática de la proteína sobre la calpaína (Goll et al., 2003). Aunque algunas de estas proteínas no han sido caracterizadas en detalle, la proteína de unión a acil-CoA ha sido identificada, con trabajos en los que se demuestra la relevancia fisiológica de esta interacción (Melloni et al., 2000a; Shulga and Pastorino, 2006). Otra proteína con efectos sobre la actividad de la m-calpaína es Gas2, que inhibe la proteólisis de p53 mediada por la proteasa (Benetti et al., 2001). Otras proteínas que tienen efectos sobre la actividad máxima de las calpaínas pero no sobre su sensibilidad al Ca^{2+} han sido detectadas, pero siguen sin haber sido identificadas tras décadas desde su descubrimiento (Goll et al., 2003).

3.3.6. Fosforilación

Otro de los mecanismos que regulan la actividad de las calpaínas es la fosforilación. La existencia de residuos fosforilados en las calpaínas ubicuas ha sido detectada

mediante diversas técnicas, como espectrometría de masas MALDI-TOF, inmunodetección con anticuerpos contra residuos fosforilados de serina, treonina o tirosina, o captación de ^{32}P (Shiraha et al., 2002; Goll et al., 2003; Glading et al., 2004; Xu and Deng, 2006b). Sin embargo, la función de estas modificaciones post-traduccionales en la estructura o en la actividad catalítica de las calpaínas no está clara. Si bien los primeros estudios detectaron hasta 9 residuos distintos fosforilados en la μ -calpaína y 8 en la m-calpaína, no todas las moléculas presentaban los mismos residuos fosforilados; además, estos residuos sólo eran defosforilables por fosfatasa en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} , y esta defosforilación reducía su actividad significativamente, sugiriendo una función estructural constitutiva en la conformación de la proteína (Goll et al., 2003). Pero otros estudios han demostrado fosforilación *in vivo* e *in vitro* de las calpaínas, así como que esta fosforilación modifica su actividad proteolítica. Se han detectado una fosforilación activadora, en Ser50, y otra inhibidora, en Ser369 y/o Thr370.

3.3.6.1. Fosforilación en Ser50

La fosforilación en Ser50 es catalizada por las cinasas ERK; la capacidad de ERK1 y ERK2 para fosforilar m-calpaína y μ -calpaína ha sido demostrada *in vitro* (Glading et al., 2004; Xu and Deng, 2004), y se ha identificado el residuo implicado mediante mutaciones que previnieron la fosforilación (substituyendo serina por alanina) o mimetizaron el efecto de ésta (cambiando serina por glutamato) (Glading et al., 2004). La fosforilación de la m-calpaína en Ser50 puede activar la proteasa, incluso en ausencia de Ca^{2+} , en fibroblastos estimulados con EGF (Glading et al., 2004), y aumentar su presencia en membrana (Shao et al., 2006).

3.3.6.2. Fosforilación en Ser369 y Thr370

En cuanto a la fosforilación en los residuos 369 y/o 370, está catalizada por la proteína cinasa A (PKA); se demostró *in vitro* coincubando PKA con m-calpaína normal o con la mutación ST369AA (substitución de serina y treonina por dos alaninas), no observándose fosforilación en la calpaína mutada. Esta fosforilación inhibe la actividad de la calpaína en fibroblastos (Shiraha et al., 2002). Un estudio *in vitro* con diversas mutaciones en m-calpaína confirmó el efecto inhibitorio de las mutaciones Ser369Asp, Ser369Glu y Thr370Glu, mientras que no observó cambios en la actividad ni en la sensibilidad al Ca^{2+} en la m-calpaína con las mutaciones Ser50Asp, Ser50Glu, Ser67Glu y Thr70Glu (Smith et al., 2003).

3.3.6.3. Fosforilación indeterminada

Sin haber identificado los residuos implicados, otros trabajos describen regulación de la actividad de las calpaínas mediada por cinasas o fosfatasas. La PKC ϵ fosforila μ -calpaína y m-calpaína *in vitro*, mientras que *in vivo* su sobreexpresión aumenta el grado de fosforilación de las proteasas y la inhibición de la expresión de PKC ϵ previene la activación de las calpaínas inducida por nicotina (Xu and Deng, 2006a). La fosfatasa PP2A, por su parte, defosforila ambas calpaínas *in vitro*, y su sobreexpresión previene su activación por nicotina (Xu and Deng, 2006b). Otros trabajos relacionan la activación de la PKA con la inhibición de la actividad de las calpaínas; la activación de la cinasa en neuronas inhibe la actividad de las calpaínas en neuritas consolidadas (Mingorance-Le Meur and O'Connor, 2009), mientras que su activación en miocardio preisquémico previene la activación de las calpaínas durante la reperfusión (Inserte et al., 2004).

3.4. SUBSTRATOS Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Las calpaínas clásicas presentan una gran variedad de sustratos que son proteolizados en sitios específicos, dando lugar a grandes polipéptidos que pueden perder, mantener o incluso ganar función, con lo que la proteólisis mediada por las calpaínas no tiene como función la eliminación de proteínas, como el proteosoma y los lisosomas, sino la regulación de la función de sus sustratos mediante diversos mecanismos (Goll et al., 2003).

3.4.1. Determinantes de la afinidad por sustrato

La μ -calpaína y la m-calpaína parecen tener los mismos sustratos y la misma afinidad por ellos (Goll et al., 2003). La afinidad de las calpaínas por los puntos de corte parece estar determinada por la estructura de la cadena aminoacídica, siendo preferentes regiones sin estructura secundaria (Goll et al., 2003). Un estudio de los lugares de lisis secuenciados de casi 50 sustratos ha identificado preferencias por ciertos aminoácidos en posiciones cercanas (Leu, Val y Thr en P $_2$, Tyr y Lys y Arg en P $_1$, Pro en P $_2'$ -P $_4'$) al lugar de corte de la cadena peptídica (Tompa et al., 2004). La abundancia de Pro cerca del enlace hidrolizado, al ser poco compatible con la formación de una estructura secundaria, concuerda con las observaciones anteriores sobre la preferencia por regiones desestructuradas. Pero la estructura primaria no es el único determinante del reconocimiento de la diana proteolítica; estudios con librerías de péptidos han mostrado que las

secuencias de aminoácidos consenso, obtenidas a partir del estudio de las secuencias de las proteínas sustrato de las calpaínas, no coinciden con la de los péptidos hidrolizados a una mayor velocidad *in vitro*, a excepción de los residuos en P₂ (Cuerrier et al., 2005). Estos resultados sugieren que las secuencias dianas son subóptimas, lo que permite otros mecanismos para la regulación de la susceptibilidad del sustrato a la proteólisis por calpaínas. De hecho, se han observado cambios en la degradación de sustratos originados por la fosforilación del sustrato (Goll et al., 2003; Wang et al., 2005; Zakharov and Mosevitsky, 2007), por la unión a éste de PIP₃ (Sprague et al., 2008), por polimerización del sustrato (Mishizen-Eberz et al., 2003) y por unión de diversas proteínas con el sustrato (Dong et al., 2004; Aversa et al., 2007; Glantz et al., 2007; Zakharov and Mosevitsky, 2007).

3.4.2. Sustratos y funciones de la actividad

Más de 100 proteínas diferentes han sido identificadas como sustratos *in vitro* de la actividad de las calpaínas clásicas. Entre éstas se incluyen proteínas del citoesqueleto (fodrina, talina, anquirina, troponinas, desmina, distrofina, etc.), cinasas (CaMKII, PKC, MLCK, ZAP-70, etc.), fosfatasa (calcineurina, PTP-1B, etc.), factores de transcripción (c-Jun, c-Fos, p53, etc.), proteasas (caspasas 7, 8, 9, procaspasa 12), proteínas del ciclo celular (ciclina D1, p21^{KIP1}, etc.), y transportadores y receptores de membrana (NCX, receptores NMDA, etc.), entre otras (Goll et al., 2003). La proteólisis de muchas de estas proteínas ha sido detectada *in vivo* asociada a varias funciones fisiológicas o a patologías de tipo diverso.

3.4.2.1. Proteínas del citoesqueleto

La acción de las calpaínas en proteínas del citoesqueleto fue una de las primeras en ser observada. La proteólisis de elementos del citoesqueleto está considerada como la función más característica de las calpaínas; esta proteólisis participa en varias funciones celulares fundamentales (Lebart and Benyamin, 2006).

Uno de los fenómenos en los que las calpaínas clásicas participan es la movilidad celular. Ésta consta de múltiples procesos en los que las calpaínas están implicadas: la extensión celular (aunque no está claro si la activan o la inhiben); la protrusión de la membrana, la cual inhiben; la quimiotaxis, que potencian o reducen en función del tipo

celular; y la regulación de las adhesiones focales, cuyo desensamblaje requiere de la acción de la m-calpaína (Franco and Huttenlocher, 2005).

Otra función de las calpaínas mediada por la hidrólisis de proteínas del citoesqueleto es el desensamblaje de las miofibrillas. Las calpaínas degradan proteínas miofibrilares como la nebulina, la titina, la desmina, la filamina, la tropomiosina y la α -actinina; estas proteínas estabilizan las fibras finas y las gruesas en la miofibrilla, por lo que su proteólisis produciría su separación. De hecho, en las miofibrillas aisladas de músculo esquelético, hay una pequeña pero significativa proporción de miofilamentos de fácil liberación que carecen de α -actinina, desmina, titina y nebulina, y cuyo número aumenta cuando se incrementa el Ca^{2+} y disminuye con inhibidores de las calpaínas (Goll et al., 2008). Otro hecho que demuestra el papel de la μ -calpaína y la m-calpaína en el recambio de proteínas miofibrilares son estudios con sobreexpresión de calpastatina, en los que se reduce la pérdida de masa muscular (Goll et al., 2008). Sin embargo, las calpaínas no generan aminoácidos con su actividad proteolítica, sino grandes polipéptidos, y no hidrolizan actina ni miosina, principales componentes del sarcómero. Por tanto, su función más probable en el recambio miofibrilar es la de liberar filamentos y proteínas cuya degradación sería completada por el proteosoma (Goll et al., 2008). Este modelo es apoyado por un estudio en el que se observa actividad constitutiva de la μ -calpaína en cardiomiocitos, que cuando es sobreexpresada aumenta la ubiquitinización de proteínas y la actividad del proteosoma, y cuando es inhibida con sobreexpresión de calpastatina se reduce la ubiquitinización de determinadas proteínas y se produce la acumulación de agregados proteicos intracelulares, la formación de autofagosomas y la degeneración de los sarcómeros (Galvez et al., 2007).

3.4.2.2. Transducción de señales

Varios de los substratos de las calpaínas son proteínas que forman parte de vías de señalización celular, por lo que su actividad proteolítica modula estas vías y es parte de la respuesta al Ca^{2+} intracelular. Las calpaínas proteolizan PKC y producen la isoforma PKM, que es constitutivamente activa (Sato and Kawashima, 2001). La vía de transducción de señal dependiente de integrinas es otra de las reguladas por calpaínas, al ser substrato de las calpaínas muchas de las proteínas implicadas (talina, filamina, paxilina, vinculina, PTP-1B, ppFAK¹²⁵, pp60^{c-src}, RhoA, etc.). Por este motivo, los efectos que la actividad de las calpaínas tiene en la movilidad celular no se deben únicamente a su papel como responsables del desensamblaje de proteínas del citoesqueleto, sino que también regulan

la señalización asociada a estos procesos (Goll et al., 2003). Por ejemplo, la formación de invadopodios en células tumorales depende de la proteólisis de la fosfatasa PTP-1B catalizada por m-calpaína (Cortesio et al., 2008). La degradación de otros sustratos de las calpaínas, como calcineurina, FAK, src o ZAP-70, puede regular otras vías de señalización celular (Sato and Kawashima, 2001).

3.4.2.3. Ciclo celular

El ciclo celular es otro de los procesos fisiológicos que es regulado por calpaínas, aun cuando no parecen tener un papel fundamental. Se ha observado que las calpaínas degradan proteínas reguladoras del ciclo celular, su inhibición frena el progreso a través de la fase G1 en algunos modelos celulares y su inyección en núcleos de oocitos induce meiosis. Sin embargo, modelos *knock-out* para calpaínas han mostrado que éstas no son necesarias para la mitosis, aunque sí afectan al ritmo de proliferación celular (Goll et al., 2003).

3.4.2.4. Potenciación a largo plazo

En neuronas, la proteólisis por calpaínas de fodrina, de las subunidades NR2 del receptor NMDA o de la proteína PSD-95 en el axón terminal es necesaria para la reestructuración de la densidad postsináptica propia de la potenciación a largo plazo (Goll et al., 2003; Lynch et al., 2007).

3.4.2.5. Apoptosis

La activación de las calpaínas puede inducir apoptosis en determinados tipos celulares, y esta activación sólo ocurre con algunos de los estímulos proapoptóticos (Goll et al., 2003). Se han descrito diversas vías por las que las calpaínas pueden estar implicadas en la apoptosis; pueden inhibir la apoptosis inactivando proteolíticamente la caspasa 9 pero también inducirla activando las procaspasas 7 y 12 e inhibiendo Bcl-xl; pueden proteolizar y activar las proteínas proapoptóticas Bax, Bid y AIF; puede catalizar la proteólisis de Atg5, cuyo producto es proapoptótico; y pueden translocar al núcleo y degradar CaMKIV, lo cual tendría un efecto proapoptótico (Chen et al., 2001; Goll et al., 2003; Raynaud and Marcilhac, 2006; Yousefi et al., 2006; Gafni et al., 2009).

3.4.2.6. Autofagia

Se ha relacionado a las calpaínas con el proceso de autofagia, pero su papel en ella es controvertido. Mientras que un estudio muestra que la subunidad pequeña de las calpaínas clásicas es necesaria para la inducción de autofagia en respuesta a diversos estímulos, y su inhibición favorece la apoptosis (Demarchi et al., 2006), otros trabajos describen en células con sobreexpresión de Atg5, en las que hay más autofagia, que la proteólisis de Atg5 dependiente de calpaínas induce apoptosis (Yousefi et al., 2006), y en una línea celular de fibroblastos la inhibición conjunta de caspasas y calpaínas induce muerte celular mediada por autofagia (Madden et al., 2007). Las dudas sobre el papel de las calpaínas en la regulación de la autofagia se acrecientan por el hecho de que sólo uno de estos trabajos ha estudiado el efecto de la inhibición de las calpaínas en la autofagia sin usar estímulos para inducirla (Demarchi et al., 2006).

3.4.3. Patologías con alteración de la actividad de las calpaínas

Aparte de todas las funciones fisiológicas que se han descrito, las calpaínas han sido implicadas en multitud de patologías. La asociación de las calpaínas con estas enfermedades se puede dividir en dos tipos. Por un lado, están aquellas patologías en las que se han detectado mutaciones, polimorfismos o cambios de expresión de alguna calpaína, como la distrofia muscular de cinturas tipo 2A (LGMD2A), la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome del ovario policístico, el cáncer gástrico y la recurrencia de carcinoma hepatocelular tras transplante. Por otro lado, existen patologías en las que o bien se ha observado una elevación de la actividad de las calpaínas, generalmente asociada a la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} , o bien se ha observado un efecto beneficioso de su inhibición, como las distrofias musculares de Duchenne y Becker, las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, la esclerosis múltiple, las cataratas, el desorden obsesivo-compulsivo, la lisencefalia, la isquemia cerebral y el infarto de miocardio (Gonzalez et al., 2003; Zatz and Starling, 2005; Alvira et al., 2008; Cowan et al., 2008; Bai et al., 2009; Yamada et al., 2009).

4. LAS CALPAÍNAS EN EL MIOCARDIO REPERFUNDIDO

4.1. ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS EN EL MIOCARDIO

Las funciones fisiológicas de las calpaínas en los cardiomiocitos han sido poco estudiadas, existiendo únicamente el estudio en el que se atribuye a la μ -calpaína una función homeostática en el recambio proteico de las miofibrillas (Galvez et al., 2007). No obstante, su implicación en condiciones patológicas del corazón ha sido estudiada en varios ámbitos, como el daño por reperfusión (Yoshida et al., 1995; Urthaler et al., 1997; Chen et al., 2001; Inserte et al., 2004; Singh et al., 2004; Khalil et al., 2005), el remodelado tras infarto (Saitoh et al., 2006), la insuficiencia cardíaca (Yoshida et al., 2003; Takahashi et al., 2005), la hipertrofia por hipertensión (Letavernier et al., 2008), la fibrilación auricular (Goette et al., 2002), la caquexia por cáncer (Costelli et al., 2001), la muerte celular por uremia (Harwood et al., 2003), la muerte celular y la dilatación y disfunción del miocardio por AZT (Purevjav et al., 2007), o la disfunción miocárdica por endotoxemia (Li et al., 2009b).

4.2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL DAÑO POR REPERFUSIÓN

La implicación de las calpaínas en el daño por reperfusión ha sido demostrada en varios estudios y en diversas especies y modelos, tanto *ex vivo* como *in vivo*. El uso de inhibidores de calpaínas ha reducido la muerte celular y mejorado la recuperación funcional en corazones sometidos a isquemia y reperfusión en modelos *ex vivo* de rata (Inserte et al., 2004) y de conejo (Neuhof et al., 2004), así como en un modelo porcino *in vivo* (Khalil et al., 2005). A pesar de ello, el conocimiento tanto de los mecanismos a través de los cuales la activación de las calpaínas resulta perniciosa para el miocardio como de la regulación de su actividad es incompleto. Los estudios con inhibidores de calpaínas se han realizado siempre con administración de la droga de manera previa al inicio del episodio isquémico, por lo que se ignora el momento de activación de las calpaínas. Este punto es esencial ya que determinará el interés clínico de las calpaínas como diana terapéutica destinada a reducir la muerte celular en pacientes con infarto agudo de miocardio. De forma simultánea al trabajo aquí presentado, se ha utilizado un inhibidor de las calpaínas exclusivamente durante la reperfusión sin excluir una posible actividad de las calpaínas durante la isquemia (Neuhof et al., 2008). Dos estudios previos no encontraron actividad de las calpaínas en el miocardio isquémico, pero con periodos de isquemia de

tan sólo 20 minutos de duración, posiblemente insuficientes para producir un aumento significativo del Ca^{2+} citosólico (Yoshida et al., 1995; Sorimachi et al., 1997).

4.2.1. Fragilidad sarcolemal y degradación del citoesqueleto de membrana

Varios trabajos han demostrado que la actividad de las calpaínas provoca la degradación de proteínas estructurales como la fodrina, la desmina y la anquirina (Yoshida et al., 1995; Inserte et al., 2004). La degradación de la fodrina, que forma la base del citoesqueleto de membrana, se ha asociado a un aumento de la fragilidad sarcolemal (Armstrong et al., 2001; Inserte et al., 2004). Esta fragilidad reduce la tolerancia del sarcolema al estrés mecánico del inicio de la reperfusión, resultado de la hipercontracción y el edema, y contribuye a la ruptura del sarcolema. La anquirina, por su parte, sirve de enlace entre proteínas de membrana plasmática y el citoesqueleto basado en fodrina (Rubtsov and Lopina, 2000); entre las proteínas de membrana que estabiliza anclándolas al citoesqueleto está la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (Jordan et al., 1995). Dos estudios han demostrado la importancia de este anclaje: la ausencia de anquirina-B en cardiomiocitos de ratón reduce los niveles en membrana de la subunidad α de la bomba (Mohler et al., 2003), y la isquemia en túbulos renales provoca la pérdida de la polaridad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa al inducir su disociación del citoesqueleto de fodrina (Woroniecki et al., 2003). La degradación de fodrina y anquirina, por tanto, podría tener efectos deletéreos sobre la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y, en consecuencia, aumentar la sobrecarga de Na^+ y la de Ca^{2+} en el inicio de la reperfusión y contribuir así al daño por reperfusión (Figura 6).

4.2.2. Homeostasis del Ca^{2+}

La homeostasis del Ca^{2+} resulta afectada por la degradación mediada por calpaínas de proteínas implicadas en su transporte. Diversos estudios han observado tras isquemia/reperfusión descensos en la cantidad del transportador SERCA, el receptor de rianodina, fosfolamban, los canales de Ca^{2+} tipo L y el NCX, descensos que eran prevenidos con la inhibición de las calpaínas (Singh et al., 2004; French et al., 2006; French et al., 2008). En uno de estos trabajos la inhibición de las calpaínas también preservó los niveles de captación y liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, dañados por la isquemia/reperfusión (Singh et al., 2004), sugiriendo que la degradación de SERCA, receptores de rianodina y fosfolamban que observaban tenía un efecto sobre la función homeostática del Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático. La degradación de estas proteínas puede contribuir

al daño por reperfusión tanto potenciando la sobrecarga de Ca^{2+} como causando disfunción contráctil.

Na^+/K^+ -ATPase

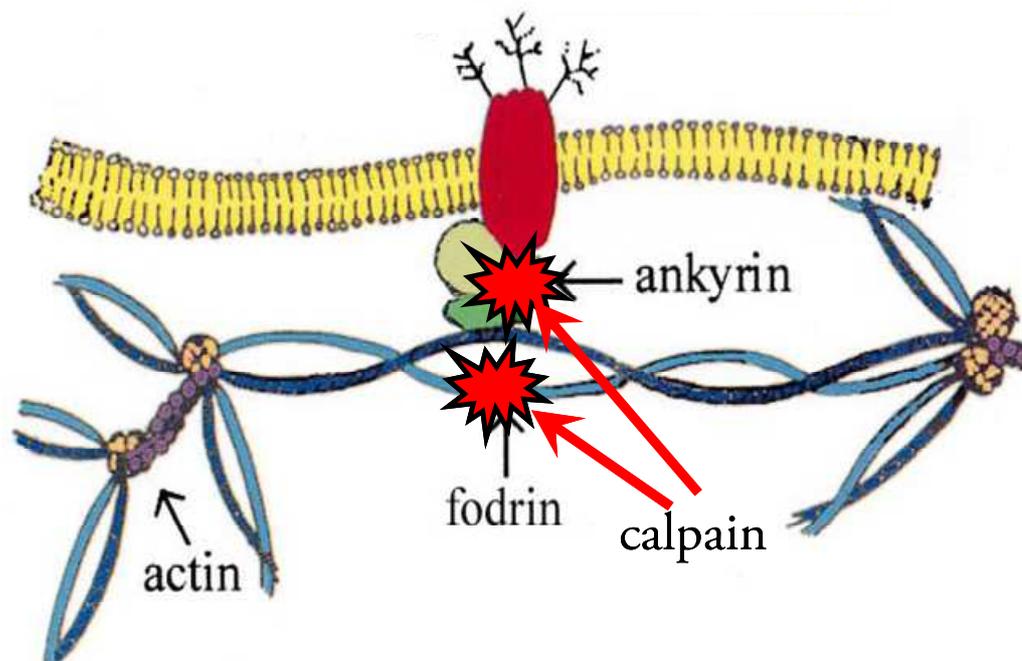


Figura 6. Esquema del citoesqueleto de membrana basado en fodrina y de la asociación de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa a éste a través de la anquirina. En rojo se indican las dianas proteolíticas de las calpaínas, cuya degradación podría afectar a la función de la bomba. Adaptado de Rubtsov and Lopina, 2000.

Se ha descrito que la proteólisis del NCX3 inactiva al intercambiador (Bano et al., 2005). Sin embargo, la inactividad del NCX es probablemente perniciosa para el cardiomiocito durante la reperfusión, dado que el efecto beneficioso de la disminución de la entrada de Ca^{2+} durante los primeros minutos, cuando el intercambiador funciona en modo reverso, es anulado por la disminución posterior de la extrusión de Ca^{2+} a través del intercambiador cuando se recupera la dirección normal del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. De hecho el bloqueo prolongado del NCX aumenta la muerte celular en corazones reperfundidos (Inserte et al., 2002).

4.2.3. Estabilidad lisosomal

Un posible mecanismo a través del cual la actividad de las calpaínas podría contribuir a la muerte celular es la ruptura de los lisosomas y la consiguiente liberación de

enzimas proteolíticas al citosol. Este fenómeno no ha sido estudiado en la isquemia y la reperfusión miocárdicas pero sí en neuronas (Yamashima, 2004).

4.2.4. Apoptosis

Además de su participación en la inducción de necrosis, las calpaínas han sido implicadas en la apoptosis postisquémica con la proteólisis de Bid, proteína citosólica proapoptótica cuyo fragmento resultante de la proteólisis por calpaínas es capaz de translocar a la mitocondria e inducir la liberación de citocromo c y probablemente otros factores inductores de apoptosis (Chen et al., 2001).

4.2.5. Aturdimiento

La degradación de proteínas miofibrilares como las troponinas I y T ha sido señalada como responsable del aturdimiento, la disfunción contráctil reversible que padece el miocardio reperfundido y que no es causada por la muerte celular (Maekawa et al., 2003); sin embargo, hay controversia tanto respecto al papel de las troponinas en el aturdimiento (Thomas et al., 1999; Kim et al., 2001; McDonough et al., 2001) como respecto a que la proteólisis de éstas sea catalizada por las calpaínas (Barta et al., 2005).

5. MECANISMOS ENDÓGENOS DE PROTECCIÓN MIOCÁRDICA

El preconditionamiento y el postcondicionamiento isquémicos son dos potentes estrategias cardioprotectoras frente al daño por reperfusión que se basan en la aplicación de isquemias breves antes o después de la isquemia, respectivamente. Algunos mecanismos moleculares responsables de cardioprotección parecen ser compartidos por ambas maniobras. En el caso del preconditionamiento uno de los mecanismos descritos es la inhibición de las calpaínas y la consiguiente reducción de la fragilidad sarcolemal (Inserte et al., 2004). Sin embargo, se ignora si la inhibición de estas proteasas tiene otros efectos beneficiosos. En cuanto al postcondicionamiento, recientemente descrito, aún no se ha estudiado el efecto de esta maniobra sobre la actividad de las calpaínas. Por estos motivos, en esta tesis se estudia el papel de las calpaínas en estas maniobras cardioprotectoras, cuyas características se detallan a continuación.

5.1. PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El preconditionamiento isquémico es una maniobra cardioprotectora que consiste en la aplicación de varios ciclos cortos de isquemia y reperfusión realizados antes de la isquemia miocárdica. Estos periodos cortos de isquemia, con una duración mínima de 2 minutos, protegen de forma potente al miocardio frente al daño por reperfusión si el inicio de la isquemia prolongada tiene lugar en una de las dos ventanas de protección identificadas: una correspondiente al preconditionamiento clásico y que comprende el periodo de tiempo entre el final de los ciclos de isquemia/reperfusión hasta 3 horas después, y una segunda conocida como preconditionamiento tardío que se extiende desde las 12 hasta las 72 horas tras el final de los ciclos. La protección en esta segunda ventana es inferior a la obtenida en la primera y, aunque comparte los mecanismos iniciadores de la protección, los mecanismos efectores son distintos. Recientemente se ha descrito el preconditionamiento remoto, en el que la protección miocárdica es otorgada por ciclos de isquemia realizados en otro órgano. En este trabajo los estudios sobre el preconditionamiento se realizaron en la primera ventana de protección, por lo que toda la información que sigue es sobre los mecanismos del preconditionamiento isquémico clásico (Yellon and Downey, 2003; Ferdinandy et al., 2007).

La información sobre los mecanismos que median la protección otorgada por el preconditionamiento es numerosa dado el interés terapéutico que tienen, pero aún

incompleta. Estos mecanismos se dividen entre aquellos que inician el proceso de protección durante los ciclos de preconditionamiento, aquellos que lo continúan y conservan hasta el inicio de la reperfusión, y aquellos que en la reperfusión ejercen la protección de forma directa, a pesar de que algunos de ellos aún no estén claramente clasificados (Yellon and Downey, 2003).

5.1.1. Iniciadores del preconditionamiento

El corazón sometido a isquemia breve libera adenosina, bradiquinina, norepinefrina y opioides, moléculas que activarían receptores acoplados a proteína G_i , la cual iniciaría las vías de señalización que median la protección. Otros iniciadores peor caracterizados son los radicales de oxígeno y una elevación transitoria del Ca^{2+} intracelular (Yellon and Downey, 2003).

5.1.2. Mediadores del preconditionamiento

5.1.2.1. Cinasas

Los mecanismos mediadores son vías de transducción de señales que transmiten el proceso de protección hasta aquellos mecanismos que en la reperfusión protegen al miocardio. Entre estos mediadores se encuentra la PKC, cuya inhibición revierte el preconditionamiento si se realiza durante la isquemia. Otras cinasas que han sido propuestas como mediadoras son las MAPK cinasas, que actuarían por debajo de la PKC o en paralelo, Akt y PKA (Yellon and Downey, 2003; Inserte et al., 2004; Murphy and Steenbergen, 2008).

5.1.2.2. Señalización mitocondrial

Muchos autores proponen que los canales mitocondriales de K^+ dependientes de ATP (mitoK_{ATP}) son mediadores del preconditionamiento. La apertura de estos canales sería inhibida por el ATP y su participación en el preconditionamiento es defendida porque su inhibición lo revierte y su apertura con activadores lo reproduce. Se propone que su apertura disminuye la captación de Ca^{2+} o que la hinchazón de la matriz mitocondrial que provoca favorece la fosforilación de creatina. También se ha descrito que estos canales están por encima de cinasas como ERK en la vía de señalización, sobre las que actuaría favoreciendo la producción mitocondrial de radicales de oxígeno, pero por debajo de los receptores acoplados a proteína G_i , PI3K, PKC y PKG (Yellon and Downey, 2003);

Ferdinandy et al., 2007; Murphy and Steenbergen, 2008). No obstante, la estructura molecular de estos canales se desconoce, y algunos autores niegan su existencia (Halestrap et al., 2004).

5.1.2.3. Conexina 43 mitocondrial

La conexina 43 forma hemicanales en la membrana interna mitocondrial; aunque la función de estos hemicanales no está clara, su ausencia reduce la entrada de K^+ en la mitocondria tanto en presencia como en ausencia de ATP y dificulta el acondicionamiento (Rodríguez-Sinovas et al., 2006). Este último hecho sería coherente con la disminución de la capacidad de cardiomiocitos deficientes en conexina 43 (Cx43KI32) para generar radicales de oxígeno en respuesta a estímulos acondicionantes (García-Dorado et al., 2006; Miro-Casas et al., 2009).

5.1.3. Efectores del acondicionamiento

Los mecanismos finales del acondicionamiento isquémico son muy interesantes desde un punto de vista terapéutico dado que tienen lugar durante la reperfusión y podrían ser activados farmacológicamente. No obstante, están poco definidos, debido a la dificultad para identificar a un mecanismo como el último de la cadena y responsable directo de la prevención de la muerte celular. Esta dificultad se agrava por la falta de consenso sobre las causas principales de la muerte celular en la reperfusión, lo que lleva a resultados muy heterogéneos. Ya se ha mencionado a uno de los posibles efectores del acondicionamiento, los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, sobre los que no hay certeza sobre su mecanismo de acción.

5.1.3.1. Atenuación de la hipercontractura

Se ha demostrado que el acondicionamiento atenúa la hipercontractura, reduciendo así el estrés mecánico en la célula. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo, se ha propuesto la mediación de la PKG. La actividad de esta cinasa aumentaría la captación de Ca^{2+} por parte del retículo sarcoplasmático y reduciría las oscilaciones de Ca^{2+} , además de reducir la sensibilidad del miofilamento al Ca^{2+} (García-Dorado et al., 2006).

5.1.3.2. Reducción de la fragilidad sarcolemal

La inhibición de la proteólisis de proteínas estructurales que forman parte del citoesqueleto de membrana es otro de los mecanismos efectores del preconditionamiento. Tal y como se ha dicho, el preconditionamiento inhibe las calpaínas a través de la PKA, lo que aumenta la resistencia de las células al estrés mecánico producido por la hipercontractura y el edema (Inserte et al., 2004; Garcia-Dorado et al., 2006).

5.1.3.3. Inhibición de la apertura del poro de transición mitocondrial

Se acepta ampliamente que la regulación de la apertura del mPTP es uno de los mecanismos efectores de la protección por preconditionamiento. Una vía de señalización propuesta para la inhibición del poro de transición consiste en la activación de la PKG, que activaría la PKC ϵ 1, la cual a su vez promovería la apertura de los canales mitoKATP. La apertura de estos canales generaría H₂O₂, lo que activaría tanto la PKC ϵ 1 como la PKC ϵ 2; esta última sería la responsable, de manera directa o a través de la fosforilación por GSK3 β , de la inhibición de la apertura del mPTP (Garcia-Dorado et al., 2006; Ferdinandy et al., 2007).

5.2. POSTCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El fenómeno del postcondicionamiento isquémico fue descrito por Zhao et al. en el 2003 al demostrar en un modelo canino con oclusión transitoria de la coronaria descendente anterior que la aplicación de ciclos cortos y repetidos de isquemia/reperfusion realizados justo en el inicio de la reperfusión reducía el tamaño del infarto a niveles similares a los obtenidos con el preconditionamiento isquémico. A diferencia del preconditionamiento, los ciclos de isquemia/reperfusion son más cortos, variando su duración entre los 5 segundos, en el caso del corazón aislado de ratón, a 1 minuto cuando se trata de humanos. Estos ciclos de isquemia han de iniciarse de manera inmediata tras la reperfusión para ser efectivos (Zhao et al., 2003; Ferdinandy et al., 2007; Skyschally et al., 2008).

La efectividad del postcondicionamiento isquémico para proteger frente al daño por reperfusión está claramente demostrada, pero todavía no se conocen con exactitud cuáles son los mecanismos que protegen al cardiomiocito.

5.2.1. Mecanismos de la cardioprotección

Se ha propuesto que el postcondicionamiento isquémico compartiría las mismas vías de cardioprotección que el preconditionamiento. Estas incluirían receptores de membrana acoplados a proteína G y activados por moléculas liberadas al medio extracelular en el inicio de la reperfusión, como los receptores A_{2A} y A_{2B} de adenosina, el receptor de bradiquinina B2, los receptores de opioides δ y μ y la guanilato ciclasa particulada (Ferdinandy et al., 2007; Hausenloy, 2009).

Otra vía de señalización que ha sido implicada en el postcondicionamiento es la NO/GMPc; el uso de inhibidores de la NO sintasa y de la guanilato ciclasa soluble (uno de los enzimas responsables de la síntesis del GMPc) previene la protección otorgada por el postcondicionamiento. Esta vía actuaría a través de la PKG, la cual activaría la PKC; esta cinasa sensibilizaría el receptor A_{2B} de adenosina y/o inhibiría la apertura del mPTP (Ferdinandy et al., 2007; Hausenloy, 2009).

La inhibición de la apertura de los canales mitoKATP también revierte la protección por postcondicionamiento; el efecto que su apertura tiene en el cardiomiocito reperfundido y las causas de esa apertura, sin embargo, no están definidos (Ferdinandy et al., 2007; Hausenloy, 2009).

Uno de los modelos propuestos para explicar la protección por postcondicionamiento isquémico es la activación de las cinasas RISK. Bajo esta denominación se incluyen aquellas cinasas cuya activación es considerada como favorecedora de la supervivencia de la célula. Entre ellas destacan las MAPKs ERK1/2 y la vía PI3K/Akt. Estas vías conducirían a la activación de la NO sintasa, la inhibición del mPTP, la prevención de la apoptosis y la inhibición de GSK3 β (Ferdinandy et al., 2007; Hausenloy, 2009). Sin embargo puede que la vía RISK no sea esencial en el postcondicionamiento. Estudios recientes no han encontrado diferencias en la fosforilación de estas cinasas en el miocardio porcino postcondicionado respecto al control (Skyschally et al., 2009).

También se ha descrito la implicación de radicales de oxígeno, del sulfuro de hidrógeno, de la cinasa de esfingosina (SPK) y de la vía JAK-STAT en la señalización de la protección por postcondicionamiento (Hausenloy, 2009).

5.2.2. El papel del pH intracelular

De ninguno de los mecanismos presentados se sabe con certeza por qué se activan con los ciclos de isquemia/reperfusión. Tan sólo se ha propuesto que los ciclos de postcondicionamiento podrían retrasar el lavado extracelular de adenosina previamente gene-

rada y liberada, con lo que aumentaría la activación de los receptores de adenosina. Tampoco explican el motivo por el que protocolos de postcondicionamiento que funcionan en un modelo no lo hacen en otro. Para explicar esto se formuló la hipótesis según la cual los ciclos de isquemia/reperfusión protegen el miocardio porque retrasan la normalización del pH intracelular (García-Dorado and Piper, 2006). La necesidad de que los ciclos empiecen justo en el inicio de la reperfusión y duren un mínimo de tiempo (unos 2 minutos), así como que a mayor flujo coronario se requieran ciclos de perfusión más cortos (Iliodromitis et al., 2009), se explicaría por la necesidad de que el recambio del medio extracelular y el lavado de metabolitos se retrasen lo suficiente como para que un retraso en la recuperación del pH intracelular ejerza sus efectos beneficiosos. Entre los efectos producidos por una prolongación de la acidosis se encontrarían la inhibición de la hipercontractura (Orchard and Kentish, 1990; Schafer et al., 2000), la inhibición de la apertura del poro de transición mitocondrial (Halestrap et al., 2004; Ruiz-Meana et al., 2004) y la inhibición de las calpaínas (Kendall et al., 1993; Zhao et al., 1998), entre otros.

Esta hipótesis ha sido investigada en dos estudios previos. En corazones de perro *in vivo*, el pH de la sangre venosa coronaria permaneció ácido más tiempo en los corazones postcondicionados que en los control; la administración de bicarbonato sódico durante el inicio de la reperfusión revirtió el postcondicionamiento isquémico y la fosforilación de Akt y ERKs (Fujita et al., 2007). En otro estudio, la perfusión con tampón a pH 7.7 durante el protocolo de postcondicionamiento previno la protección (Cohen et al., 2007). A pesar de estos resultados, no se había comprobado realmente que el postcondicionamiento isquémico retrase la normalización del pH intracelular ni, por tanto, que aquellos protocolos que no funcionan sean incapaces de retrasarla suficientemente, por lo que datos más concluyentes son necesarios para poder afirmar que la acidosis intracelular tiene un papel fundamental en la protección por postcondicionamiento isquémico.

5.2.3. Utilidad terapéutica en el infarto de miocardio

Las características del postcondicionamiento isquémico lo convierten en una maniobra terapéutica factible en pacientes de infarto de miocardio tratados con angioplastia primaria, en los que el balón que se infla para desobstruir el trombo se puede hinchar y deshinchar repetidamente para realizar el protocolo de postcondicionamiento. De hecho, ya se han realizado ensayos clínicos con esta estrategia tanto en infarto de miocardio (Staat et al., 2005; Thibault et al., 2008) como en cirugía (Luo et al., 2008; Li

et al., 2009a), y los resultados han sido positivos en todos ellos. Sin embargo, el postcondicionamiento isquémico tiene limitaciones como terapia. Por un lado, no se puede realizar en pacientes tratados con trombolisis. Además, la variabilidad en la efectividad de los protocolos entre modelos experimentales y grupos de investigación hace albergar dudas sobre la óptima eficiencia del protocolo seleccionado en todos los pacientes; no sólo eso, sino que algunos estudios han observado la pérdida de la protección en animales hiperlipidémicos (Iliodromitis et al., 2006; Kupai et al., 2009), hipertensos (Penna et al., 2009), diabéticos (Granfeldt et al., 2009) y ancianos (Boengler et al., 2008). Por estos motivos, desarrollar terapias farmacológicas que imiten el postcondicionamiento isquémico ampliaría el rango de pacientes tratables y optimizaría la eficacia y seguridad del tratamiento.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El estudio presentado parte de resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en los que se confirmó en un modelo de corazón de rata aislado y perfundido en un sistema Langendorff que la actividad proteolítica de las calpaínas se encuentra elevada tras un episodio de isquemia transitoria y que esta actividad contribuye a la muerte celular que tiene lugar durante la reperfusión miocárdica a través de la degradación de proteínas estructurales (Inserte et al., 2004). Dada la relevancia de las calpaínas en el daño por reperfusión, con esta tesis se ha pretendido evaluar su potencial como diana terapéutica. Para ello se ha caracterizado la regulación de su activación durante la isquemia y la reperfusión, profundizando en los mecanismos por los que contribuye al daño por reperfusión y su participación en la cardioprotección generada por el preconditionamiento y el postcondicionamiento isquémicos.

La hipótesis planteada fue que, durante la isquemia miocárdica transitoria, la activación de las calpaínas tiene lugar exclusivamente durante la reperfusión miocárdica, lo que las convertiría en una novedosa diana terapéutica en pacientes que sufren un infarto agudo de miocardio, y contribuye al daño por reperfusión mediante la degradación de proteínas estructurales que estabilizan la Na^+/K^+ -ATPasa en membrana, dando lugar a una pérdida de su actividad en el inicio de la reperfusión y una mayor entrada de Ca^{2+} a través del NCX, mientras que su inhibición media el efecto protector del preconditionamiento y el postcondicionamiento isquémicos.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido someter a prueba la hipótesis de trabajo en un modelo *ex vivo* de corazón aislado de rata. Los objetivos secundarios fueron:

- 1.1) Analizar la cinética de la activación de las calpaínas en corazones aislados de rata sometidos a diferentes tiempos de isquemia seguidos o no de reperfusión.
- 1.2) Evaluar en corazón aislado de rata el papel del Ca^{2+} y del pH en la activación de las calpaínas.
- 1.3) Estudiar la translocación a membrana de las calpaínas clásicas y su relación con la actividad en el miocardio reperfundido.
- 2.1) Analizar la disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa y el daño miocárdico derivado de ésta en corazones sometidos a isquemia y reperfusión.
- 2.2) Estudiar la contribución de las calpaínas a la disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa en el inicio de la reperfusión.
- 2.3) Determinar el mecanismo responsable de la disfunción de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa causada por la actividad de las calpaínas.
- 3.1) Analizar la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en corazones aislados de rata sometidos a un protocolo de preconditionamiento isquémico.
- 3.2) Determinar el papel de la inhibición de las calpaínas en los cambios que el preconditionamiento provoca en la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa en el inicio de la reperfusión.
- 3.3) Estudiar la relación entre el retraso en la normalización del pH intracelular en el inicio de la reperfusión y la cardioprotección otorgada por el postcondicionamiento isquémico.
- 3.4) Determinar el efecto del postcondicionamiento sobre la actividad de las calpaínas en el inicio de la reperfusión.
- 3.5) Analizar la efectividad de la inhibición de las calpaínas durante la reperfusión como maniobra cardioprotectora en un modelo *in vivo* de isquemia/reperfusión.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. ANIMALES

Las ratas machos de la cepa Sprague-Dawley se obtuvieron de Harlan Ibérica (España) y fueron mantenidas en el estabulario del Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron alimentadas *ad libitum* con pienso estándar y sometidas a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno con temperatura (20-24°C) y humedad (40-70%) controladas.

2. REACTIVOS Y FÁRMACOS

El tampón Laemmli 2x, el tampón TGS 10x y la acrilamida/bisacrilamida 37.5:1 se obtuvieron de BioRad (Estados Unidos).

El *Superblock Blocking Buffer* y el substrato de luminiscencia *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* se obtuvieron de Pierce (Estados Unidos).

El KB-R7943 se obtuvo de Tocris Ltd (Reino Unido).

El MDL-28170, la m-calpaína recombinante y el CPT-cAMP se obtuvieron de Calbiochem (Estados Unidos).

Los reactivos para tampones, el etanol, el polietilenglicol-400, la ouabaína, la 2,3-butanediona monoxima (BDM), el cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), el H89, el NADH, el piruvato sódico, el DAPI, el suero de cabra, el molibdato de amonio, el reactivo de Fiske-Subbarow, el $C_4H_4KO_7 \cdot 0.5H_2O$, el Igepal, el ácido deoxicólico, el Tritón X-100, el Tween 20, el dodecil sulfato de sodio (SDS), el rojo de Ponceau, el TEMED y el cóctel de inhibidores de proteasas se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemie (Alemania).

MÉTODOS

1. MODELOS EXPERIMENTALES

1.1. Perfusión de corazón aislado de rata

Los procedimientos experimentales se ajustaron a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicada por el *National Institute of Health* de Estados Unidos (*NIH Publication No. 85-23, revised 1996*), y fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación del Hospital Vall d'Hebron.

Se utilizó el modelo Langendorff de corazón de rata aislado y perfundido, que permite un estudio fisiológico del corazón a la vez que reduce la variabilidad de un modelo *in vivo* al obviar variables como los efectos de la inervación y de la sangre (hormonas, células, coagulación, etc.). En este modelo el corazón es extraído tras toracotomía y es canulado por la aorta. A través de la cánula se proporciona un flujo de tampón oxigenado que perfunde retrógradamente el corazón al ser detenido el flujo por la válvula aórtica y desviado a los *ostia* coronarios, por los que el tampón accede a las coronarias y perfunde todo el miocardio.

1.1.1. Preparación del modelo

Las ratas, Sprague-Dawley machos de 300 a 350 gramos, fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (150 mg/kg). Los corazones fueron rápidamente perfundidos en un sistema Langendorff no recirculante con un flujo constante de 10 ml/min usando un tampón de bicarbonato Krebs-Henseleit modificado (KHB, en mM: NaCl 140, NaHCO₃ 24, KCl 2.7, KH₂PO₄ 0.4, MgSO₄ 1, CaCl₂ 1.8, glucosa 11), equilibrado con 95%O₂-5%CO₂ y atemperado a 37°C.

1.1.2. Parámetros funcionales

Se monitorizó la presión del ventrículo izquierdo (LVP) mediante el uso de un balón de látex lleno de agua colocado en el ventrículo izquierdo e inflado hasta obtener una presión diastólica (LVEDP) entre 5 y 8 mm Hg; dos transductores de presión 43600F (Baxter, Holanda) transfirieron los valores de la presión del balón y de la presión de perfusión a un registro informático (*Chart 5.2* de ADInstruments, Australia) a través de un amplificador y digitalizador de señal *Powerlab* (ADInstruments).

1.1.3. Protocolos básicos

Los protocolos de isquemia/reperfusión fueron realizados con isquemia global provocada mediante la interrupción completa del flujo tras un equilibrado de 30 minutos de perfusión durante los cuales el corazón se adapta al medio de perfusión cristalóide. Durante la isquemia los corazones se bañaron en suero fisiológico a 37°C para mantener la temperatura en ausencia de flujo, y mostraron el característico aumento de la presión diastólica conocido como rigor isquémico y asociado a la depleción de ATP (Figura 7B). La restauración del flujo inició la reperfusión, indujo la hipercontractura (Figura 7C), que es medida como el incremento máximo de la LVEDP durante la reperfusión y aparece con un retraso respecto a la restauración del flujo denominado tiempo de hipercontractura (Figura 7D), y propició un grado variable de recuperación funcional que se manifestó en la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVdevP), calculada como la diferencia entre el pico sistólico de la presión del ventrículo izquierdo y la LVEDP (Figuras 7A y 7E).

Los experimentos de isquemia/reperfusión en los que los corazones fueron estudiados por resonancia magnética nuclear se realizaron con un sistema Langendorff adaptado para que el corazón fuera perfundido y analizado simultáneamente con un espectrómetro Bruker Avance 400 (Rheinstetten, Alemania). Paralelamente al análisis espectroscópico se monitorizaron la LVP y la presión de perfusión.

Los protocolos en los que se indujo la activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se realizaron mediante perfusión con un tampón sin Na^+ y con Ca^{2+} elevado. Tras 30 minutos de perfusión con tampón HEPES (pH 7.4, en mM: NaCl 138, HEPES 6, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.8, MgSO_4 1.2, KH_2PO_4 1.2, KCl 4.7, glucosa 11) éste fue substituido por tampón sin Na^+ (manitol 269 mOsm, HEPES 6 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, MgSO_4 1.2 mM, KCl 4.7 mM, glucosa 11 mM), capaz de activar el modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Inserte et al., 2002).

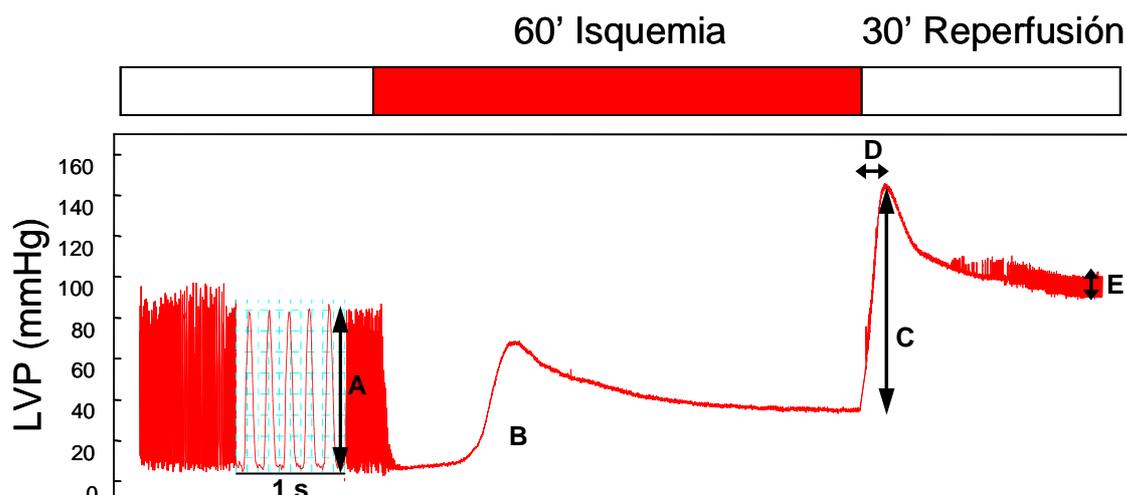


Figura 7. Registro representativo de la presión del ventrículo izquierdo (LVP) de un corazón sometido a 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión. Tras un periodo de estabilización del corazón, en el cual la contracción es estable (A), la isquemia inhibe rápidamente la contracción. Tras 12-15 minutos de isquemia aparece el rigor isquémico (B) causado por la depleción de ATP. La reperfusión conlleva un brusco incremento de la presión de la LVEDP conocido como hipercontractura (C). Los parámetros estudiados en los registros de presión ventricular izquierda son la LVdevP preisquémica (A), el grado de hipercontractura (C), el tiempo de hipercontractura (D) y la LVdevP al final de la reperfusión (E).

1.2. Isquemia/reperfusión *in vivo*

1.2.1. Preparación del modelo

Los procedimientos experimentales se ajustaron a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicada por el *National Institute of Health* de Estados Unidos (*NIH Publication No. 85-23, revised 1996*), y fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación del Hospital Vall d'Hebron.

Las ratas, Sprague-Dawley machos de 250 a 400 gramos, fueron premedicadas con una inyección intraperitoneal de atropina a 0.05 mg/kg (Braun, Alemania) y anestesiadas con una inyección intraperitoneal de ketamina a 75 mg/kg (Pfizer, Estados Unidos) y xilacina a 10 mg/kg (Calier, España). Posteriormente las ratas fueron intubadas oralmente con un catéter intravenoso 16G y ventiladas mecánicamente (75 respiraciones/minuto, volumen tidal de 8-10 ml/kg, 100% O₂) con un ventilador *Inspira ASV* (Harvard Apparatus, Estados Unidos). Se monitorizó la presión inspiratoria de forma continua, manteniéndose al animal con presión positiva al final de la espiración (PEEP). La anestesia fue mantenida con isoflurano al 1-2% (Abbott, Estados Unidos). Antes de proceder a la cirugía se administró analgesia subcutáneamente (brupenorfina a 0.035 mg/kg, Schering-Plough, Estados

Unidos). La temperatura corporal fue monitorizada y mantenida en 37°C durante todo el protocolo con una sonda rectal conectada a un termómetro digital y una manta térmica.

1.2.2. Parámetros hemodinámicos

Un catéter fue introducido en la arteria carótida derecha para monitorizar la presión arterial sistémica con un amplificador *DA100C* (Biopac Systems, Estados Unidos) y se aplicaron electrodos subcutáneos para monitorizar el electrocardiograma con un amplificador *ECG100C* (Biopac Systems). La señal amplificada fue integrada en el sistema de adquisición MP100 (Biopac Systems) y registrada con el programa *AcqKnowledge 3.9* (Biopac Systems). Los parámetros funcionales medidos en distintos momentos del protocolo fueron la frecuencia cardíaca (FC) y las presiones arteriales media (PAM), sistólica (PS) y diastólica (PD).

1.2.3. Protocolo básico

Se introdujo un catéter PE-50 lleno de suero en la vena yugular derecha como vía de infusión. El corazón fue expuesto a través del cuarto espacio intercostal, ensanchado y mantenido abierto con un microrretractor ajustable (Medicon eG, Alemania). Se ligó la coronaria descendente anterior izquierda a 1 mm del apéndice de la aurícula izquierda con un hilo de sutura 6/0 Silkam (Braun) pasado por debajo de la coronaria. La presión necesaria para la oclusión fue ejercida por el estiramiento del hilo, mantenido con un tubo de silicona fijado sobre la ligadura, y con un *pledget* entre tubo y miocardio para evitar lesiones. La oclusión de la coronaria fue confirmada por palidez visual de la zona isquémica así como por alteraciones del QRS (elevación del segmento ST) en los primeros segundos de la oclusión. La reperfusión se inició con la liberación de la presión sobre la coronaria, manteniendo el hilo de sutura en la misma posición para la posterior reclusión y determinación del área en riesgo.

2. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

2.1. Estudio de la activación y translocación de las calpaínas, y de la expresión de la calpastatina, en la isquemia y la reperfusión

Tras 30 minutos de perfusión normóxica, los corazones fueron sujetos a isquemia de distinta duración (5, 15, 30, 60 o 90) y cada uno de estos grupos fue distribuido a su vez en dos subgrupos, uno de ellos reperfundido durante 30 minutos y el otro sin reperfusión (n=4 cada uno). Se realizaron tres grupos adicionales; en uno de ellos los corazones fueron sometidos a 30 minutos de perfusión normóxica sin isquemia, en otro fueron sometidos a 60 minutos de isquemia tras 10 minutos de perfusión con el inhibidor de calpaínas MDL-28170 a 10 μ M, mientras que en el último los corazones fueron sometidos a 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión con administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros minutos de la reperfusión (n=4 cada uno). Al final del protocolo, los corazones se congelaron en nitrógeno líquido para posterior análisis bioquímico (Figura 8A).

Para análisis por inmunofluorescencia, 3 corazones por grupo fueron sometidos a 60 minutos de isquemia, a 60 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión en presencia de BDM 20 mM, un inhibidor de la contracción que previene notablemente la hipercontractura y la muerte celular (Garcia-Dorado et al., 1992a), o a perfusión normóxica con administración de BDM 20 mM durante los últimos 5 minutos. Al final del protocolo, secciones transversales de los corazones fueron congeladas en isopentano (Figura 8B).

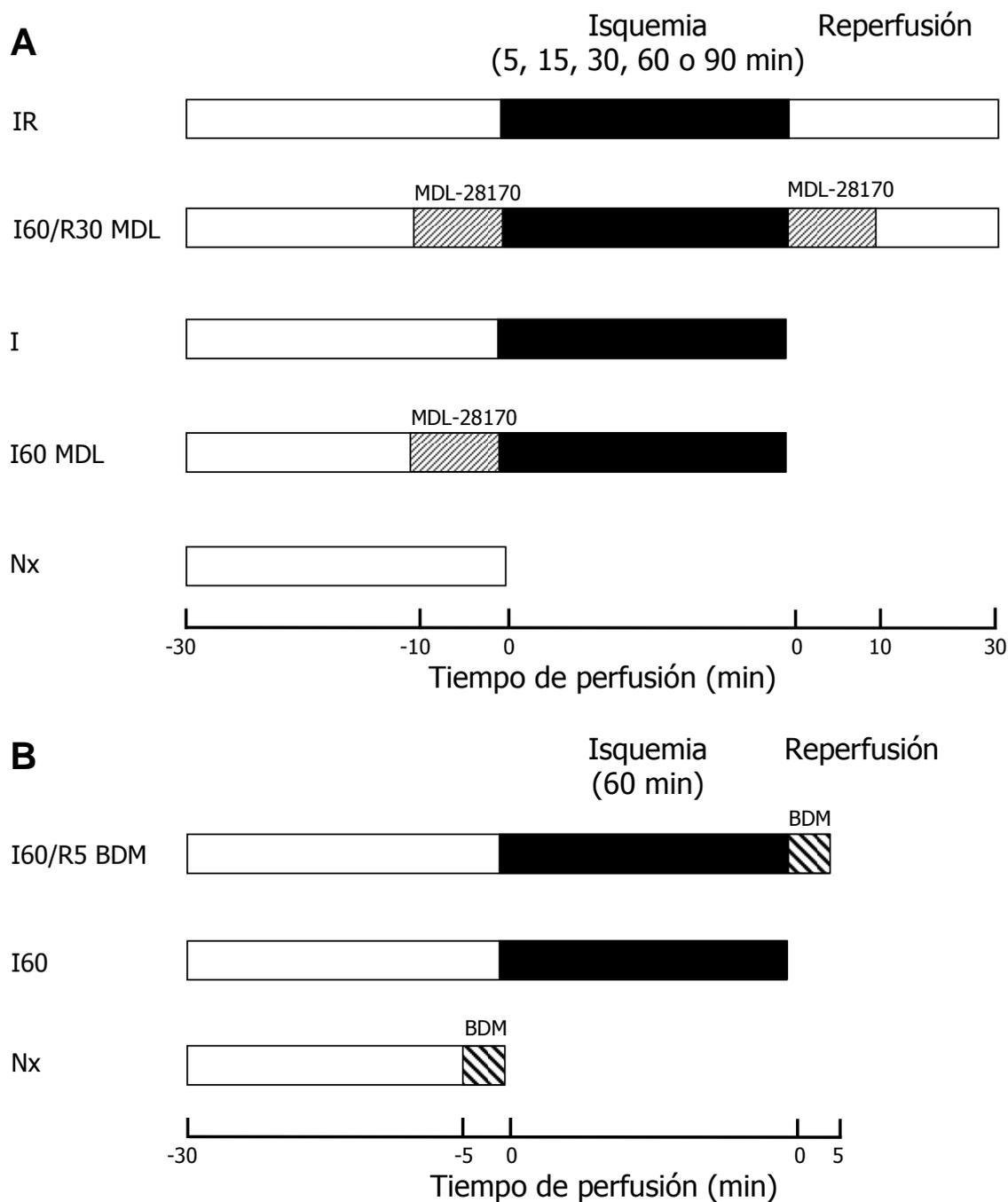


Figura 8. Protocolos de perfusión del estudio de la activación y translocación de las calpaínas y de la expresión de calpastatina en la isquemia y la reperusión miocárdicas. A) Grupos experimentales destinados al análisis por Western blot. B) Grupos experimentales para el estudio por inmunofluorescencia. Los cuadros en negro corresponden a isquemia, la perfusión con MDL-28170 fue a 10 μ M y con BDM fue a 20 mM.

2.2. Papel del NCX en la activación y translocación de las calpaínas

Para la realización del análisis bioquímico, corazones aislados de rata fueron sometidos a 30 minutos de perfusión normóxica y distribuidos en los grupos: Nx (sin isquemia), I (60 minutos de isquemia), IR (60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión), I+KB (60 minutos de isquemia con administración de KB-R7943 10 μ M durante los 10 minutos previos a la isquemia) e IR+KB (60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión con administración de KB-R7943 10 μ M durante los 10 minutos previos a la isquemia) (n=3 por grupo). Aquellos corazones reperfundidos fueron perfundidos con BDM 20 mM durante los 10 minutos iniciales de la reperfusión. Los corazones fueron congelados en nitrógeno líquido al finalizar el protocolo (Figura 9A).

Con el fin de evaluar la muerte celular, se sometieron corazones a 60 minutos de isquemia y 60 de reperfusión, sin tratamiento adicional o con uno de los siguientes: MDL-28170 10 μ M durante los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 iniciales de la reperfusión, o KB-R7943 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia. El efluente coronario fue recogido durante la reperfusión para cuantificar la lactato deshidrogenasa (Figura 9B).

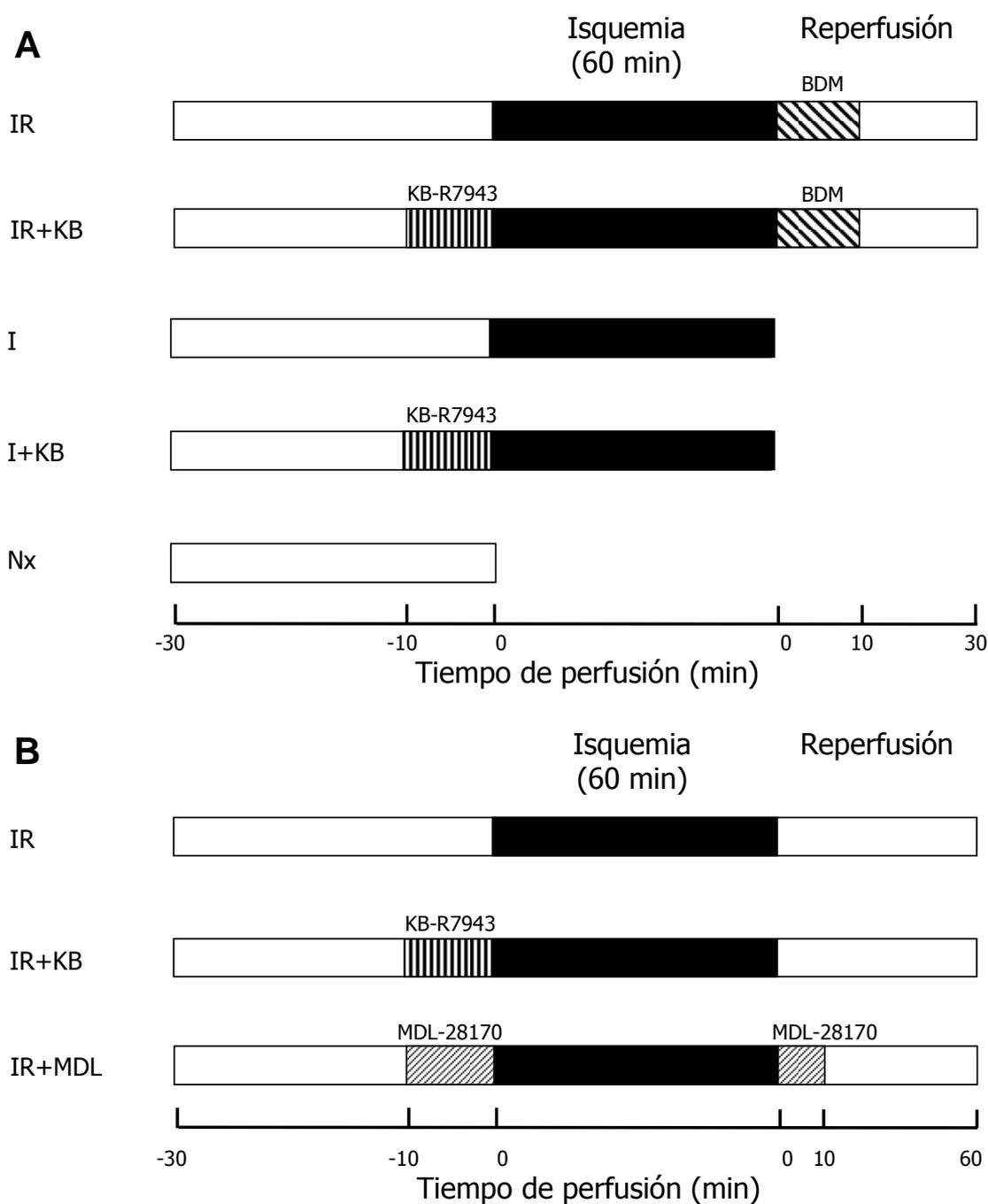


Figura 9. Protocolos de perfusión del estudio del papel del NCX en la activación y translocación de las calpaínas en la isquemia y la reperfusión miocárdicas. A) Grupos experimentales destinados al análisis por Western blot. B) Grupos experimentales para la cuantificación de la lactato deshidrogenasa. Los cuadros en negro corresponden a isquemia, la perfusión con MDL-28170 fue a 10 μ M, con BDM a 20 mM y con KB-R7943 a 10 μ M.

2.3. Estudio del efecto del pH intracelular sobre la actividad de las calpaínas

La modulación por pH de la actividad y la translocación de las calpaínas fue estudiada en corazón de rata con el modelo de activación del modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los corazones fueron distribuidos en los siguientes grupos: pH 7.4 (30 minutos de perfusión con tampón HEPES a pH 7.4), pH 6.4 (30 minutos de perfusión con tampón HEPES a pH 7.4 seguidos de 15 minutos con tampón HEPES a pH 6.4), $-\text{Na}^+$ pH 7.4 (30 minutos de perfusión con tampón HEPES a pH 7.4 seguidos de 15 minutos con tampón sin Na^+ a pH 7.4), $-\text{Na}^+$ pH 6.4 (30 minutos de perfusión con tampón HEPES a pH 7.4 seguidos de 15 minutos con tampón sin Na^+ a pH 6.4) y MDL pH 7.4 (30 minutos de perfusión con tampón HEPES a pH 7.4, seguidos de 15 minutos con tampón sin Na^+ a pH 7.4 y con MDL-28170 10 μM) (n=3 cada grupo). Los corazones fueron congelados en nitrógeno líquido al finalizar el protocolo (Figura 10).

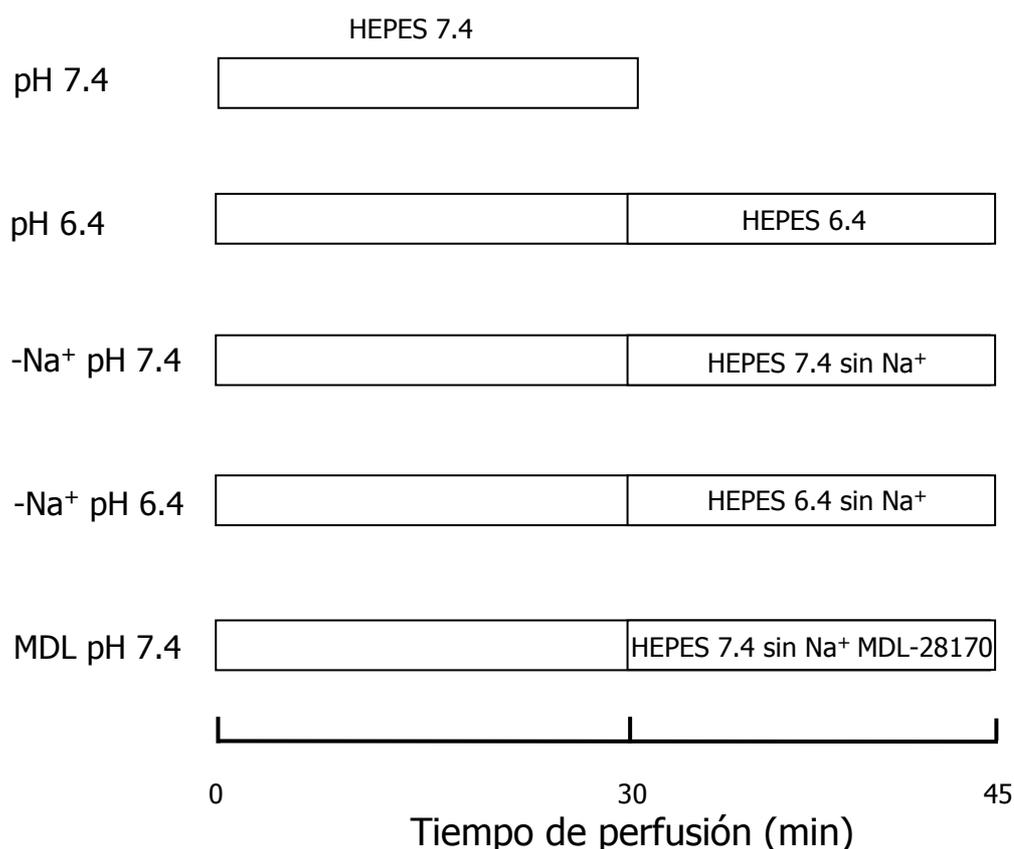


Figura 10. Protocolos de perfusión del estudio del efecto de la acidosis intracelular en la activación y translocación de las calpaínas. La perfusión con MDL-28170 fue a 10 μM .

2.4. Estudio del efecto de la metil- β -ciclodextrina sobre la activación y la translocación de las calpaínas

Corazones aislados de rata fueron sujetos a 30 minutos de isquemia con o sin administración del quelante de colesterol metil- β -ciclodextrina a 0.2 mM los 5 minutos previos a la isquemia, o sometidos a 30 minutos de isquemia y 30 de reperfusión, sin tratamiento adicional o con metil- β -ciclodextrina a 0.2 mM o 10 mM durante los 5 minutos previos a la isquemia (n=3 cada grupo). Previamente estas concentraciones habían sido probadas en condiciones normóxicas para evaluar su posible toxicidad; la concentración de metil- β -ciclodextrina 10 mM se probó porque es la comunmente utilizada en estudios realizados en células (Balijepalli et al., 2006; Nuzzi et al., 2007; Garg et al., 2009), mientras que en el único estudio en corazones aislados de rata que había usado metil- β -ciclodextrina la concentración fue de 0.2 mM (Das et al., 2008).

2.5. Estudio de la isoforma de calpastatina expresada en el miocardio de rata

Para el análisis de la calpastatina expresada en corazón de rata se usaron muestras procedentes de corazones de rata sometidos a perfusión normóxica o 30 minutos de isquemia, así como miocardio procedente de la región no isquémica de un corazón de cerdo sometido a 48 minutos de isquemia regional y 120 minutos de reperfusión (Rodríguez-Sinovas et al., 2009).

2.6. Estudio del efecto de la ouabaína en la muerte celular por reperfusión

El efecto de la inhibición de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa en el daño por reperfusión fue estudiado en corazones sometidos a 30 o 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión distribuidos en 4 subgrupos: sin tratamiento, con ouabaína 150 μM los 10 minutos iniciales de la reperfusión, con KB-R7943 10 μM los 10 minutos iniciales de la reperfusión o con ambos tratamientos (n=6 por grupo) (Figura 11).

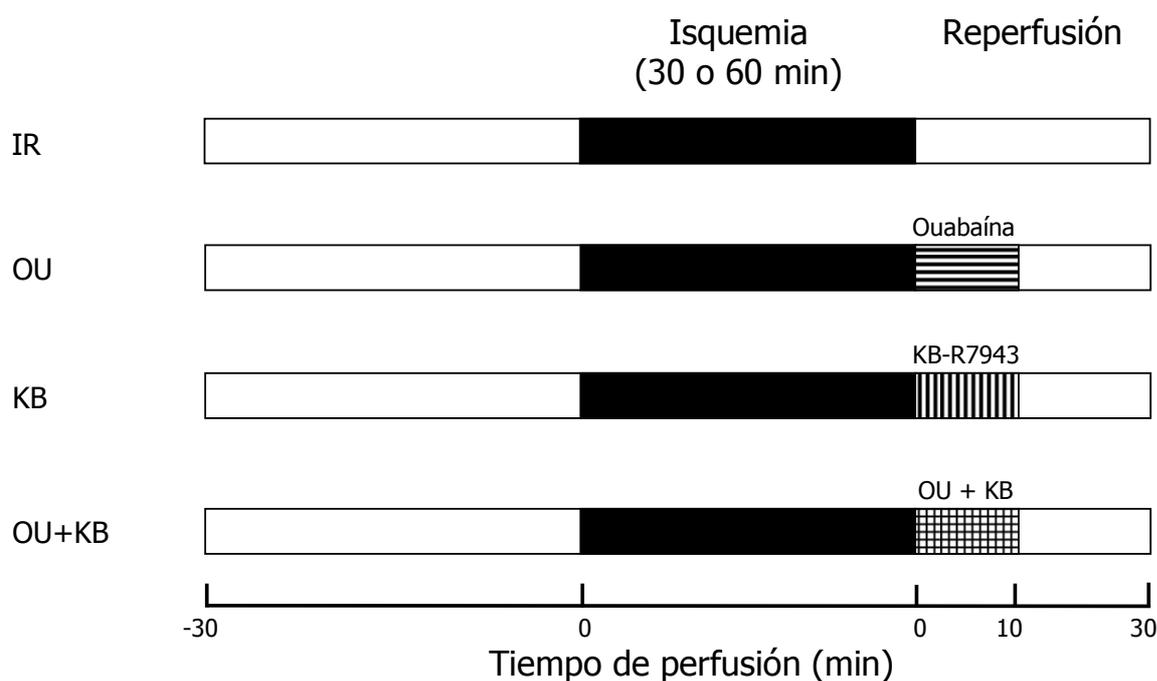


Figura 11. Protocolos de perfusión del estudio del efecto de la inhibición de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa en el daño por reperfusión. Los cuadros en negro corresponden a isquemia, la perfusión con ouabaína fue a $150 \mu\text{M}$ y con KB-R7943 fue a $10 \mu\text{M}$.

2.7. Estudio del papel de la Na^+/K^+ -ATPasa y las calpaínas en el daño por reperfusión. Análisis bioquímico

Con el fin de estudiar el papel de la activación de las calpaínas en la función de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa durante la reperfusión, corazones aislados de rata fueron sometidos a 30 minutos de perfusión normóxica (Nx) o a 60 minutos de isquemia y 5 de reperfusión distribuidos en los grupos: IR (sin tratamiento), MDL (perfusión con MDL-28170 $10 \mu\text{M}$ los 10 minutos anteriores a la isquemia y durante la reperfusión), BDM (perfusión con BDM 20 mM durante la reperfusión) y MDL+BDM (perfusión con MDL-28170 $10 \mu\text{M}$ los 10 minutos anteriores a la isquemia y durante la reperfusión, y perfusión con BDM 20 mM durante la reperfusión) ($n=4$ por grupo). Los corazones fueron congelados en nitrógeno líquido al finalizar el protocolo (Figura 12).

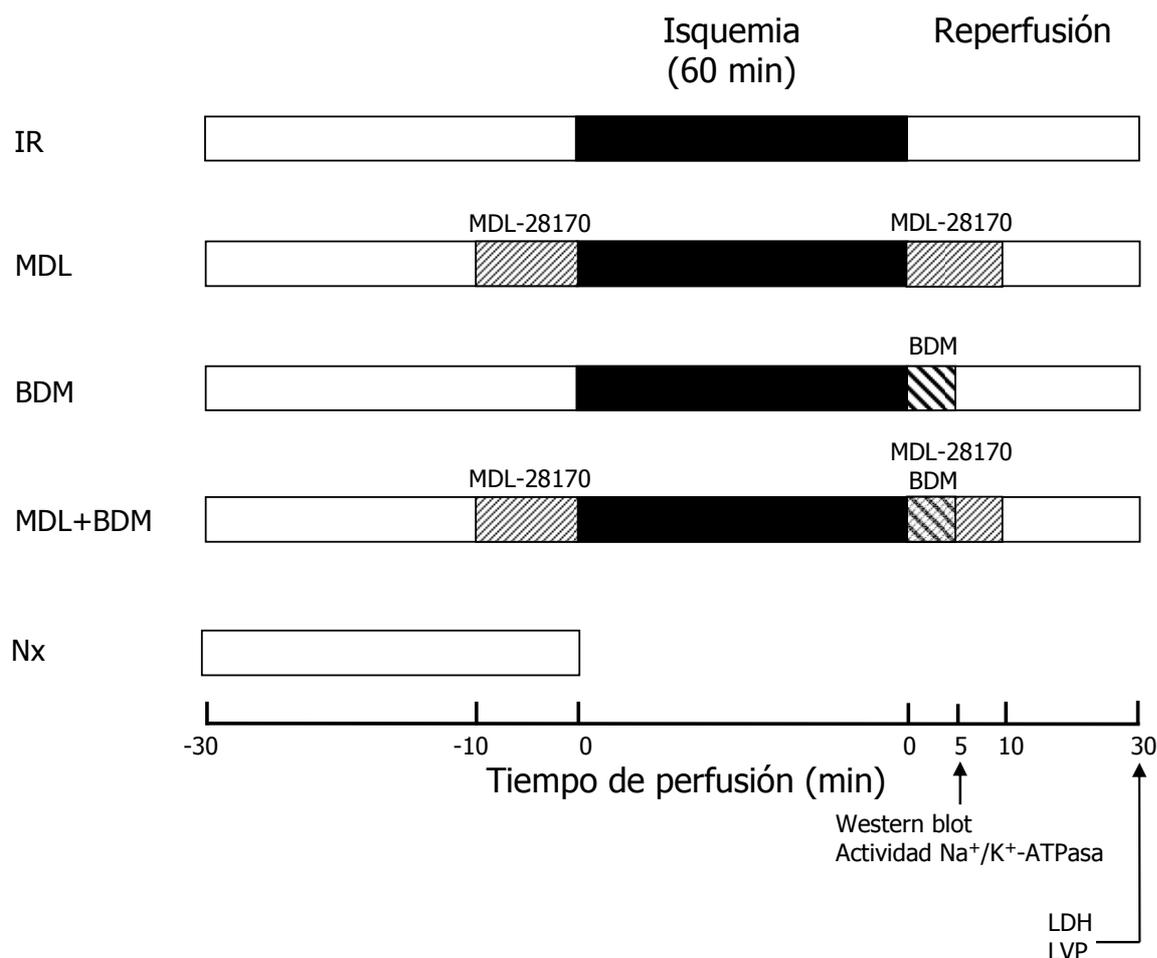


Figura 12. Protocolos de perfusión del estudio del papel de las calpaínas en la disfunción de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa. La reperfusion fue de 5 minutos en aquellos grupos destinados al análisis por Western blot y de la actividad enzimática de la bomba de Na⁺ y de 30 minutos en aquellos en los que fueron analizadas la muerte celular y la función contráctil. Los cuadros en negro corresponden a isquemia, la perfusion con MDL-28170 fue a 10 μM y con BDM fue a 20 mM.

2.8. Estudio del papel de la Na⁺/K⁺-ATPasa y las calpaínas en el daño por reperfusion. Análisis de la función y la muerte celular

Corazones aislados de rata fueron sometidos a 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusion y distribuidos en los grupos: IR (sin tratamiento), MDL (perfusion con MDL-28170 10 μM los 10 minutos anteriores y los 10 posteriores a la isquemia), BDM (perfusion con BDM 20 mM los 5 primeros minutos de reperfusion) y MDL+BDM (perfusion con MDL-28170 10 μM los 10 minutos anteriores y los 10 posteriores a la isquemia y perfusion con BDM 20 mM los 5 primeros minutos de reperfusion) (n=5 por grupo) (Figura 12).

2.9. Estudio del papel de la Na⁺/K⁺-ATPasa y las calpaínas en la protección por preconditionamiento. Análisis bioquímico

El papel que la modulación de la actividad de las calpaínas y la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa tienen en la protección por preconditionamiento se estudió sometiendo corazones aislados de rata a 30 minutos de perfusión normóxica (Nx) o a 60 minutos de isquemia y 5 de reperfusión y distribuidos en los grupos: IR (sin tratamiento), IPC (protocolo de preconditionamiento consistente en 2 ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de perfusión, inmediatamente anterior al inicio de la isquemia), MDL (perfusión con MDL-28170 10 μM los 10 minutos anteriores a la isquemia y durante la reperfusión), cAMP (perfusión con CPT-cAMP a 25 μM durante 5 minutos seguidos de 5 minutos de lavado antes del inicio de la isquemia) y H89 (protocolo de preconditionamiento con perfusión de H89 a 10 μM durante 5 minutos antes de cada ciclo) (Figura 13). Los corazones fueron congelados en nitrógeno líquido al finalizar el protocolo (n=5 por grupo).

2.10. Estudio del papel de la Na⁺/K⁺-ATPasa y las calpaínas en la protección por preconditionamiento. Análisis de la función y la muerte celular

Corazones aislados de rata fueron sometidos a 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión sin tratamiento adicional o con un protocolo de preconditionamiento isquémico (Figura 13) (n=5 por grupo).

2.11. Estudio del papel de la Na⁺/K⁺-ATPasa y las calpaínas en la protección por preconditionamiento. Análisis de la cinética del Na⁺ intracelular

En el sistema Langendorff adaptado para realizar espectroscopía por resonancia magnética nuclear, corazones de rata fueron sometidos a 60 minutos de isquemia y 10 de reperfusión con el reactivo de desplazamiento TmDOTP⁵⁻ (Macrocyclics, Estados Unidos) a 3.5 mM durante los 5 minutos previos a la isquemia y toda la reperfusión. El TmDOTP⁵⁻ no cruza membranas y por tanto desplaza la frecuencia de emisión del Na⁺ extracelular. La concentración total de Ca²⁺ en el tampón de perfusión fue aumentada hasta 4 mM para compensar la afinidad del TmDOTP⁵⁻ por el Ca²⁺ (Van Emous et al., 1998). Durante la reperfusión, el tampón incluyó BDM 50 mM para prevenir la muerte celular. Los corazones fueron distribuidos en tres grupos: IR (sin tratamiento adicional), IPC (protocolo de pre-

condicionamiento) y MDL (perfusión con MDL-28170 10 μ M los 10 minutos anteriores a la isquemia y durante la reperfusión) (Figura 13) (n=3 por grupo).

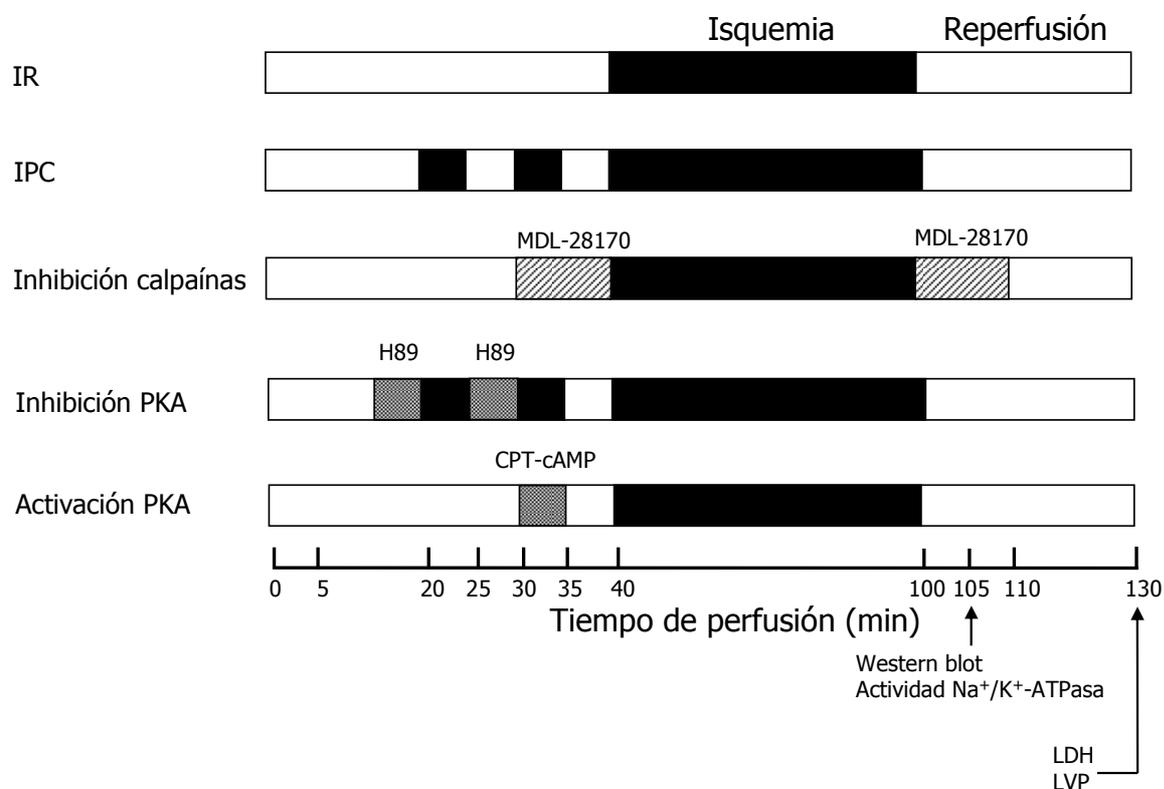


Figura 13. Protocolos de perfusión del estudio del papel de la Na⁺/K⁺-ATPasa y las calpaínas en la protección otorgada por el preconditionamiento isquémico. La reperfusión fue de 5 minutos en aquellos grupos destinados al análisis por Western blot y de la actividad enzimática de la bomba de Na⁺, de 10 minutos y con BDM 20 mM en aquellos en los que se estudió la cinética de Na⁺ intracelular, y de 30 minutos en aquellos en los que fueron analizadas la muerte celular y la función contráctil. De arriba a abajo, los grupos IR, IPC, MDL, H89 y cAMP. Los cuadros negros corresponden a isquemia.

2.12. Estudio del papel del pH y las calpaínas en la protección por postcondicionamiento. Análisis bioquímico

Se estudió el papel del pH intracelular y la actividad de las calpaínas en la protección por postcondicionamiento con corazones de rata sometidos a 30 minutos de perfusión normóxica (Nx) o a 40 minutos de isquemia y 5 de reperfusión y los siguientes tratamientos justo en el inicio de la reperfusión: IR (sin tratamiento), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperfusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperfusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad) y pH6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4). En un grupo adicional (MDL), los corazones fueron perfundidos con MDL-28170 10 μ M los 10 minutos

anteriores a la isquemia y durante la reperfusión (Figura 14). Los corazones fueron congelados en nitrógeno líquido al finalizar el protocolo (n=3 por grupo).

2.13. Estudio del papel del pH y las calpaínas en la protección por postcondicionamiento. Análisis de la función y la muerte celular

Corazones aislados de rata fueron sometidos a 40 minutos de isquemia y 60 de reperfusión y los siguientes tratamientos justo en el inicio de la reperfusión: IR (sin tratamiento), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperfusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperfusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad) y pH6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4). En un grupo adicional (MDL), los corazones fueron perfundidos con MDL-28170 10 μM los 10 minutos anteriores a la isquemia y los 10 primeros de la reperfusión (Figura 14) (n=6 por grupo).

2.14. Estudio del papel del pH y las calpaínas en la protección por postcondicionamiento. Análisis del pH intracelular

En el sistema Langendorff adaptado para RMN, corazones aislados de rata fueron sometidos a 40 minutos de isquemia y 30 de reperfusión y los siguientes tratamientos justo en el inicio de la reperfusión: IR (sin tratamiento), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperfusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperfusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad) y pH6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4). En un grupo adicional (MDL), los corazones fueron perfundidos con MDL-28170 10 μM los 10 minutos anteriores a la isquemia y los 10 primeros de la reperfusión (Figura 14) (n=3 por grupo). El tampón Krebs-Henseleit utilizado no incluyó KH_2PO_4 para poder identificar el fosfato inorgánico intracelular.

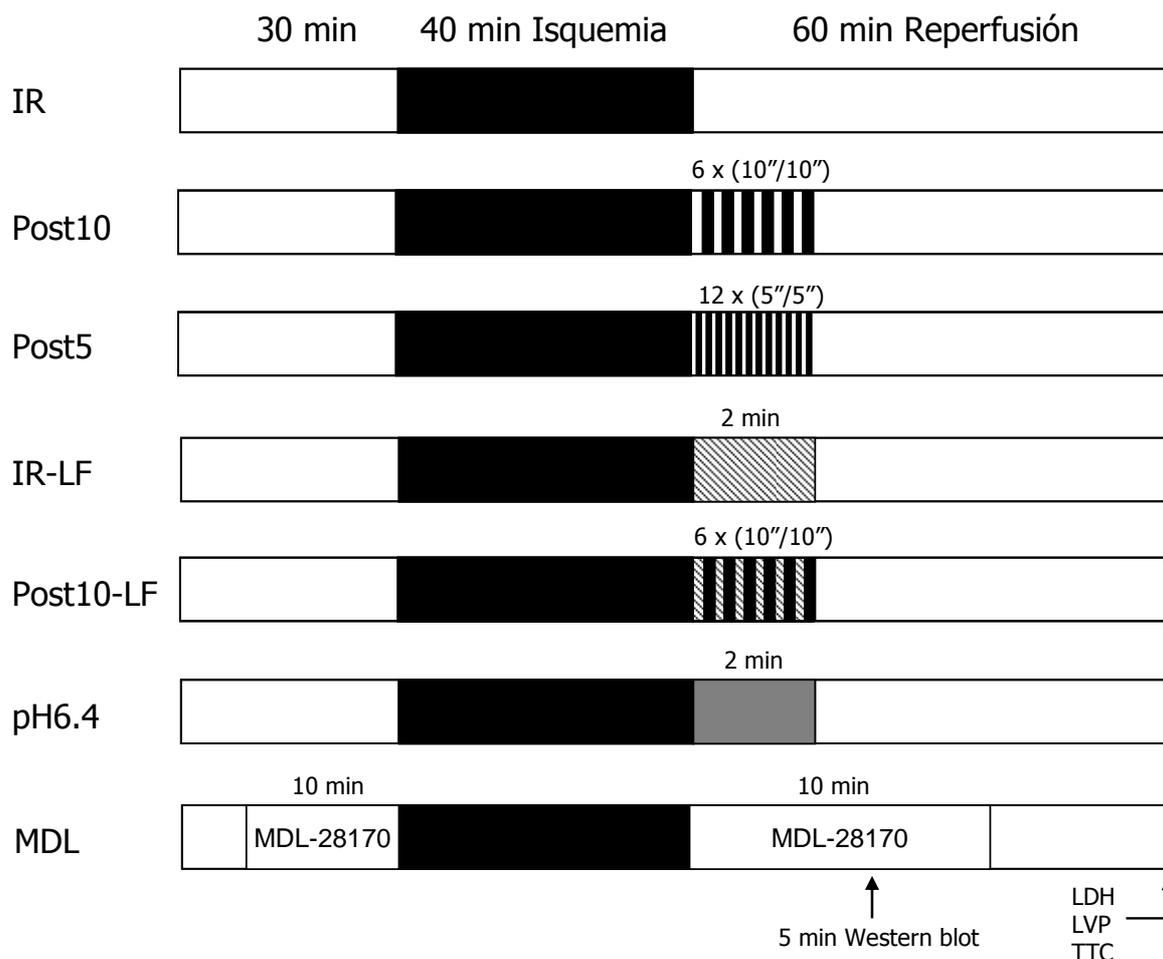


Figura 14. Protocolos de perfusión del estudio del papel del pHi y de las calpaínas en la protección otorgada por el postcondicionamiento isquémico. La perfusión fue de 5 minutos en aquellos grupos destinados al análisis por Western blot, de 30 minutos en aquellos en los que se estudió el pH intracelular, y de 60 minutos en aquellos en los que fueron analizadas la muerte celular y la función contráctil. Los cuadros en negro corresponden a isquemia, en gris a perfusión a pH 6.4 y los rayados en diagonal a perfusión a mitad de flujo.

2.15. Estudio del efecto protector durante la perfusión del inhibidor de las calpaínas en un modelo de rata *in vivo*. Análisis del tamaño del infarto

En el modelo de isquemia/perfusión *in vivo*, las ratas fueron sometidas a 30 minutos de oclusión coronaria seguida de 120 minutos de perfusión. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en los grupos IR (administración del vehículo PEG-400:etanol 9:1) y MDL (administración de MDL-28170 9.2 mg/ml en PEG-400:etanol). La administración de la droga se realizó mediante infusión lenta y continua de 10 mg/kg de MDL-28170 impulsada por bomba (KDS Scientific, Estados Unidos) por la vena yugular durante los últimos 8 minutos de la isquemia y los 2 primeros de la perfusión, seguidos de 30

minutos de infusión a 3.3 mg/kg/h, como había sido previamente descrito (Markgraf et al., 1998). En el grupo IR el vehículo se infundió durante los mismos períodos y con volúmenes equivalentes al grupo con droga, y el experimentador no conoció la composición del tratamiento durante el estudio. Durante la reperfusión el tórax se cerró para evitar la deshidratación. Al finalizar la reperfusión, la coronaria fue reocluida y se inyectó fluoresceína sódica al 4% (Novartis, Suiza) a través de la vena yugular para marcar el miocardio no isquémico. Los corazones fueron extraídos y cortados transversalmente en 5 secciones para el análisis del área en riesgo y el tamaño del infarto (n=9 por grupo).

2.16. Estudio del efecto protector de la inhibición de las calpaínas en la reperfusión en un modelo de rata *in vivo*. Análisis del grado de inhibición de las calpaínas

Para determinar la actividad de las calpaínas las ratas fueron sometidas a 30 minutos de oclusión coronaria seguida de 15 minutos de reperfusión. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente y de forma ciega en los grupos IR y MDL previamente descritos. Al finalizar la reperfusión, los corazones fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido para su análisis bioquímico por Western blot (n=5 por grupo).

3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

3.1. Cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa

La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) fue medida mediante espectrofotometría en muestras recogidas del efluente coronario a diferentes tiempos durante el periodo de reperfusión. El ensayo se realizó diluyendo 1/10 la muestra de efluente en tampón fosfato (en mM: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 61.4, KH_2PO_4 58.6) a pH 7.4 y 37°C en presencia de una concentración de NADH de 310 μM y una de piruvato sódico de 1 mM. Se midió la caída del valor de absorbancia a 320 nm en un espectrofotómetro de placa *SpectralIII* (SLT-Labinstruments, Austria). Se calculó la concentración catalítica de LDH de la muestra usando el coeficiente de absortividad molar del NADH y se normalizaron sus valores en función del tiempo (usando el flujo) y del peso seco (gdw, calculado mediante deshidratación de una sección de cada corazón a 100°C durante 24 horas).

3.2. Medición del área en riesgo y del tamaño del infarto

Al final de la reperfusión, los corazones reperfundidos destinados al análisis de la muerte celular fueron seccionados transversalmente para el análisis histológico del tamaño del infarto. Las secciones de los corazones sometidos a isquemia/reperfusión *in vivo* y marcados con fluoresceína fueron fotografiadas bajo luz ultravioleta con una cámara digital convencional. Se consideró como área en riesgo la región no marcada de cada sección, que fue medida con el programa *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Estados Unidos).

Estas secciones fueron posteriormente incubadas en tampón PBS (pH 7.4, en mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na_2HPO_4 10, KH_2PO_4 2) con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% durante 15 minutos a 37°C. El TTC en tejido viable adopta un color rojo debido a su reducción en una reacción dependiente de NADH, únicamente presente en células con el sarcolema preservado. Se obtuvieron imágenes de las secciones con una cámara digital convencional y posteriormente se pesaron las secciones de corazón. La cuantificación del área de infarto, en color blanco, fue realizada con el programa *Image-Pro Plus*. El área de infarto se expresó, tras ponderar el área de cada sección por su peso y sumar los valores de todas las secciones, como porcentaje del área en riesgo (también ponderada por peso y sumada). En el caso de corazones sometidos a isquemia global *ex vivo* el área en riesgo coincide con el área total, por lo que las secciones se tiñeron directamente en TTC, sin perfundir con fluoresceína, y el tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área total (la suma de las áreas ponderadas de las secciones).

3.3. Fraccionamiento celular. Obtención de fracciones citosólica y de membrana

Los corazones congelados se homogenizaron con un politrón *Heidolph DIAX 600* (Alemania) en tampón de homogenización (en mM: Tris-HCl 20, NaCl 140, EDTA 0.8, NaN₃ 10, sacarosa 250, cóctel de inhibidores de proteasas 1% y pH 7.4). Para descartar los núcleos y las porciones de tejido deficientemente homogenizadas las muestras se centrifugaron a 600 g y 4°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 100000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con tampón Laemmli 2x y se consideró como la fracción citosólica. El residuo fue resuspendido en el tampón de homogenización con Igepal 1% e incubado durante 30 minutos a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 100000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con Laemmli 2x y se consideró como la fracción de membrana. Se conservó un volumen de cada muestra para cuantificar la cantidad de proteína presente mediante el método Bradford.

3.4. Fraccionamiento celular. Obtención de fracciones de membrana asociada y no asociada a citoesqueleto

Los corazones congelados se homogenizaron en politrón en el tampón de homogenización utilizado en el protocolo previo. Las muestras se centrifugaron a 600 g y 4°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 100000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con tampón Laemmli 2x y se consideró como la fracción citosólica. El residuo fue resuspendido en el tampón de homogenización con Tritón X-100 0.1% e incubado durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 100000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con Laemmli 2x y se consideró como la fracción de membrana no asociada a citoesqueleto, mientras que el residuo fue resuspendido en el tampón de homogenización con SDS 1% y ácido deoxicólico 1% e incubado durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 100000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con Laemmli 2x y se consideró como la fracción de membrana asociada a citoesqueleto. Se conservó un volumen de cada muestra para cuantificar la cantidad de proteína presente mediante el método Bradford.

3.5. Análisis por Western blot

Las proteínas se separaron en condiciones desnaturizantes por su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE. El gel concentrador se preparó al 4% (acrilamida/bisacrilamida 37.5:1 al 4%, Tris base 0.125 mM, SDS 0.1%, APS 0.05%, TEMED 0.1%, pH 6.8) y el separador al 7.5% o al 10% (acrilamida/bisacrilamida 37.5:1 al 7.5% o al 10%, Tris base 0.375 mM, SDS 0.1%, APS 0.05%, TEMED 0.1%, pH 8.8). Los geles se montaron en un sistema *Mini-Protean III* de Bio-Rad sumergidos en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3). Se cargaron las muestras junto con el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Dual Color* de BioRad y se aplicó a los geles una intensidad constante de 20mA por gel suministrada por un *Power Pac 300* de BioRad. La electroforesis se detuvo cuando el frente de bromofenol salió del gel (aproximadamente tras 2 horas).

Las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL* de Amersham Biosciences (Suecia) mediante transferencia húmeda usando el módulo para transferencia del *Mini-Protean III* y el *Power Pac 300*. La transferencia se realizó a 100 V durante 1 hora con el tampón de transferencia (metanol 20%, Tris base 25 mM, glicina 20 mM) agitado y mantenido a 4°C. Para confirmar una carga de proteína igual en todos los carriles se tiñeron las membranas con rojo de Ponceau. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 0.1% (pH 7.4, Tris base 20 mM, NaCl 138 mM, Tween 20 0.1%) y bloqueadas con leche desnatada en polvo 5% en TBS-Tween 0.1% durante 1 hora. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 0.1% e incubadas durante 90 minutos con los anticuerpos primarios (en TBS, *Superblock Blocking Buffer* 10%, NaN_3 7.5 mM) contra las subunidades α_1 , α_2 y α_3 (Upstate Biotechnology, Estados Unidos) de la Na^+/K^+ -ATPasa, contra α -fodrina (Biomol, Reino Unido), contra anquirina-B (Oncogene Research Products, Estados Unidos), contra m-calpaína (Calbiochem), contra μ -calpaína (Calbiochem) y contra calpastatina (Abcam, Reino Unido). Las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano correspondiente (en leche 5% en TBS-Tween 0.1%). Las membranas se lavaron y se detectó el marcaje de las bandas mediante quimioluminiscencia usando el *SuperSignal West Dura Extended Duration* como sustrato de la peroxidasa y registrando la luminiscencia con la cámara CCD *LAS-3000* de Fujifilm (Japón). La densidad óptica de las bandas se cuantificó usando un programa de análisis de imagen (*Image Gauge*, Fujifilm).

3.6. Inmunofluorescencia por microscopía confocal

Secciones de corazones aislados de rata congeladas en isopentano fueron procesadas en un criostato Leica *CM3050 S* (Alemania) para obtener cortes transversales de 5 μm . Estos cortes fueron transferidos a portaobjetos y dejados secar durante 30 minutos para ser incubados durante 10 minutos y a temperatura ambiente con tampón de permeabilización (PBS con Tritón X-100 0.5% y NaN_3 0.02%). Los cortes se lavaron en PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con 1 hora de incubación a temperatura ambiente en presencia de suero de cabra al 2% (tampón PBS con Tritón X-100 0.5% y NaN_3 0.02%). A continuación los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios de ratón para la α -fodrina (dilución 1:100) y de conejo para la m-calpaína (dilución 1:20), o ninguno de ellos (control negativo), en presencia de suero de cabra al 1%. Los cortes fueron posteriormente lavados en PBS para ser incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios contra IgG de ratón (conjugado a Alexa488) y contra IgG de conejo (conjugado a Alexa594) (Molecular Probes, Estados Unidos), suplementados con DAPI (0.5 mg/l) para marcar núcleos y con suero de cabra al 1%. Las imágenes fueron capturadas a 1000 aumentos con un microscopio confocal Olympus *FluoView-1000* (Alemania) tras definir las condiciones de exposición con el respectivo control negativo.

3.7. Proteólisis *in vitro* mediada por m-calpaína

Para examinar la proteólisis de la Na^+/K^+ -ATPasa por parte de la calpaína, la fracción de membrana, obtenida como se ha descrito de corazones perfundidos normóxicamente, fue incubada con 1 μg de m-calpaína recombinante en presencia de 10 mM CaCl_2 a 25°C durante 5, 10, 30, 60, o 120 minutos (el control contenía 10 μM MDL-28170). La reacción se detuvo mediante la adición de 10 μM MDL-28170, se mezcló con tampón Laemmli 2x y las proteínas se separaron por electroforesis y se analizaron por Western blot.

3.8. Medición de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa

Se homogenizaron con politrón corazones congelados en tampón conteniendo (en mM) HEPES 20, sacarosa 250, EDTA 2 y MgCl_2 1, pH 7.4. Los homogenados se centrifugaron a 20000 g durante 30 minutos. Se obtuvieron dos alícuotas de la fracción particulada resuspendidas en tampón de homogenización, una se mezcló con tampón de reacción (concentración final en mM: Tris-HCl 100, MgCl_2 20, NaCl 130, KCl 40, EGTA 7, pH 7.4) y la

otra con tampón de reacción con ouabaína a 2 mM. Los tubos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C, y se inició la reacción con la adición de ATP 10 mM. Tras 5 minutos, la reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético hasta un 10% final. Las muestras se incubaron en hielo durante 1 hora y se centrifugaron a 20000 g durante 10 minutos. El contenido en fosfato inorgánico de los sobrenadantes fue determinado mediante un ensayo espectrofotométrico basado en el molibdato de amonio. En éste, las muestras se diluyeron 1/20 en agua destilada (para un volumen de 400 µl) y se le añadieron 100 µl de una solución de molibdato (H_2SO_4 29% v/v, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KO}_7\text{Sb}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ 0.07% y molibdato de amonio 2 mM en agua destilada) y 25 µl de reactivo de Fiske-Subbarow 16% w/v. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro *Pharmaspec UV-1700* (Shimadzu, Japón). La actividad Na^+/K^+ -ATPasa insensible a la ouabaína, determinada en presencia de ouabaína 2 mM, se substrajo del valor observado en su ausencia para calcular la actividad Na^+/K^+ -ATPasa sensible a la ouabaína.

3.9. Cuantificación del Na^+ intracelular por RMN

La cinética del Na^+ intracelular fue medida en corazones aislados de rata mediante RMN de ^{23}Na con una sonda de 20 mm. Los espectros se obtuvieron a una frecuencia de 105.8 MHz. Cada espectro consistió en la acumulación durante 30 segundos de 104 escaneos. Para cuantificar el Na^+ intracelular se utilizó el programa *XWIN-NMR* de Bruker para medir el área del pico no desplazado por el reactivo añadido al tampón de perfusión, y la cantidad de Na^+ se expresó en relación a la cantidad presente antes de la isquemia (Figura 15).

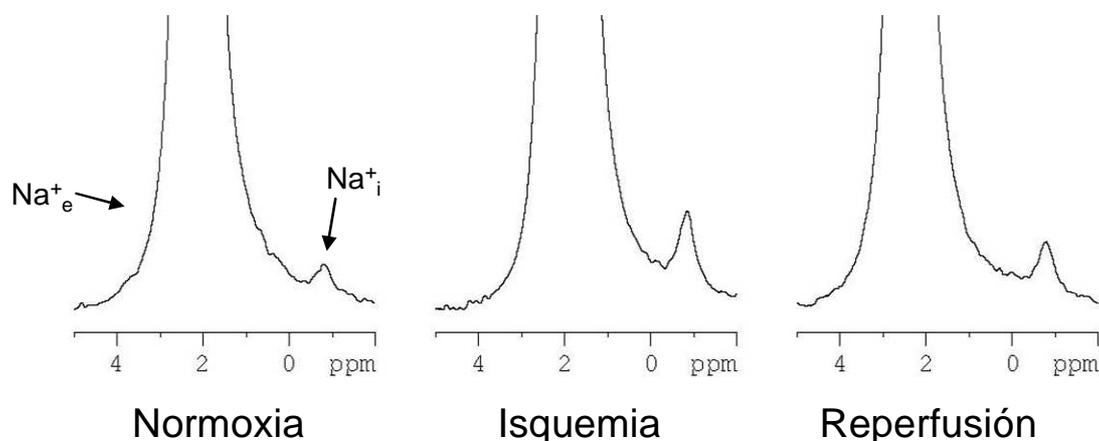


Figura 15. Espectros de Na^+ por RMN representativos de la perfusión normóxica preisquémica, de la isquemia y del inicio de la reperusión. En ellos se observa la elevación durante la isquemia del pico correspondiente al Na^+ intracelular y la recuperación parcial en la reperusión.

3.10. Medición del pH intracelular por RMN

El pH intracelular fue medido en corazones aislados de rata mediante RMN de ^{31}P con una sonda de 20 mm. Los espectros fueron obtenidos a 161.9 MHz y consistieron en 50 escaneados con un espaciado de 0.6 segundos entre pulsos, para un total de 30 segundos por espectro.

El pH se calculó a partir del desplazamiento del pico correspondiente al fosfato inorgánico, que al estar ausente del tampón de perfusión corresponde exclusivamente al intracelular, del pico de fosfocreatina, cuya posición no varía con los cambios en el pH y que se recupera rápidamente en el inicio de la reperfusión. Los datos se obtuvieron con el programa *XWIN-NMR* de Bruker y la fórmula utilizada para el cálculo del pH fue la siguiente (Moon and Richards, 1973):

$$\text{pHi} = 6.75 + \log \frac{\delta - 3.28}{5.69 - \delta}$$

donde 6.75 es la pKa del fosfato inorgánico, δ es la distancia en ppm de los picos correspondientes del fosfato inorgánico y la fosfocreatina, 3.28 es la distancia mínima entre estos picos y 5.69 la máxima.

El tiempo de recuperación fue establecido como el periodo de tiempo transcurrido entre el inicio de la reperfusión y la detección de un pH intracelular de 7.0.

3.11 Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos se analizaron mediante una prueba t-student cuando se compararon dos grupos experimentales y con una prueba ANOVA de un factor cuando se compararon más grupos. La significación se fijó en un P-valor de 0.05. En aquellos casos en los que se encontraron diferencias significativas por ANOVA, se realizó un análisis *post hoc* con el test de Bonferroni. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa SPSS (SPSS Inc., Estados Unidos). Los resultados están expresados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (error estándar de la muestra).

RESULTADOS

1. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS CALPAÍNAS DURANTE LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICAS

1.1. IMPLICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS EN LA MUERTE CELULAR POR REPERFUSIÓN

En corazones sometidos a isquemia transitoria, la reperfusión se caracteriza en primer lugar por la aparición de hipercontractura en los primeros minutos de la reperfusión; el grado de hipercontractura es cuantificado, tal y como se ha explicado en métodos, a partir del incremento en la presión diastólica durante la reperfusión (Figura 16A). Como se detalla en la introducción, la reperfusión causa muerte celular, la cual es necrótica y es detectada tanto por liberación de LDH (Figura 16C) como por medición del tamaño del infarto por análisis histológico (Figura 16D); la necrosis ocurre principalmente en los primeros minutos de la reperfusión, tal y como demuestra la cinética de liberación de LDH durante la reperfusión (Figura 16F), y se acompaña de una pobre o nula recuperación de la función contráctil dependiendo de la severidad de la isquemia previa (Figura 16B).

La implicación de las calpaínas en el daño por isquemia/reperfusión queda patente con el efecto cardioprotector asociado a su inhibición farmacológica en corazones aislados de rata sometidos a isquemia y reperfusión (Figura 16). La inhibición farmacológica de las calpaínas con la administración del inhibidor competitivo MDL-28170 antes de la isquemia y durante el inicio de la reperfusión fue confirmada mediante el análisis de la aparición de fragmentos de α -fodrina de 145 y 150 kDa, específicos de la degradación por calpaínas (Wang, 2000) (Figura 16E); la inhibición de las calpaínas redujo notablemente tanto la liberación enzimática (Figuras 16C y 16F) como el tamaño del infarto (Figura 16D), a la vez que mejoró la recuperación funcional del miocardio al final del protocolo (Figura 16B). Además, la inhibición de las calpaínas redujo significativamente la magnitud de la hipercontractura (Figura 16C), fenómeno que no se puede explicar mediante el efecto que las calpaínas tienen sobre la fragilidad celular (Inserte et al., 2004).

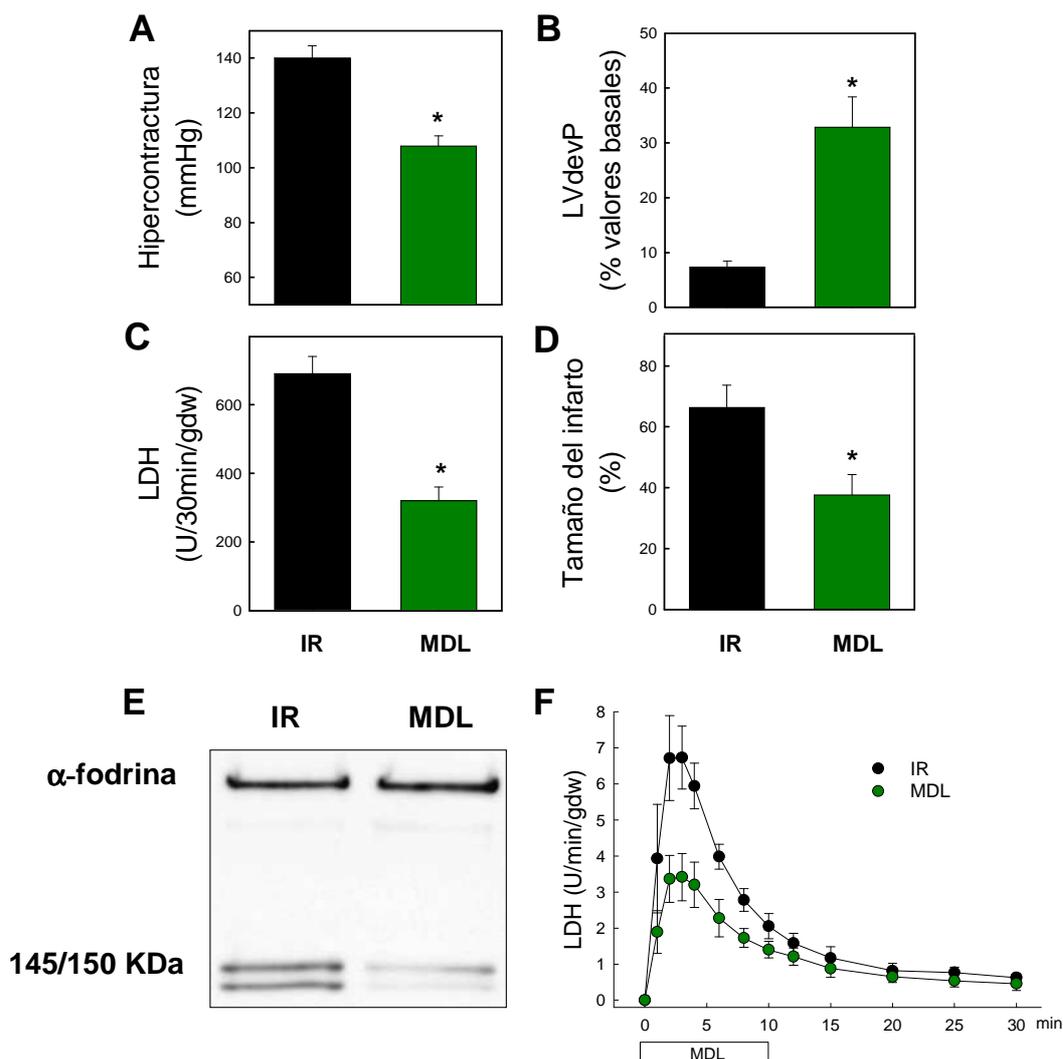


Figura 16. Cuantificación de la hipercontractura (A), presión desarrollada del ventrículo izquierdo (B), liberación acumulada de lactato deshidrogenasa (C), tamaño del infarto (D), activación de calpaínas (degradación de fodrina, E) y evolución temporal de la liberación de LDH (F) en corazones aislados de rata sometidos a 60 minutos de isquemia y 30 de reperusión (IR) o sometidos al mismo protocolo con la administración de MDL-28170 10 μ M durante los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros minutos de la reperusión (MDL). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=6. * P<0.05 respecto a IR.

1.2. MOMENTO DE ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS DURANTE LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

Los estudios previos realizados tanto en este como en otros laboratorios no determinaron el momento de activación de las calpaínas en el miocardio durante la isquemia/reperusión (Yoshida et al., 1995; Inserte et al., 2004). Este aspecto de su activación es de gran importancia ya que de él depende su eficacia como diana terapéutica. Por

este motivo se analizó la activación de las calpaínas en muestras de membrana de corazones sometidos a diferentes tiempos de isquemia con o sin reperfundición posterior.

En los corazones sin reperfundir no se produjo degradación de α -fodrina ni aun cuando la duración de la isquemia se prolongó hasta los 90 minutos (Figura 17). Sin embargo, en los corazones reperfundidos se observó actividad de las calpaínas cuando los tiempos de isquemia eran superiores a 15 minutos, alcanzándose un máximo con 60 minutos (Figura 18). La especificidad del origen de los fragmentos detectados la confirmó el tratamiento con MDL-28170 (Figura 18). Estos resultados demuestran, por tanto, que la activación de las calpaínas se produce durante la reperfundición y no durante la isquemia previa.

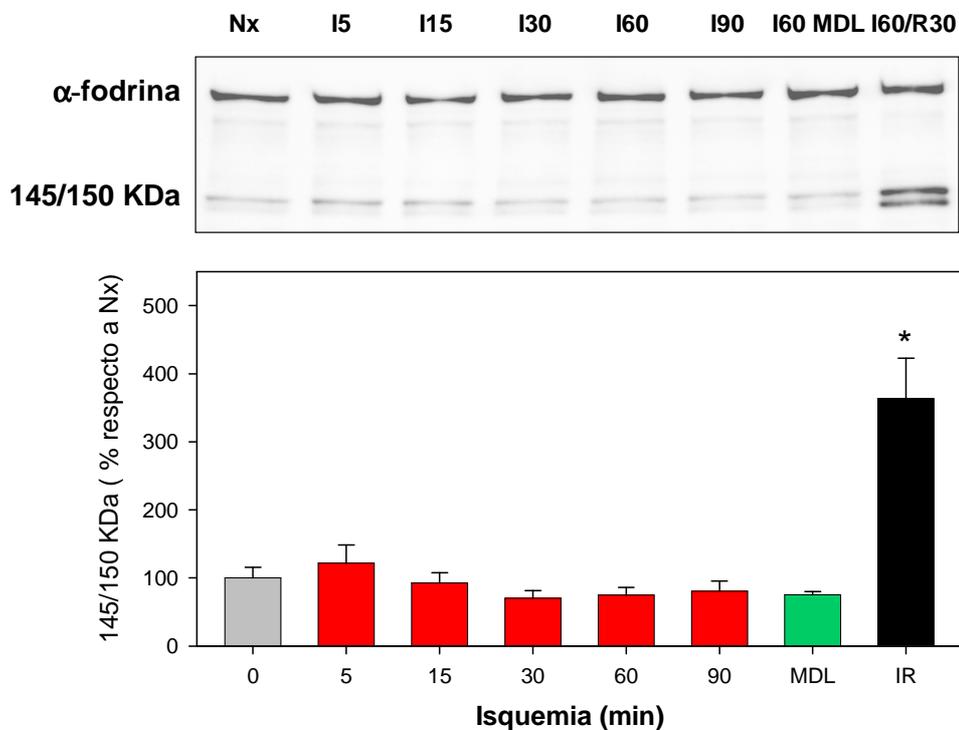


Figura 17. Activación de calpaínas (degradación de α -fodrina) de corazones sometidos a diversos períodos de isquemia: 0 (perfusión normóxica), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, MDL (60 minutos de isquemia con 10 minutos previos de administración de MDL-28170 10 μ M) e IR (60 minutos de isquemia y 30 de reperfundición). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=4. * P<0.05 respecto a 0.

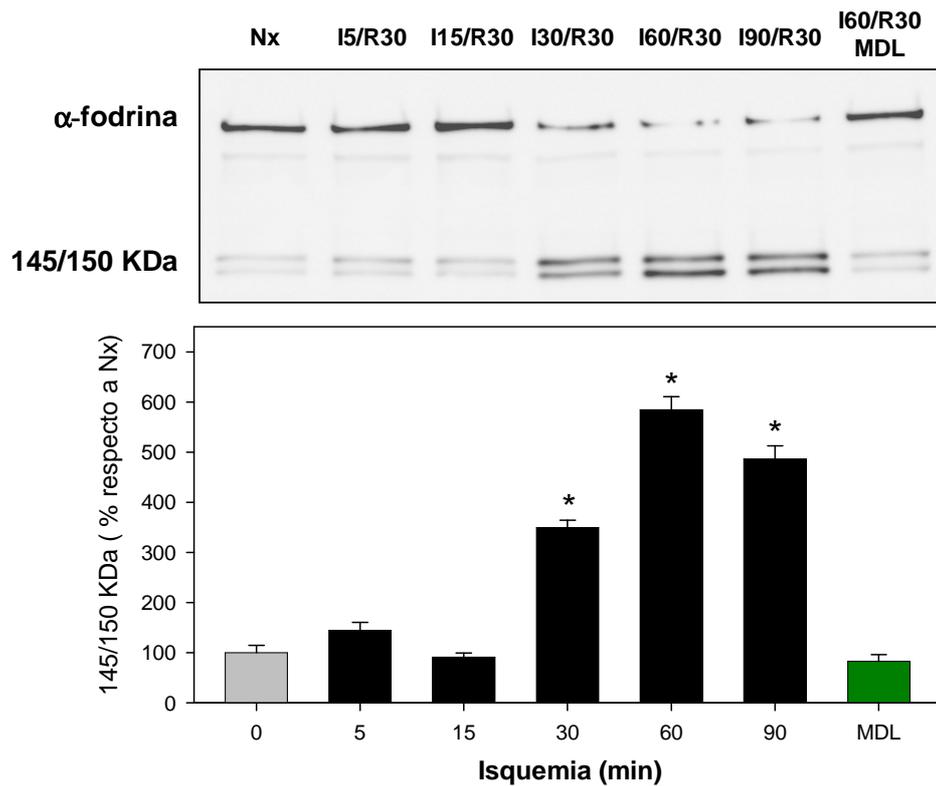


Figura 18. Activación de calpaínas (degradación de α -fodrina) de corazones sometidos a 30 minutos de reperusión tras diversos períodos de isquemia: 0 (perfusión normóxica), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos y MDL (60 minutos de isquemia con reperusión y administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros de la reperusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=4. * P<0.05 respecto a 0.

1.3. TRANSLOCACIÓN DE LAS CALPAÍNAS A MEMBRANA

La translocación a membrana se ha propuesto como uno de los pasos necesarios en el proceso de activación de las calpaínas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en una situación como la existente durante la isquemia en la que la concentración intracelular de Ca^{2+} se encuentra elevada de forma sostenida, la translocación a membrana podría no ser necesaria. Debido a esto se analizó la existencia de translocación a membrana tanto de la μ -calpaína como de la m-calpaína. El análisis se realizó por Western blot con las mismas muestras empleadas para determinar la activación de las calpaínas.

En los extractos de membrana, la μ -calpaína mostró un marcaje tenue que no varió significativamente con la isquemia ni con la reperusión (Figura 19).

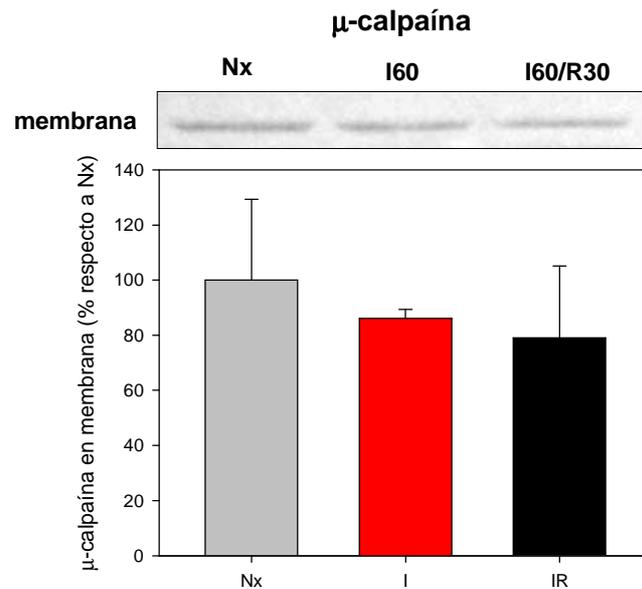


Figura 19. Presencia de μ -calpaína en membrana en corazones sometidos a perfusión normóxica (Nx), 60 minutos de isquemia (I) o 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión (IR). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a Nx.

En el caso de la m-calpaína, en cambio, se observaron cambios en su distribución celular. El análisis de muestras de corazones sin reperfundir mostró manifiestamente translocación de la m-calpaína a membrana, siendo significativa a partir de 30 minutos de isquemia. El aumento en la cantidad de m-calpaína en membrana no se asoció a cambios en la expresión total de la proteasa (Figura 20). La inhibición de la actividad de las calpaínas con MDL-28170 no redujo su presencia en membrana, resultado que demuestra que la translocación a membrana no requiere de la actividad catalítica de la proteasa (Figura 20).

El estudio con muestras de corazones sometidos a isquemia y reperfusión mostró una tendencia al incremento de m-calpaína en membrana tras isquemia/reperfusión, que con 60 y 90 minutos de isquemia era significativa, pero que en todo caso fue menor que en los corazones no reperfundidos (Figura 21).

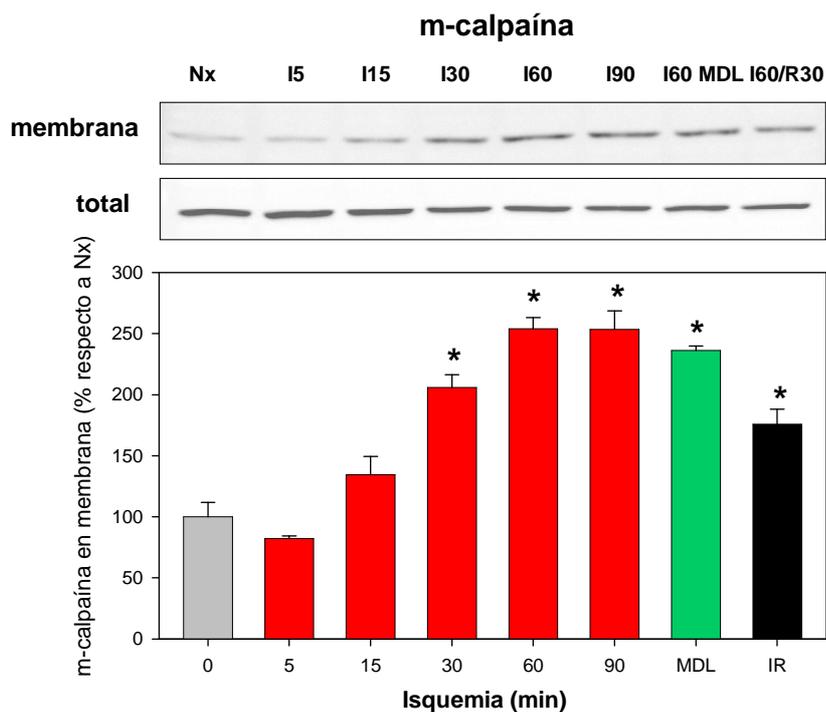


Figura 20. Presencia de m-calpaína en membrana de corazones sometidos a diversos períodos de isquemia: 0 (perfusión normóxica), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, MDL (60 minutos de isquemia con 10 minutos previos de administración de MDL-28170 10 μ M) e IR (60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=4. * P<0.05 respecto a 0.

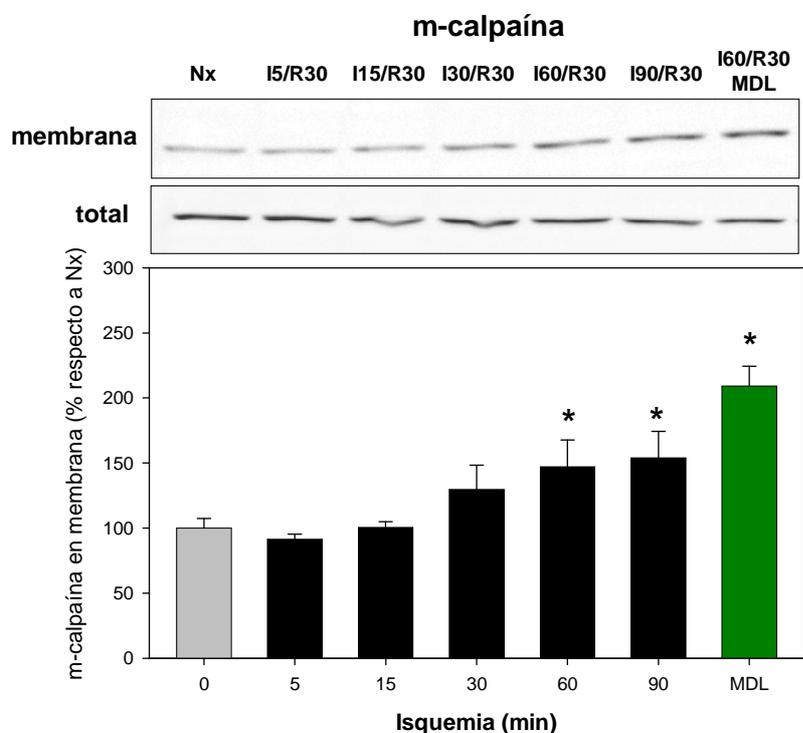


Figura 21. Presencia de m-calpaína en membrana de corazones sometidos a 30 minutos de reperfusión tras diversos períodos de isquemia: 0 (perfusión normóxica), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos y MDL (60 minutos de isquemia con reperfusión y administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros de la reperfusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=4. * P<0.05 respecto a 0.

La fracción de membrana utilizada para el análisis por Western blot incluye membrana de orgánulos además de la plasmática; esta última, además, presenta diferentes regiones en el cardiomiocito. Con el fin de confirmar la presencia de m-calpaína en membrana mediante otra técnica además de determinar la distribución de la proteasa en la célula, se estudió la localización de α -fodrina y m-calpaína mediante inmunofluorescencia en criosecciones de corazones aislados de rata sometidos a perfusión normóxica (Nx), 60 minutos de isquemia (I60) o 60 minutos de isquemia y 5 de perfusión con BDM (I60/R5 BDM). El marcaje de α -fodrina mostró un patrón propio de marcaje de membrana plasmática en los tres grupos, con una elevada fluorescencia en discos intercalares, membrana plasmática lateral y en bandas correspondientes a los túbulos T (Figura 22). El grupo de isquemia/reperfusión no mostró un descenso significativo del marcaje de α -fodrina, dado que el anticuerpo utilizado no distingue entre la forma intacta y los fragmentos de degradación. El marcaje con anticuerpo para m-calpaína mostró un patrón similar al de α -fodrina con mayor fluorescencia de fondo debida a su distribución citosólica (Figura 22). El marcaje de m-calpaína en membrana aumentó en los corazones sometidos a isquemia o isquemia/reperfusión, confirmando los resultados obtenidos por Western blot (Figura 22).

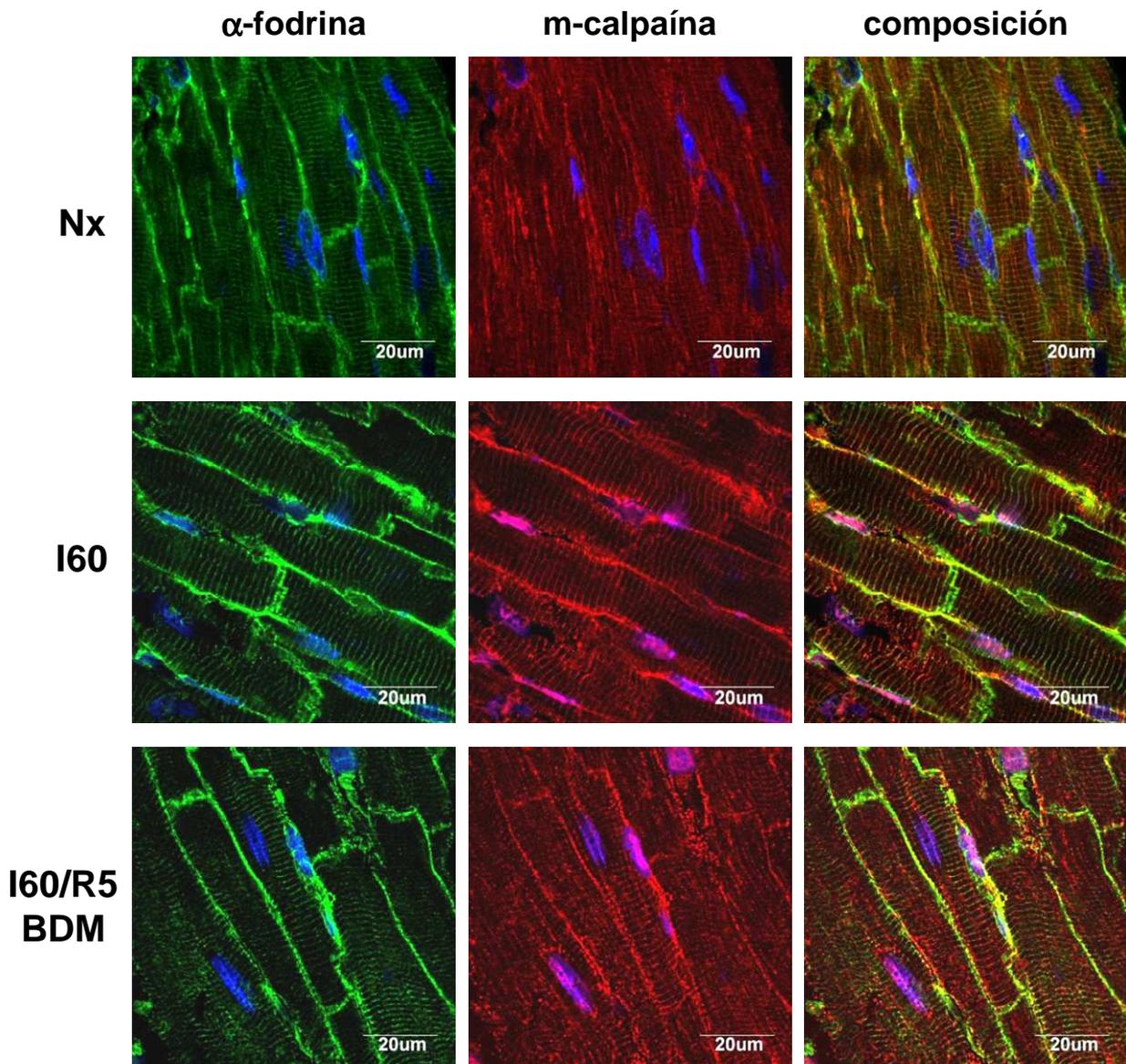


Figura 22. Localización celular de α -fodrina (verde) y m-calpaína (rojo) en secciones de corazones de los grupos: Nx (perfusión normóxica), I60 (60 minutos de isquemia) e I60/R5 BDM (60 minutos de isquemia y 5 de reperfusión con BDM 20 mM). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). Imágenes representativas de tres experimentos.

1.4. DEPENDENCIA DEL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ EN LA ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS Y LA TRANSLOCACIÓN DE LA m-CALPAÍNA

El Ca^{2+} es el principal activador de las calpaínas, por lo que es probable que también sea responsable de su translocación a membrana durante la isquemia. Se utilizó el KB-R7943, un inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, con el fin de demostrar la implicación de la actividad reversa de este transportador en la activación de las calpaínas y determinar su contribución a la translocación de la m-calpaína. Para descartar los efectos de una entrada masiva de Ca^{2+} a causa de la muerte celular, ésta se previno con BDM, un inhibidor de la contracción que reduce la hipercontractura y la muerte celular (García-Dorado et al., 1992a).

Los resultados obtenidos con muestras de membrana de corazones aislados de rata sometidos a isquemia o isquemia/reperfusión muestran que la administración de KB-R7943 antes de la isquemia redujo la presencia de m-calpaína en membrana, así como la activación de las calpaínas durante la reperfusión (Figura 23A). Esta reducción en la actividad de las calpaínas se asoció a una reducción de la muerte celular (Figura 23B). Estos resultados confirman el papel que el Ca^{2+} tiene en la activación de las calpaínas y en su translocación, pero no aclaran el papel que tiene esta última en la activación de la m-calpaína, dado que la actividad y la translocación podrían ser fenómenos paralelos dependientes de Ca^{2+} pero sin relación causal.

RESULTADOS

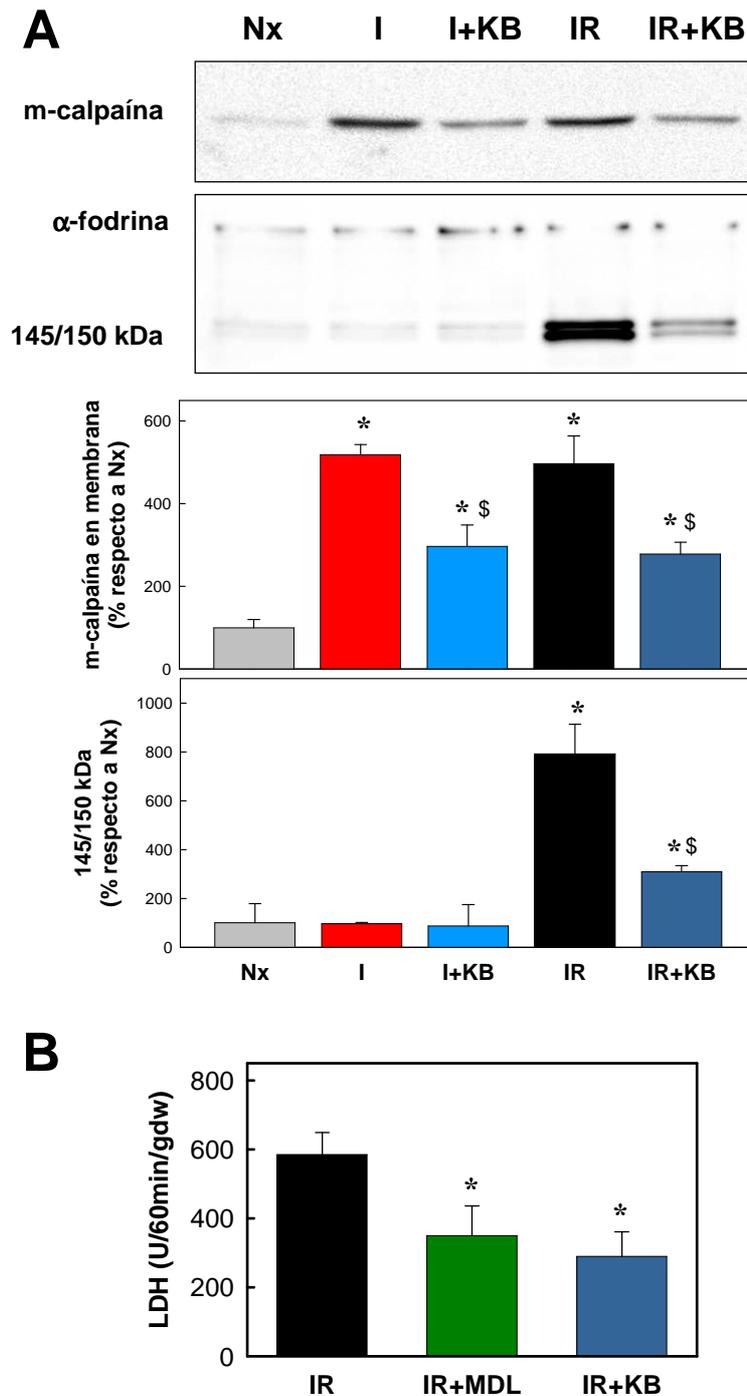


Figura 23. A) Presencia de m-calpaína en membrana y degradación de α -fodrina en corazones sometidos a distintos protocolos: Nx (perfusión normóxica), I (60 minutos de isquemia), I+KB (60 minutos de isquemia precedidos de 10 minutos de perfusión con KB-R7943 10 μ M), IR (60 minutos de isquemia y 30 de perfusión con 10 minutos iniciales de perfusión con BDM 20 mM) e IR+KB (protocolo IR con 10 minutos de perfusión con KB-R7943 10 μ M antes de la isquemia). B) Liberación acumulada de lactato deshidrogenasa (LDH) en la perfusión de corazones sometidos a 60 minutos de isquemia y 60 de perfusión y distribuidos en los grupos: IR (control) IR+MDL (administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros de la perfusión) e IR+KB (administración de KB-R7943 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a Nx (A) o IR (B). \$ P<0.05 respecto a I (I+KB) o IR (IR+KB).

1.5. EFECTO DE LA ACIDOSIS INTRACELULAR EN LA ACTIVIDAD Y TRANSLOCACIÓN DE LAS CALPAÍNAS

Experimentos *in vitro* demuestran que las calpaínas ven reducida notablemente su actividad con un pH ácido (Allen and Orchard, 1987; Kendall et al., 1993; Zhao et al., 1998). Por tanto, la acidosis intracelular existente en el miocardio isquémico podría explicar la ausencia de actividad de las calpaínas durante la isquemia aun en presencia de una sobrecarga de Ca^{2+} . En ese caso, la translocación de m-calpaína a la membrana podría significar que la proteasa se halla detenida en un paso del proceso de activación. Para estudiar el efecto de la acidosis en la activación y en la translocación, se eliminó el resto de posibles factores determinantes presentes durante la isquemia mediante el uso de un modelo de inducción de sobrecarga de Ca^{2+} sin isquemia previamente establecido en nuestro laboratorio (Inserte et al., 2004). En este modelo, corazones aislados de rata son perfundidos con un tampón carente de Na^+ , el cual activa el modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e introduce Ca^{2+} en los cardiomiocitos, consiguiéndose una sobrecarga de Ca^{2+} en ausencia de otros trastornos producidos por la isquemia.

Como era de esperar, la activación del modo reverso del NCX debido a la ausencia de Na^+ en el medio de perfusión a pH 7.4 produjo la activación de las calpaínas, que no se asoció a la translocación de la m-calpaína a membrana, mientras que la realización de esta maniobra con tampón a pH 6.4 ($-\text{Na}^+$ pH 6.4) o con el inhibidor de calpaínas MDL-28170 (MDL pH 7.4) previno la activación de las calpaínas sin aumentar la m-calpaína en membrana (Figura 24).

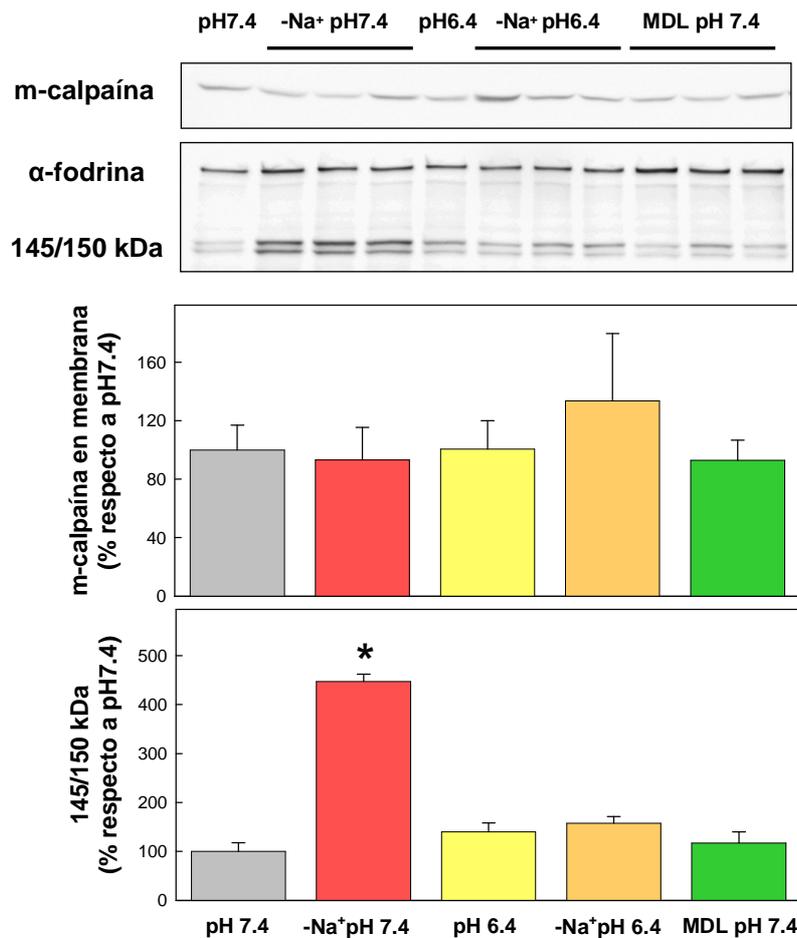


Figura 24. Presencia de m-calpaína en membrana y degradación de α -fodrina en corazones sometidos a distintos protocolos: pH 7.4 (perfusión pH normal), $-\text{Na}^+$ pH 7.4 (perfusión de 15 minutos con tampón sin Na^+ a pH 7.4), pH 6.4 (perfusión de 15 minutos a pH 6.4), $-\text{Na}^+$ pH 6.4 (perfusión de 15 minutos con tampón sin Na^+ a pH 6.4) y MDL pH 7.4 (perfusión de 15 minutos con tampón sin Na^+ , a pH 7.4 y con MDL-28170 10 μM). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * $P < 0.05$ respecto a pH 7.4.

1.6. RELACIÓN ENTRE TRANSLOCACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA m-CALPAÍNA

Los resultados anteriores mostraron que las calpaínas pueden activarse sin que sea patente translocación a membrana, pero aun así, en las condiciones presentes en la isquemia/reperfusión la translocación podría ser necesaria para la activación de las calpaínas y representar una situación de preactivación irreversible. En caso de ser así, las calpaínas perderían interés terapéutico dado que la normalización del pH intracelular durante la reperfusión provocaría su activación y la administración de inhibidores no podría prevenirla. Para comprobar esta posibilidad se diseñaron experimentos con el objetivo de inhibir la translocación de la m-calpaína durante la isquemia y observar el

efecto provocado sobre su activación durante la reperfusión. Con ese fin se administró metil- β -ciclodextrina, un quelante de colesterol, lípido que caracteriza los *lipid rafts* y cuya depleción desestabiliza estos dominios de membrana, los cuales se han propuesto como puntos preferentes de unión de las calpaínas cuando éstas se translocan.

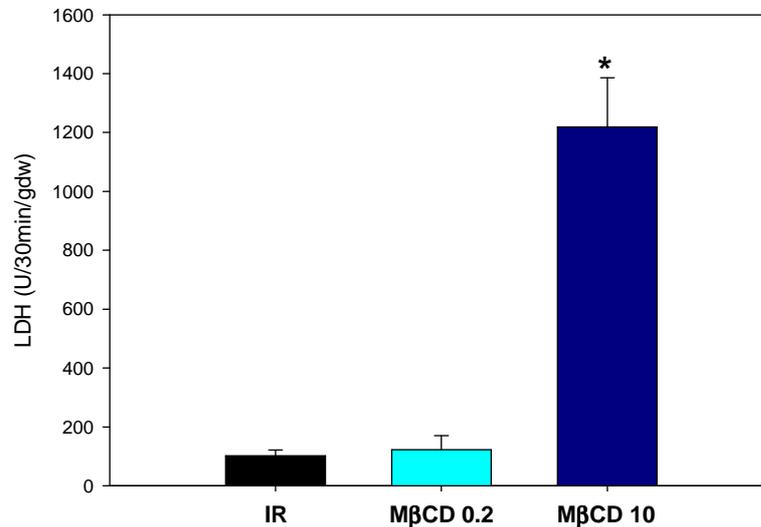


Figura 25. Liberación acumulada de lactato deshidrogenasa (LDH) durante la reperfusión de corazones sometidos a 30 minutos de isquemia y 30 de reperfusión y distribuidos en los grupos: IR (control), M β CD 0.2 (perfusión durante los 5 minutos previos a la isquemia con metil- β -ciclodextrina 0.2 mM) y M β CD 10 (perfusión durante los 5 minutos previos a la isquemia con metil- β -ciclodextrina 10 mM). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a IR.

En corazones de rata sometidos a isquemia sola o seguida de reperfusión se administró metil- β -ciclodextrina antes de iniciar el episodio isquémico a una concentración que no provoca por sí sola un aumento de la muerte celular durante la reperfusión (Figura 25). Con este tratamiento se redujo en un 43% el marcaje de m-calpaína en membrana durante la isquemia, y este efecto no se asoció a una menor activación de las calpaínas durante la reperfusión (Figura 26). Estos resultados demuestran que la translocación a membrana no es necesaria para la activación de las calpaínas en el miocardio reperfundido.

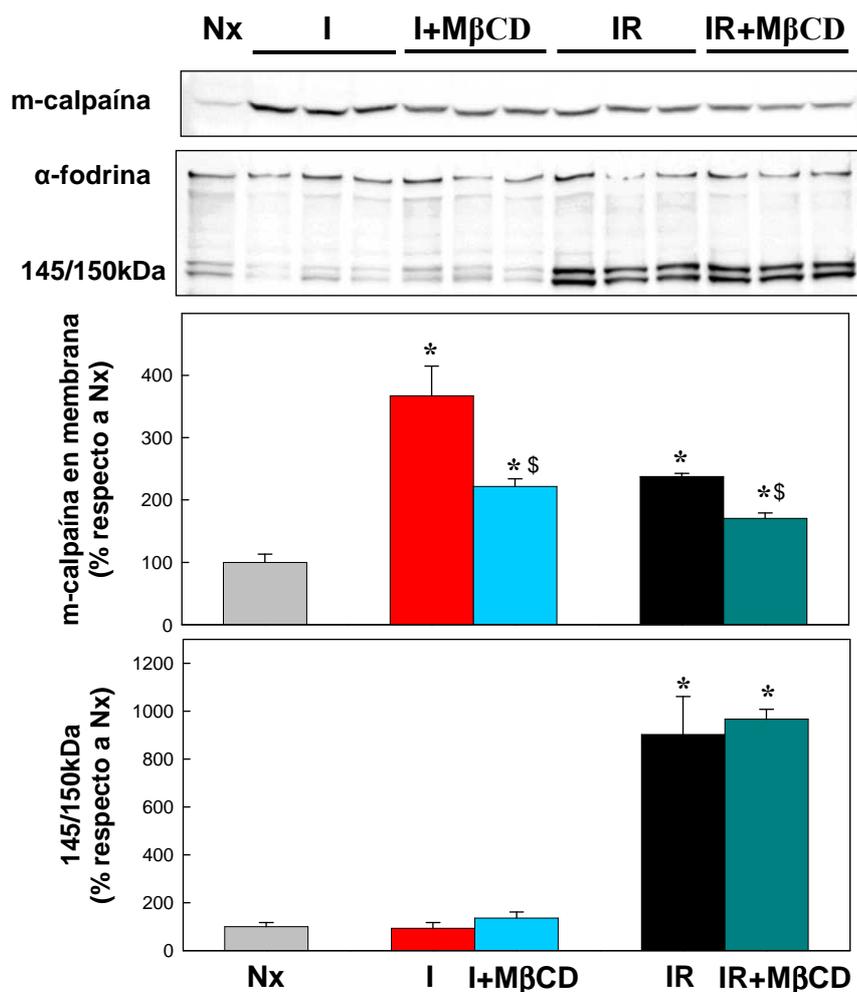


Figura 26. Presencia de m-calpaína en membrana y degradación de α -fodrina en corazones sometidos a distintos protocolos: Nx (perfusión normóxica), I (30 minutos de isquemia), I+M β CD (30 minutos de isquemia precedidos de 5 minutos de perfusión con metil- β -ciclodextrina 0.2 mM), IR (30 minutos de isquemia y 30 de reperfusión) e IR+M β CD (IR precedida de 5 minutos de perfusión con metil- β -ciclodextrina 0.2 mM). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a Nx. § P<0.05 respecto a I (I+M β CD) o IR (IR+M β CD).

1.7. CALPASTATINA EN ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

La calpastatina es el inhibidor endógeno de las calpaínas clásicas y su acción inhibitoria es dependiente de Ca^{2+} , con lo cual puede tener un papel fundamental en la regulación de la actividad de las calpaínas durante la isquemia/reperfusión. Por este motivo se estudió mediante Western blot su expresión en el miocardio en ambos períodos.

La calpastatina se expresa como diversas isoformas según el tejido y la especie, lo que ha generado una falta de unanimidad en cuanto a la forma expresada en corazón de rata (Salamino et al., 1994; Sandmann et al., 2001; French et al., 2006). Para validar los resultados obtenidos con el anticuerpo utilizado en Western blot, se compararon muestras de corazón de rata con otras procedentes de corazón de cerdo, en el cual existe

consenso sobre el tamaño de las isoformas expresadas. Como muestra la figura 27, en el citosol de corazón de rata se observó una banda alrededor de 67 kDa, tanto en la muestra de corazón perfundido normóxicamente como en el sometido a isquemia, mientras que en la muestra de miocardio porcino se observaron dos bandas compatibles con 145 y 135 kDa, las isoformas más observadas por Western blot en corazón de cerdo (Geesink et al., 1998; Parr et al., 2000). En las muestras de membrana, en cambio, no se observó un marcaje significativo (Figura 27).

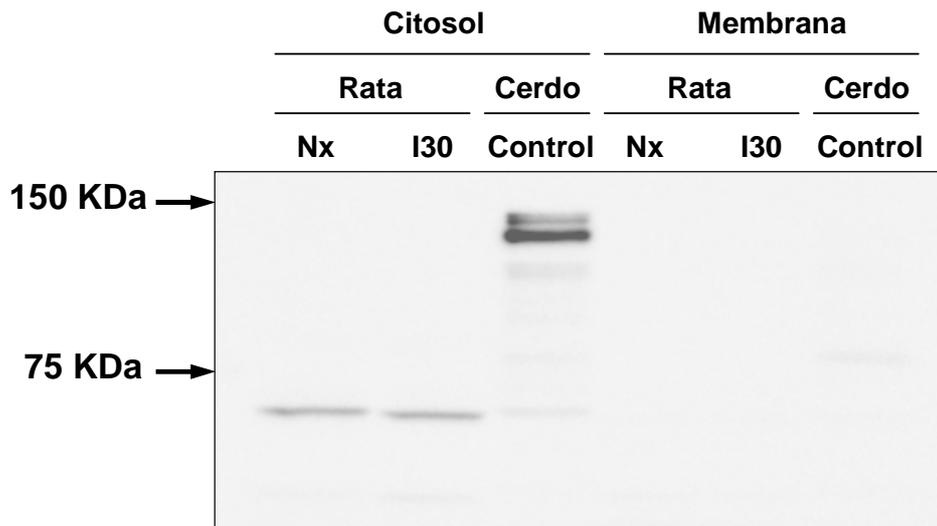


Figura 27. Expresión de calpastatina en citosol y membrana de corazones de rata sometidos a perfusión normóxica (Nx) o 30 minutos de isquemia (I30), o de la región no isquémica de corazón de cerdo sometido a isquemia regional y reperfusión (Control).

Una vez confirmada la especificidad del anticuerpo y la isoforma expresada en corazón de rata, se analizó la expresión de la calpastatina en muestras de citosol de corazones aislados de rata sometidos a distintos períodos de isquemia con o sin reperfusión. Como se ve en la figura 28, la isquemia no afectó a la expresión de calpastatina, mientras que la reperfusión provocó la reducción de sus niveles en citosol. Esta disminución se previno con el inhibidor de calpaínas MDL-28170, confirmando estudios previos en los que se demuestra que la calpastatina se convierte en sustrato de las calpaínas una vez se activan. Estos resultados además confirman que las calpaínas son activadas exclusivamente durante la reperfusión y no durante la isquemia previa.

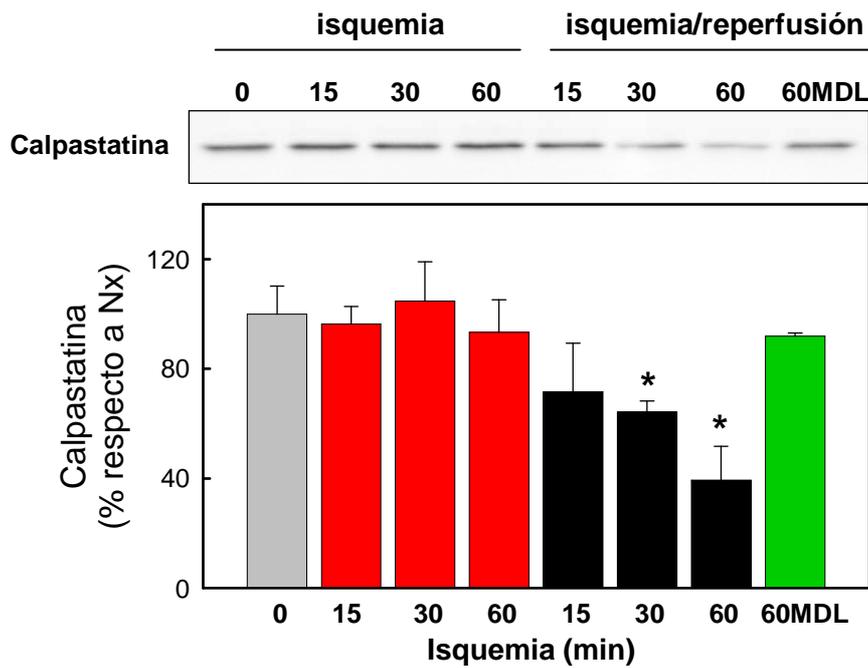


Figura 28. Expresión de calpastatina en citosol de corazones sometidos a períodos de isquemia, sin o con 30 minutos de reperusión: 0 (perfusión normóxica), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 60MDL (60 minutos de isquemia y 30 de reperusión y administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros de la reperusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a 0.

2. CONTRIBUCIÓN DE LAS CALPAÍNAS A LA PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS CATIONICA

La Na^+/K^+ -ATPasa tiene un papel fundamental en la homeostasis del Na^+ y, por tanto, en la del Ca^{2+} . La estabilidad de la bomba en membrana y por tanto su actividad dependen del anclaje de su subunidad α con el citoesqueleto de membrana basado en fodrina. Esta unión no es directa sino que se realiza a través de la anquirina (Jordan et al., 1995). Al ser tanto la anquirina como la fodrina substratos de la actividad catalítica de las calpaínas, su activación durante la reperfusión podría afectar al funcionamiento de la bomba y, por tanto, a la homeostasis del Ca^{2+} .

La importancia de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en el inicio de la reperfusión se estudió mediante la administración de ouabaína, inhibidor específico de la bomba. En corazones sometidos a un daño moderado (30 minutos de isquemia y 30 de reperfusión), la perfusión con ouabaína elevó el pico de hipercontractura, redujo la recuperación funcional (LVdevP) e incrementó la liberación de LDH respecto a los controles (IR) (Figura 29A). La coperfusión con el inhibidor del NCX KB-R7943 previno los efectos deletéreos de la ouabaína (Figura 29A). En ausencia de ouabaína, el KB-R7943 carece de efecto protector, sugiriendo que la función de la bomba está preservada durante la reperfusión de estos corazones (Figura 29A). En cambio, cuando se prolongó la isquemia hasta los 60 minutos la ouabaína no exacerbó el daño producido por el protocolo, mayor que con 30 minutos de isquemia (Figura 29B). Asimismo, la administración de KB-R7943 redujo el daño por reperfusión aun en ausencia de ouabaína, indicando una disfunción de la bomba en los corazones sometidos a 60 minutos de isquemia y 30 de reperfusión (Figura 29B).

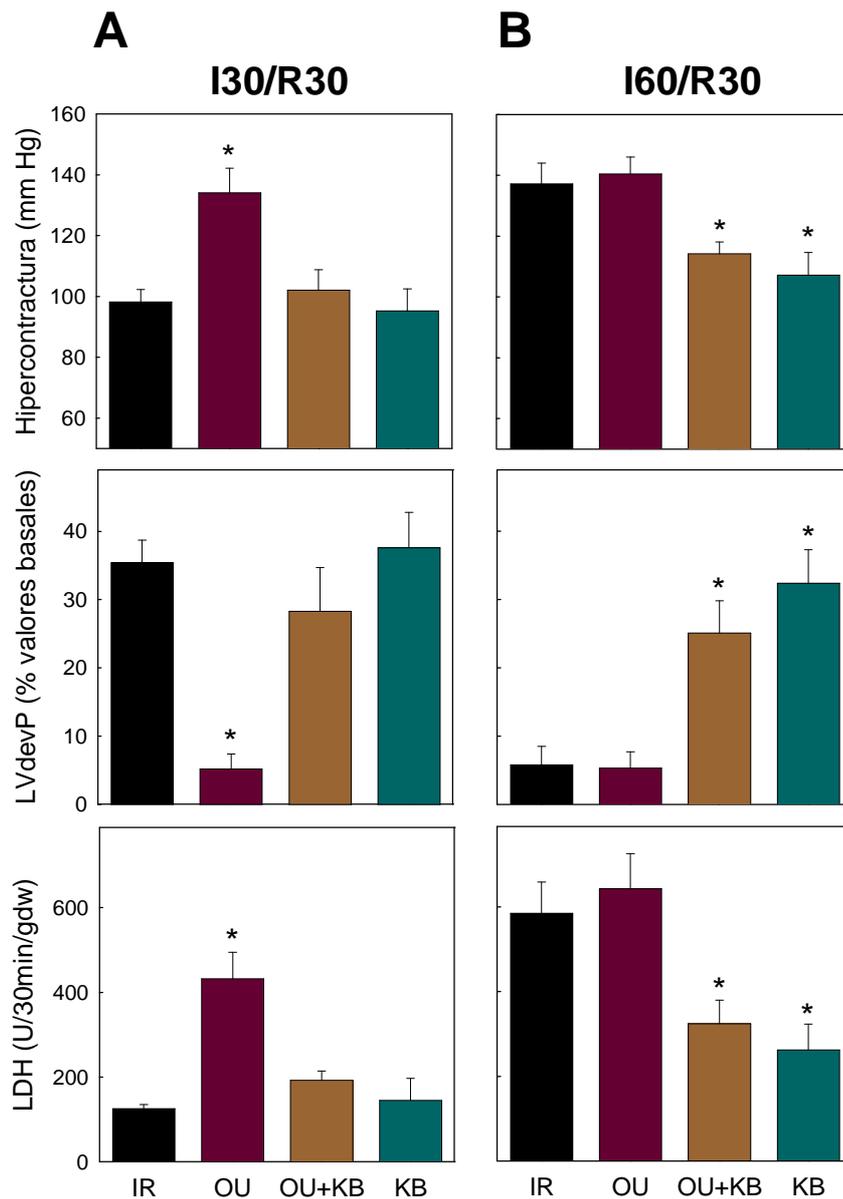


Figura 29. Grado de hipercontractura, recuperación funcional (LVdevP) y liberación acumulada de lactato deshidrogenasa (LDH) en corazones sometidos a isquemia y 30 minutos de reperusión y distribuidos en los grupos: IR (control), OU (perfusión con ouabaina 150 μ M los 10 primeros minutos de reperusión), OU+KB (perfusión con ouabaina 150 μ M y KB-R7943 10 μ M los 10 primeros minutos de reperusión) y KB (perfusión con KB-R7943 10 μ M los 10 primeros minutos de reperusión). A) Isquemia de 30 minutos. B) Isquemia de 60 minutos. Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=6. * P<0.05 respecto a IR.

La disfunción de la Na⁺/K⁺-ATPasa se confirmó mediante análisis bioquímico de su actividad en muestras de membrana de corazones aislados de rata sometidos a 60 minutos de isquemia y 5 de reperusión. El descenso de la actividad de la bomba en el inicio de la reperusión no es consecuencia de la muerte celular, tal y como demuestran los resultados obtenidos con el inhibidor de la contractilidad BDM. La perfusión con este inhibidor durante la reperusión previno el desarrollo de hipercontractura y redujo de

manera significativa la liberación de LDH sin afectar a la actividad Na^+/K^+ -ATPasa (Figura 30).

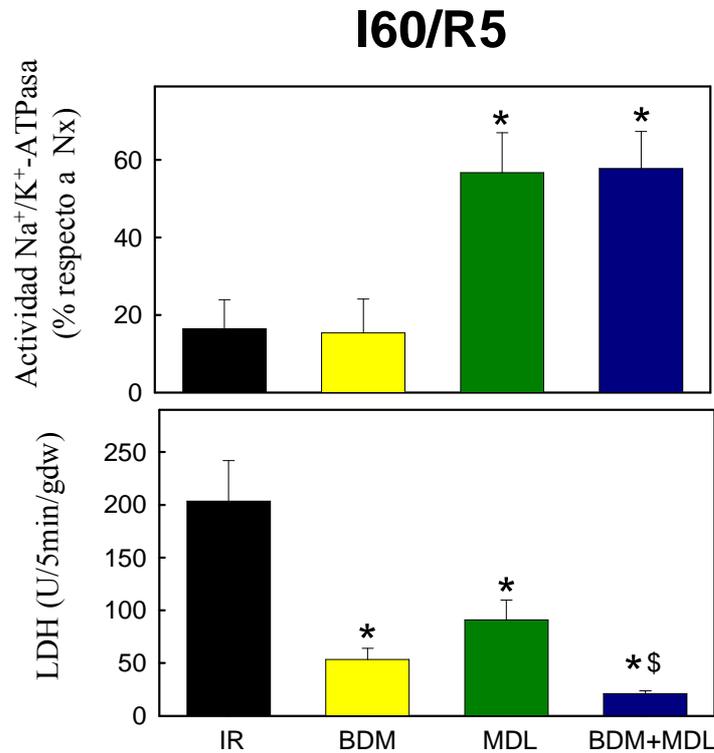


Figura 30. Actividad Na^+/K^+ -ATPasa y liberación acumulada de lactato deshidrogenasa (LDH) en corazones sometidos a 60 minutos de isquemia y 5 de reperfusion y distribuidos en los grupos: IR (control), BDM (perfusión con BDM 20 mM los 5 minutos de reperfusion), MDL (perfusión con MDL-28170 10 μM los 10 minutos previos a la isquemia y los 5 de reperfusion) y BDM+MDL (perfusión con MDL-28170 los 10 minutos previos a la isquemia y con MDL-28170 y BDM los 5 de reperfusion). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=4. * P<0.05 respecto a IR. § P<0.05 respecto a BDM.

La contribución de las calpaínas a la pérdida de actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se estudió con la perfusión de su inhibidor MDL-28170; éste previno de manera significativa la disfunción de la bomba a la vez que redujo la muerte celular (Figura 30).

Por Western blot se observó que tanto la anquirina-B como la α -fodrina fueron degradadas en los corazones sometidos a isquemia y reperfusion, siendo esta degradación dependiente de calpaínas (MDL) e independiente de la muerte celular (BDM) (Figura 31A).

Para estudiar si la degradación del complejo anquirina-fodrina afectó a la asociación de la subunidad α de la bomba con el citoesqueleto de membrana, se obtuvieron fracciones de membrana insoluble y soluble correspondientes a la membrana asociada a citoesqueleto y a la no asociada, respectivamente. El análisis por Western blot de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en estas fracciones mostró un desplazamiento de estas subunidades hacia la fracción soluble de forma paralela a la degradación de α -fodrina y anquirina-B,

RESULTADOS

siendo dependiente de calpaínas e independiente de muerte celular (Figura 31B). Confirmando estudios previos no se detectó la isoforma $\alpha 3$ por Western blot en corazón de rata adulta (datos no mostrados).

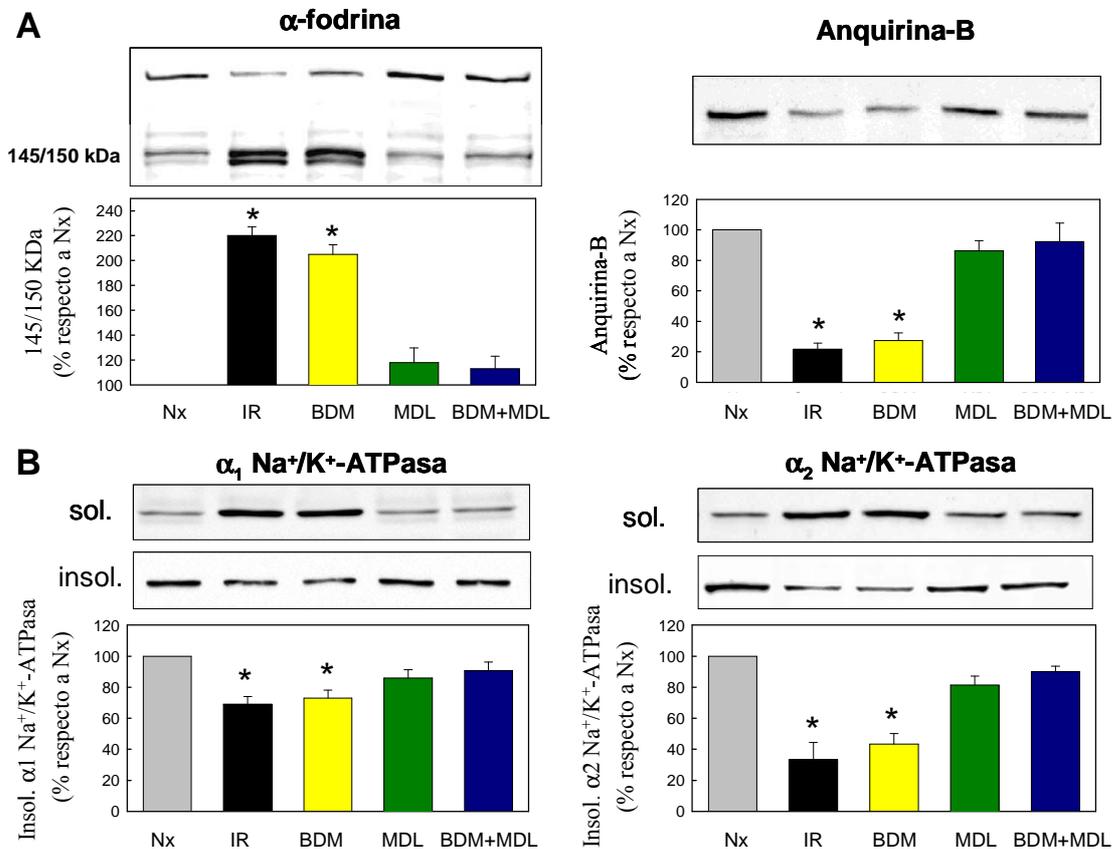


Figura 31. Análisis por Western blot de la anquirina-B y la α -fodrina (fracción de membrana, A) y las subunidades α de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (fracciones soluble e insoluble de membrana, B) en corazones sometidos a perfusión normóxica (Nx) o a 60 minutos de ischemia y 5 de reperusión y distribuidos en los grupos: IR (control), BDM (perfusión con BDM 20 mM los 5 minutos de reperusión), MDL (perfusión con MDL-28170 10 μM los 10 minutos previos a la ischemia y los 5 de reperusión) y BDM+MDL (perfusión con MDL-28170 los 10 minutos previos a la ischemia y con MDL-28170 y BDM los 5 de reperusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=4. * P<0.05 respecto a Nx.

A pesar de no observarse una degradación aparente de las subunidades α de la Na^+/K^+ -ATPasa en el miocardio intacto, los resultados anteriores no descartaron la posibilidad de una acción proteolítica directa de las calpaínas sobre ellas. Por ese motivo se analizó *in vitro* la degradación mediada por m-calpaína recombinante de las proteínas anteriormente estudiadas en muestras procedentes de corazones normóxicos. En la figura 32 se observa que, a pesar de que la degradación tanto de α -fodrina como de anquirina-B es manifiesta a los 5 minutos de incubación, para observar un descenso significativo,

aunque leve, de las subunidades α de la bomba son necesarios 60 minutos de incubación para la $\alpha 1$ o 30 minutos para la $\alpha 2$.

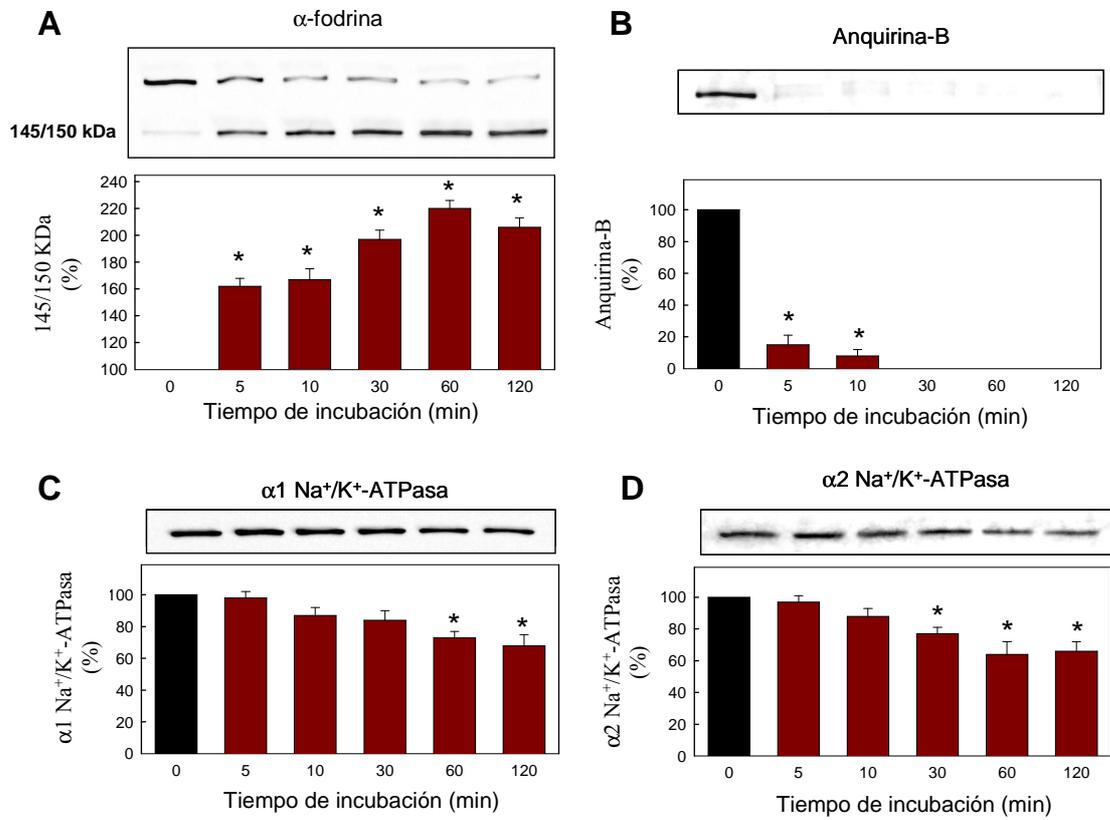


Figura 32. Análisis por Western blot de los cambios en el tiempo del contenido en α -fodrina (A), anquirina-B (B), subunidad $\alpha 1$ de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa (C) y subunidad $\alpha 2$ de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa (D) en tejido miocárdico incubado en presencia de m-calpaína recombinante. Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a 0.

3. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA CARDIOPROTECCIÓN

3.1. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA PROTECCIÓN POR PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El preconditionamiento isquémico (IPC) protege frente a la muerte celular al menos en parte a través de la inhibición de las calpaínas (Inserte et al., 2004). Teniendo en cuenta que la disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa es causada por la actividad proteolítica de las calpaínas, sería razonable esperar que el IPC mejorase la homeostasis del Na^+ y, por tanto, la del Ca^{2+} , preservando la estabilidad de la bomba en membrana de una forma similar a la de la inhibición farmacológica de las calpaínas.

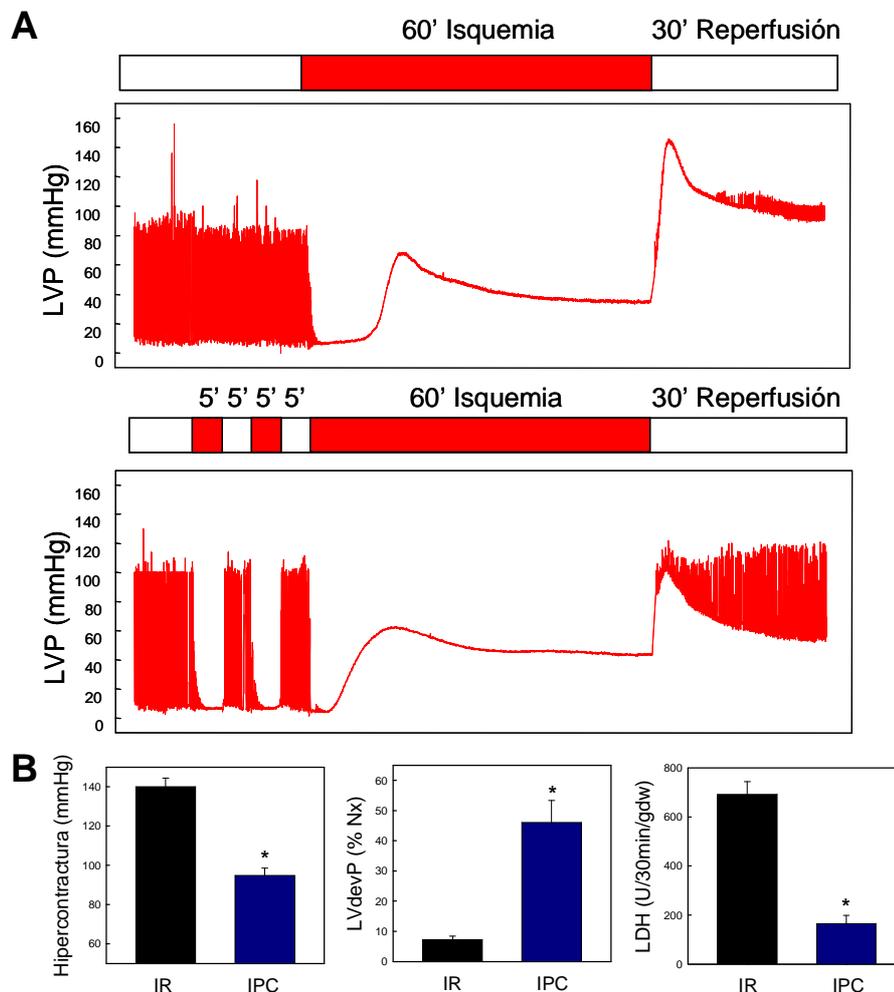


Figura 33. A) Registros de presión del ventrículo izquierdo de corazones sometidos a 60 minutos de isquemia y 30 de reperusión sin (arriba) o con (abajo) preconditionamiento isquémico (2 ciclos de 5 minutos de isquemia y 5 de perfusión inmediatamente antes de la isquemia). B) Grado de hipercontractura, presión desarrollada (LvdevP) y liberación acumulada de lactato deshidrogenasa (LDH) en la reperusión de corazones sometidos a los protocolos detallados en A (IR e IPC, respectivamente). Los datos corresponden a la media±SEM, n=5. * P<0.05 respecto a IR.

La aplicación de un protocolo de preconditionamiento isquémico consistente en 2 ciclos de 5 minutos de isquemia y 5 de perfusión inmediatamente previos a la isquemia (Figura 33A) tuvo un efecto cardioprotector muy potente, reduciendo tanto la hipercontractura como la liberación enzimática y mejorando la presión desarrollada al final de la reperfusión (Figura 33B).

La concentración relativa de Na^+ y la cinética de los cambios en ésta, tanto en la isquemia como durante la reperfusión, fueron medidas mediante espectroscopía por resonancia magnética nuclear (^{23}Na -RMN) en corazones aislados de rata sometidos a isquemia/reperfusión y con BDM, inhibidor de la contracción y protector frente a la muerte celular, presente durante la reperfusión. Durante el episodio isquémico se produjo un aumento constante de la concentración de Na^+ , mientras que con la reperfusión el miocardio inició un proceso de recuperación sin llegar a restablecer la concentración basal de Na^+ (Figura 34A). El IPC no modificó la velocidad del incremento de Na^+ durante la isquemia, pero en cambio durante la reperfusión aceleró notablemente la recuperación de la concentración de Na^+ hasta alcanzar unos niveles equivalentes a los preisquémicos (Figura 34A). La inhibición farmacológica de las calpaínas con MDL-28170 reprodujo los resultados obtenidos con el preconditionamiento, apoyando la hipótesis de que es la inhibición de las calpaínas la que media este efecto del IPC sobre la homeostasis del Na^+ (Figura 34A).

La aceleración de la normalización de la concentración de Na^+ puede deberse tanto a una mayor salida como a una menor entrada del catión en el cardiomiocito. Para determinar el papel de la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa en este mecanismo protector del preconditionamiento isquémico, se midió su actividad en muestras de membrana de corazones preconditionados y sometidos a isquemia/reperfusión. Como muestra la figura 34B, el IPC mejoró la recuperación de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa durante el inicio de la reperfusión, y este efecto fue mimetizado por la inhibición farmacológica de las calpaínas. Estos resultados fueron reproducidos tras la simulación farmacológica del PC mediante la administración transitoria de CPT-cAMP, un análogo del AMPc, antes de la isquemia, mientras que la perfusión con H89, inhibidor de la PKA, durante los ciclos de preconditionamiento, revirtió el efecto de éste sobre la actividad Na^+/K^+ -ATPasa, confirmando el papel de la PKA en el preconditionamiento isquémico descrito con anterioridad (Inserte et al., 2004) (Figura 34B).

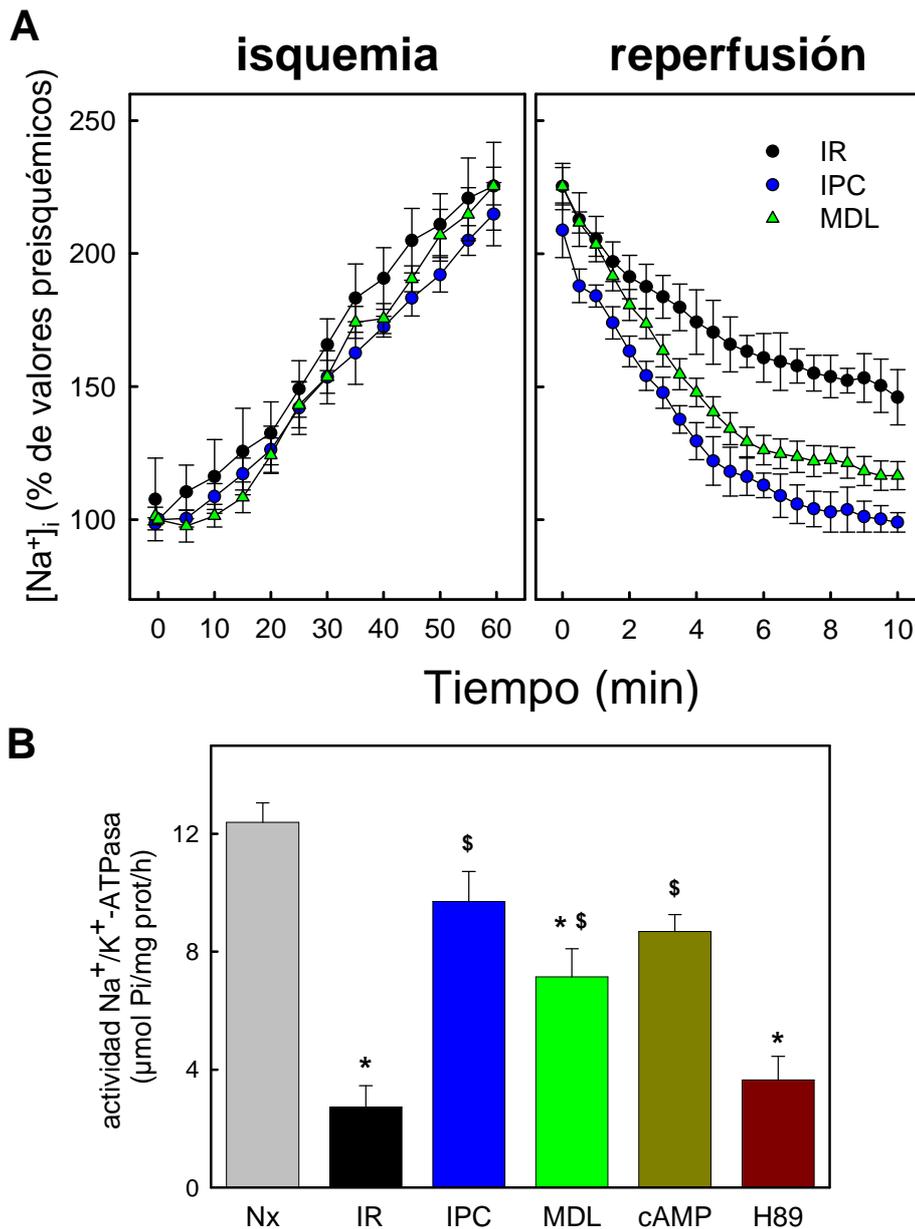


Figura 34. A) Cambios relativos en la concentración intracelular de Na⁺ respecto a los valores preisquémicos durante la isquemia y la reperfusion de corazones sometidos a 60 minutos de isquemia y 10 de reperfusion con BDM 50 mM y sin (IR) o con preconditionamiento isquémico (2 ciclos de 5 minutos de isquemia y 5 de perfusion inmediatamente antes de la isquemia, IPC) o MDL-28170 (perfusion a 10 μM los 10 minutos previos a la isquemia y toda la reperfusion, MDL). B) Actividad Na⁺/K⁺-ATPasa en membrana de corazones sometidos a 60 minutos de isquemia y 5 de reperfusion y los protocolos mencionados en A además del Nx (perfusion normóxica), del de CPT-cAMP (perfusion a 25 μM durante 5 minutos seguidos de 5 minutos de lavado antes de la isquemia, cAMP) y del de H89 (protocolo de preconditionamiento con perfusion de H89 a 10 μM durante 5 minutos antes de cada ciclo). Los datos corresponden a la media±SEM, n=3 (A) n=5 (B). * P<0.05 respecto a Nx. \$ P<0.05 respecto a IR.

Si la preservación de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa por preconditionamiento isquémico es debida a la inhibición de las calpaínas, debería asociarse a una disminución tanto de la proteólisis de α -fodrina y anquirina-B como de la disociación del citoesqueleto por parte de las subunidades α de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa. Por tanto, se analizó en muestras de corazones de los grupos anteriormente estudiados la expresión de estas proteínas. El IPC previno la degradación de α -fodrina y anquirina-B y el aumento de las subunidades α de la bomba en la fracción soluble, efecto que fue mimetizado por el MDL-28170 y el CPT-cAMP, y revertido por el H89 (Figura 35). En conjunto estos resultados indican que la inhibición de las calpaínas es la causa más probable de la preservación de la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa en los corazones preconditionados.

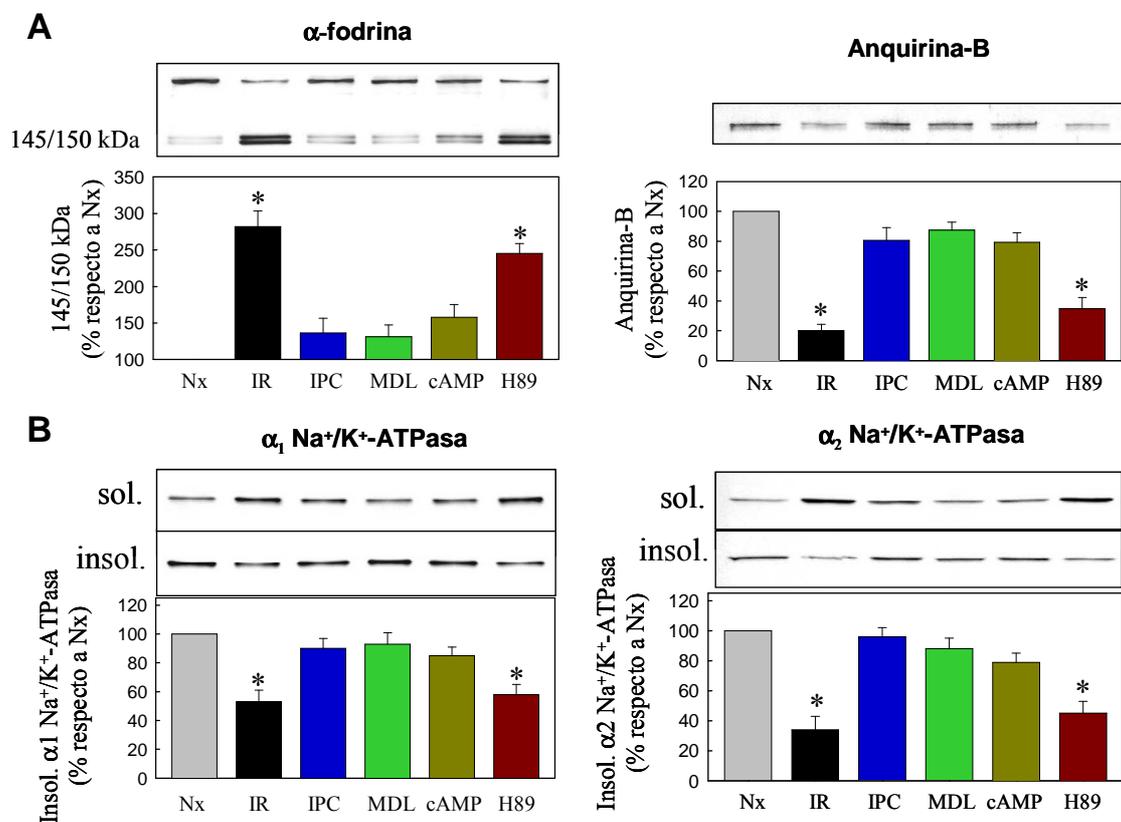


Figura 35. Análisis por Western blot de la anquirina-B y la α -fodrina (fracción de membrana, A) y las subunidades α de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (fracciones soluble e insoluble de membrana, B) en corazones sometidos a perfusión normóxica (Nx) o a 60 minutos de isquemia y 5 de reperfusion distribuidos en los grupos: IR (control), IPC (2 ciclos de 5 minutos de isquemia y 5 de perfusión inmediatamente antes de la isquemia), MDL (perfusión con MDL-28170 a $10 \mu\text{M}$ los 10 minutos previos a la isquemia y toda la reperfusion), cAMP (perfusión con CPT-cAMP a $25 \mu\text{M}$ durante 5 minutos seguidos de 5 minutos de lavado antes de la isquemia) y H89 (protocolo de preconditionamiento con perfusión de H89 a $10 \mu\text{M}$ durante 5 minutos antes de cada ciclo). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=5. * $P < 0.05$ respecto a Nx.

3.2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL POSTCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

A diferencia del IPC, el postcondicionamiento isquémico es una maniobra cardioprotectora realizada en el inicio de la reperfusión consistente en ciclos cortos de isquemia/reperfusión. Se ha sugerido que uno de los posibles efectos que estos ciclos cortos podrían tener sería un retraso en la recuperación de la acidosis intracelular presente durante la isquemia, la cual podría ser beneficiosa mediante diversos mecanismos.

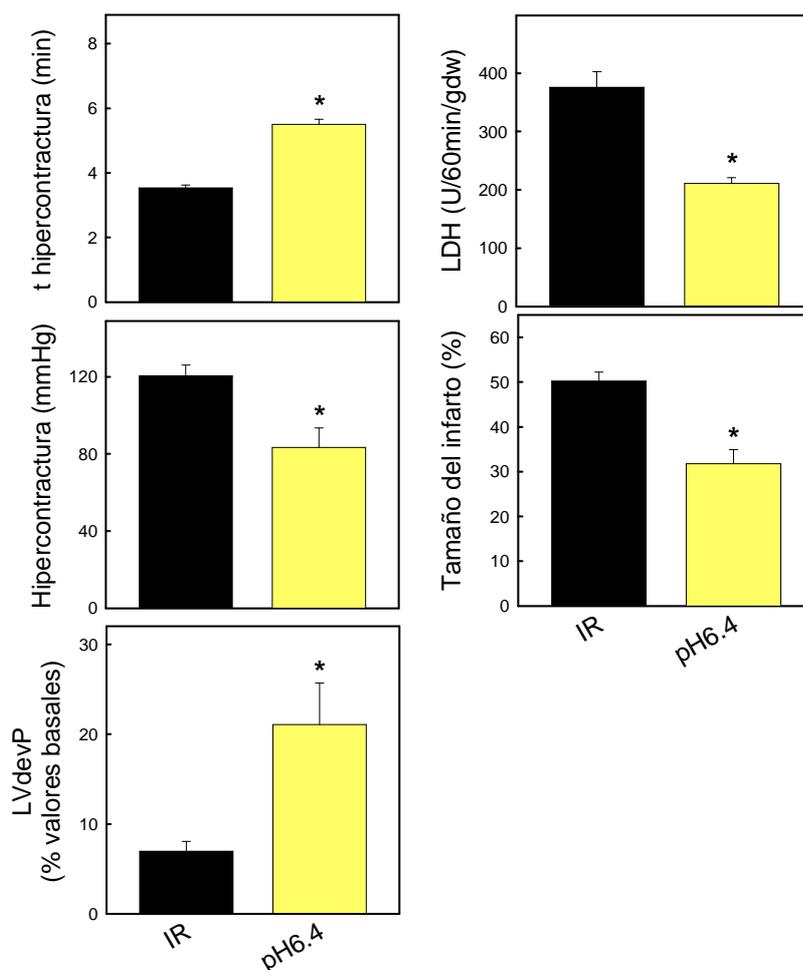


Figura 36. Tiempo para el pico de hipercontractura, grado de hipercontractura, recuperación funcional al final de la reperfusión (LVdevP), liberación acumulada de LDH y tamaño del infarto en corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 60 de reperfusión distribuidos en los grupos: IR (control) y pH6.4 (2 minutos de perfusión ácida a pH 6.4 en el inicio de la reperfusión). Los datos corresponden a la media±SEM, n=6. * P<0.05 respecto a IR.

Con el fin de estudiar esta hipótesis, en primer lugar se analizó el efecto que la prolongación de la acidosis intracelular durante el inicio de la reperfusión tiene sobre la muerte celular. Para ello corazones aislados de rata fueron sometidos a 40 minutos de

isquemia y 60 de reperfusión con 2 minutos de perfusión a pH 6.4 en su inicio. La reperfusión ácida produjo un retraso y una disminución en el desarrollo de hipercontractura, redujo la muerte celular (liberación enzimática y tamaño del infarto) y mejoró la recuperación funcional (LVdevP) de manera significativa (Figura 36).

Se utilizó espectroscopía por resonancia magnética nuclear para estimar el pH intracelular de corazones de rata aislados sometidos a 40 minutos de isquemia y 30 de reperfusión con 2 minutos de reperfusión ácida. Como se observa en la figura 37A, la isquemia produjo una acidificación del medio intracelular cercana a pH 6.4, que fue normalizado rápidamente en el inicio de la reperfusión en todos los grupos. Sin embargo, en los corazones con reperfusión ácida esta recuperación fue retrasada, pasando de 1.50 ± 0.24 min en el control (IR) a 3.47 ± 0.31 min con 2 minutos de reperfusión ácida ($P < 0.05$ respecto al control) (Figura 37B).

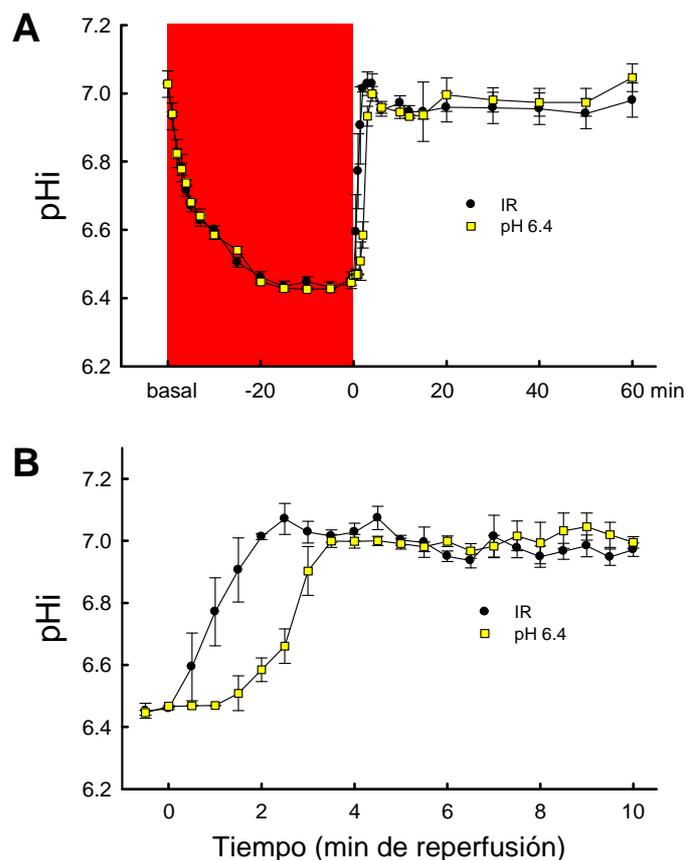


Figura 37. Evolución temporal del pH intracelular de corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 30 de reperfusión (A) y ampliación de los 10 primeros minutos de reperfusión (B) de los grupos: IR (control) y pH 6.4 (2 minutos de perfusión ácida en el inicio de la reperfusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, $n=3$.

RESULTADOS

Confirmada la asociación entre la prolongación de la acidosis intracelular y la protección frente al daño por reperfusión, se estudió el efecto cardioprotector de diversos protocolos de postcondicionamiento y su relación con la capacidad de estos protocolos para retrasar la normalización del pH intracelular.

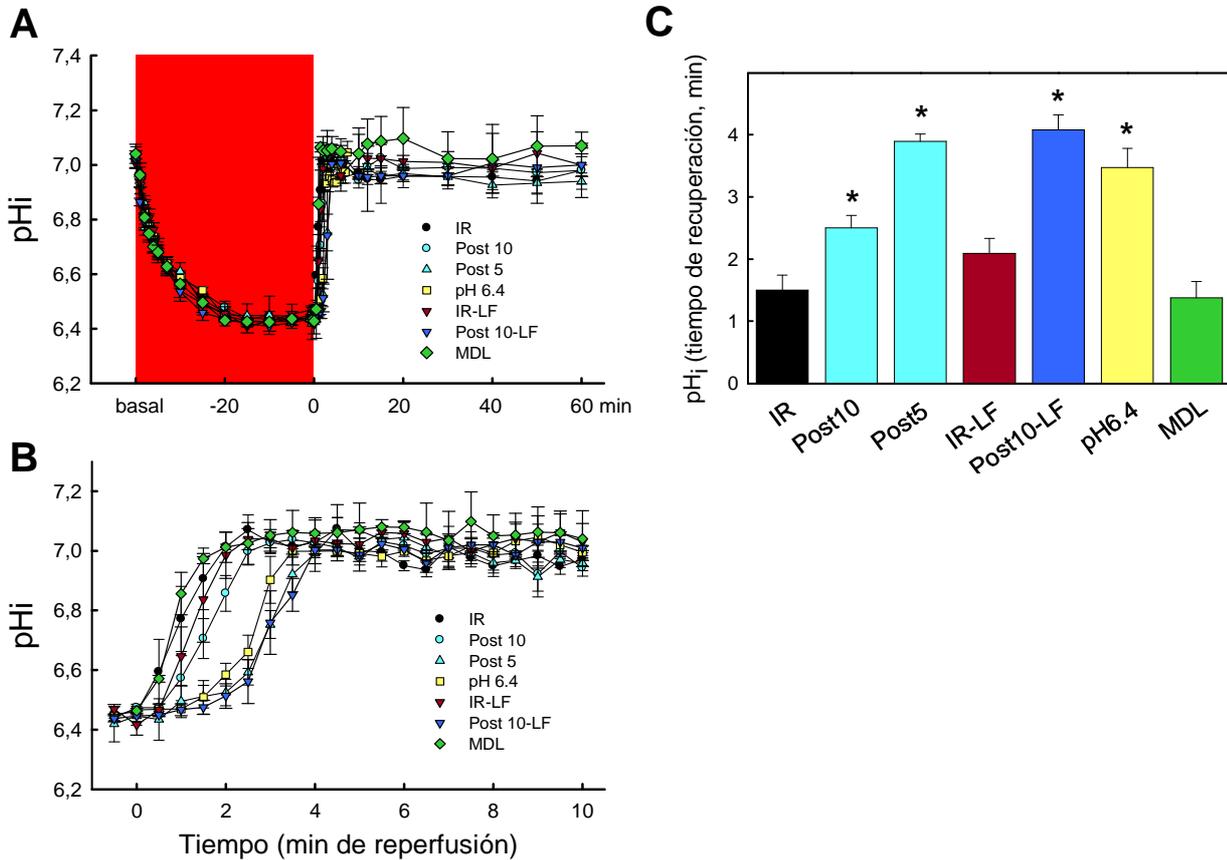


Figura 38. Evolución temporal del pH intracelular de corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 30 de reperfusión (A), ampliación de los 10 primeros minutos de reperfusión (B) y tiempo de recuperación del pH intracelular (C) de los grupos: IR (control), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperfusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperfusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad), pH 6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4) y MDL (administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros de reperfusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a IR.

En los corazones sometidos al protocolo de postcondicionamiento consistente en ciclos de 10 segundos de isquemia seguidos de 10 de reperfusión realizados durante los 2 primeros minutos de la reperfusión (Post10), el retraso en la normalización del pH intracelular medido por resonancia magnética nuclear fue moderado (Figura 38), y la carencia de un efecto marcado se asoció a una tendencia no significativa tanto a la reducción de la muerte celular y la hipercontractura como a una mejor recuperación funcional (Figura 39). Dado el elevado flujo con el que son perfundidos los corazones aislados en el modelo de Langendorff con tampón cristaloide, se analizaron dos protocolos adicionales con el propósito de hacer más lento el lavado del medio extracelular y, por tanto, la normalización del pH intracelular. Estos protocolos consistieron en un caso en la reducción de los ciclos a 5 segundos (Post5) y en el otro en la reducción a la mitad del flujo de los periodos de reperfusión de 10 segundos (Post10-LF); ambos protocolos produjeron un retraso marcado y significativo de la normalización del pH intracelular (Figura 38), y esta prolongación de la acidosis se acompañó de una reducción significativa de la hipercontractura y una mejora de la recuperación funcional, asociadas a una menor muerte celular (Figura 39). Los resultados obtenidos con estos protocolos fueron similares a los de la reperfusión ácida durante 2 minutos (Figuras 38 y 39). La inhibición de las calpaínas también fue protectora (Figura 39), pero no tuvo efecto alguno sobre el pH intracelular durante la reperfusión (Figura 38), descartando un posible efecto de las calpaínas sobre los mecanismos de regulación del pH. Excluyendo el grupo tratado con MDL-28170, el retraso en la normalización del pH intracelular y el tamaño del infarto presentaron una gran correlación ($r^2=0.977$) (Figura 40).

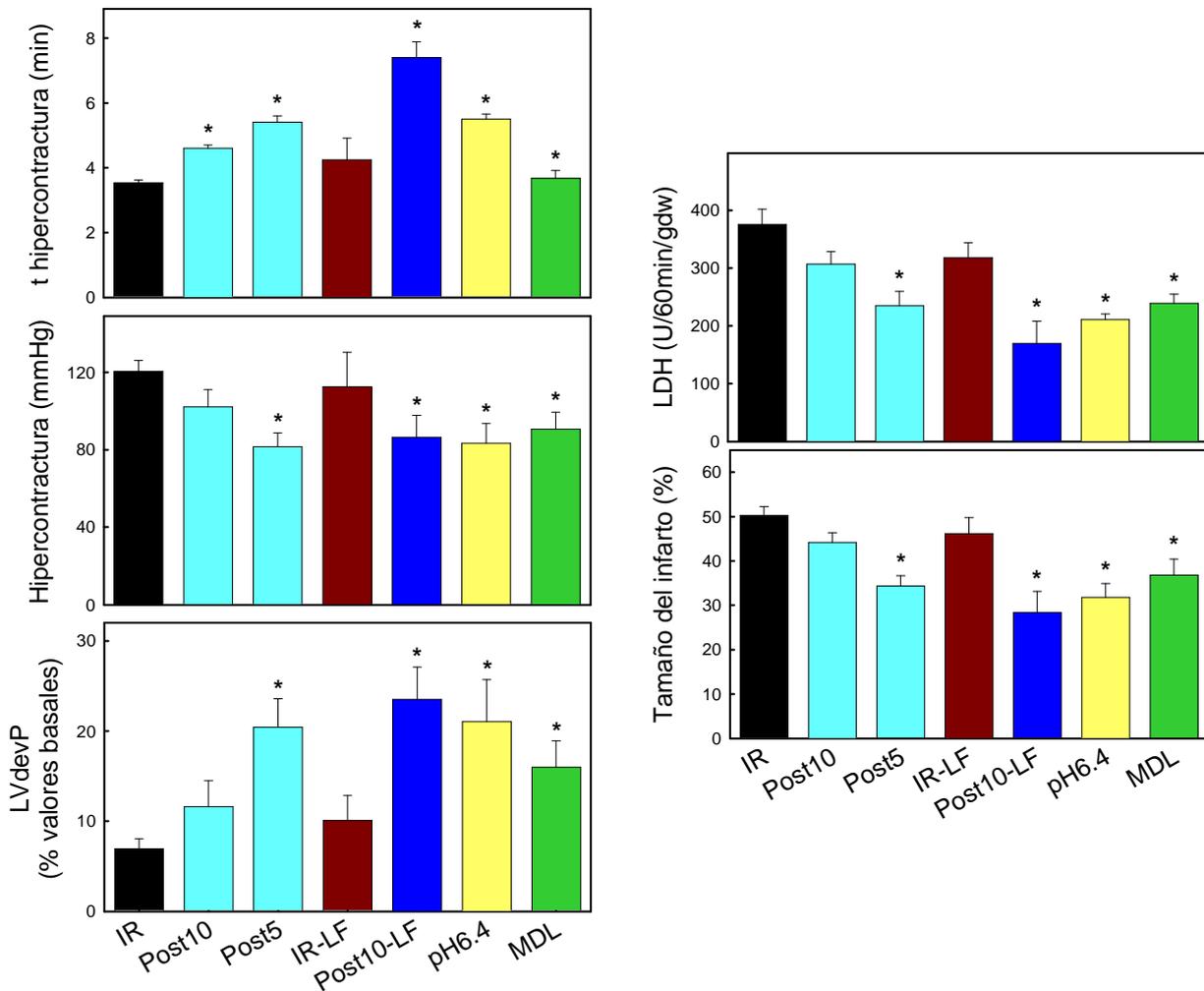


Figura 39. Tiempo para el pico de hipercontractura, grado de hipercontractura, recuperación funcional al final de la reperusión (LVdevP), liberación acumulada de LDH y tamaño del infarto en corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 60 de reperusión distribuidos en los grupos: IR (control), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF 3 (protocolo Post10 con el flujo a la mitad), pH6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4) y MDL (administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros minutos de reperusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=6. * P<0.05 respecto a IR.

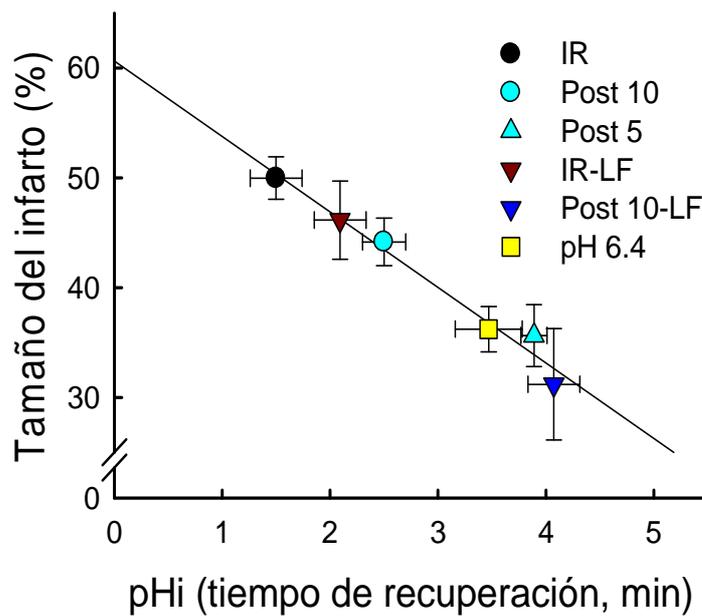


Figura 40. Correlación entre el retraso en la normalización del pH intracelular en la reperusión y el tamaño del infarto en corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 30 o 60 de reperusión y distribuidos en los grupos: IR (control), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad) y pH 6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3 (pHi), n=6 (tamaño del infarto).

Las calpaínas son activas a pH neutro por lo que una prolongación de la acidosis intracelular durante el inicio de la reperusión debería atenuar su actividad en los primeros minutos de la reperusión. Se analizó su actividad mediante Western blot en muestras de membrana de corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 5 de reperusión y los distintos protocolos de reperusión. En la figura 41, se muestra que aquellos protocolos que fueron capaces de retrasar la recuperación del pH intracelular durante los primeros minutos de reperusión y proteger el miocardio también inhibieron la actividad de las calpaínas en el inicio de la reperusión. La actividad de las calpaínas se correlacionó con la liberación enzimática ($r^2=0.789$) y el tamaño del infarto ($r^2=0.867$); estos resultados sugieren que la actividad de estas proteasas es uno de los factores determinantes de la protección otorgada por el postcondicionamiento (Figura 42).

RESULTADOS

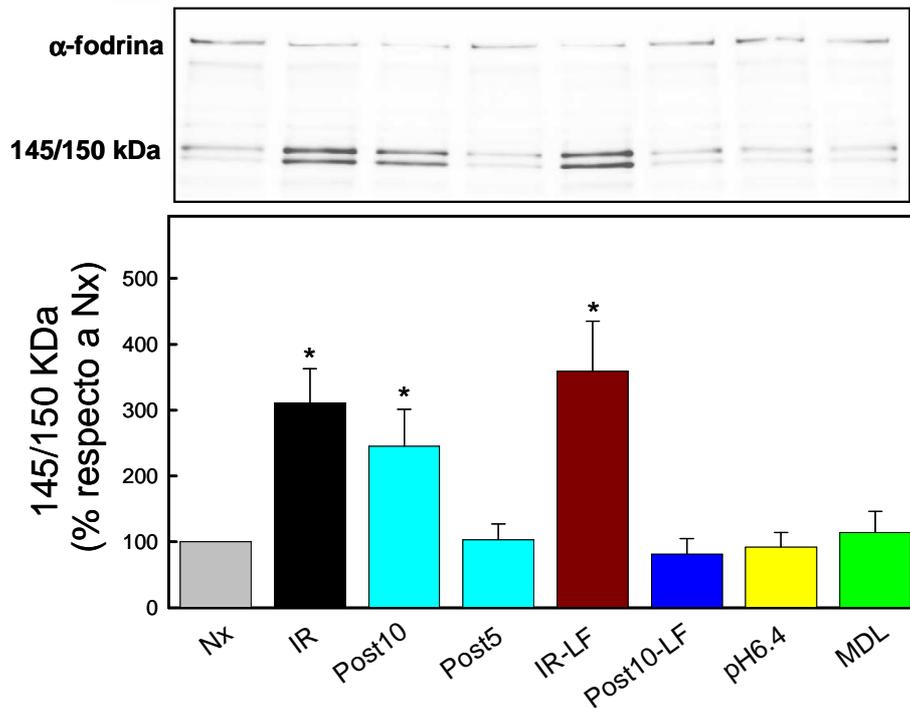


Figura 41. Degradación de α -fodrina en corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 5 de reperusión distribuidos en los grupos: IR (control), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad), pH6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4) y MDL (administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros minutos de reperusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3. * P<0.05 respecto a Nx.

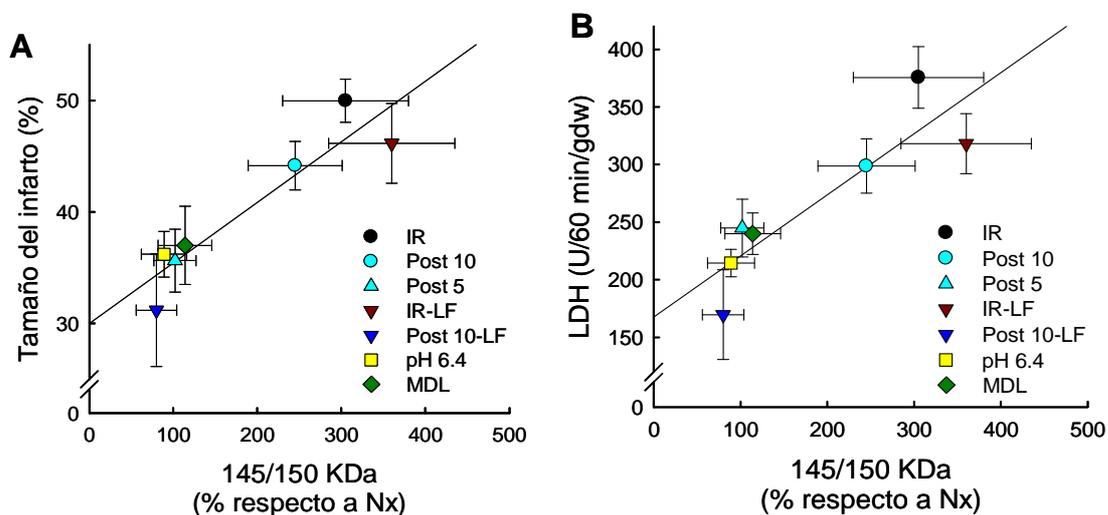


Figura 42. Correlación entre la degradación de α -fodrina (145/150 kDa) y el tamaño del infarto (A) o la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH, B) en corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 5 o 60 de reperusión y distribuidos en los grupos: IR (control), Post10 (6 ciclos de 10 segundos de isquemia y 10 de reperusión), Post5 (12 ciclos de 5 segundos de isquemia y 5 de reperusión), IR-LF (2 minutos de perfusión con el flujo a la mitad), Post10-LF (protocolo Post10 con el flujo a la mitad), pH6.4 (2 minutos de perfusión a pH 6.4) y MDL (administración de MDL-28170 10 μ M los 10 minutos previos a la isquemia y los 10 primeros de reperusión). Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=3 (145/105 kDa), n=6 (LDH y tamaño del infarto).

3.3. CARDIOPROTECCIÓN FARMACOLÓGICA CON EL INHIBIDOR DE LAS CALPAÍNAS

Nuestros resultados indicando que la activación de las calpaínas tiene lugar durante la reperfusión apoyan su posible uso como diana terapéutica en el infarto agudo de miocardio. Para analizar en una situación si es posible inhibir las calpaínas en el inicio de la reperfusión y si esta inhibición puede reducir el tamaño del infarto, se realizó un estudio ciego en un modelo *in vivo* de isquemia/reperfusión miocárdica en rata. Las ratas fueron sometidas a 30 minutos de oclusión de la coronaria descendente anterior izquierda y 120 minutos de reperfusión, y fueron distribuidas en un grupo control con sólo vehículo y un grupo con MDL-28170, administrados sistémicamente durante el final de la isquemia y el inicio de la reperfusión. Los valores de presión arterial sistémica y de frecuencia cardíaca no mostraron diferencias significativas entre grupos, a excepción de una menor frecuencia cardíaca en el grupo tratado con el inhibidor a los 15 minutos de reperfusión, que sólo es tendencia en los otros tiempos (Tabla 1).

Tabla 1. Valores hemodinámicos de las ratas control (IR) o tratadas con MDL-28170 (MDL).

	BASAL		ISQUEMIA				REPERFUSIÓN					
			15 min		25 min		15 min		30 min		120 min	
	IR	MDL	IR	MDL	IR	MDL	IR	MDL	IR	MDL	IR	MDL
FC	267±7	262±7	258±6	261±6	259±5	258±4	251±6	235±3*	258±8	241±5	270±10	251±6
PAM	83±3	85±5	70±3	75±5	76±4	71±3	74±6	71±3	69±1	65±3	63±1	63±2
PS	101±3	100±6	86±3	91±6	91±3	87±4	87±4	89±4	85±3	80±4	79±3	80±4
PD	71±3	71±6	60±2	64±5	66±4	58±3	65±5	60±3	60±1	53±4	55±2	54±3

FC, frecuencia cardíaca (latidos/min); PAM, presión arterial media (mmHg); PS, presión sistólica (mmHg); PD, presión diastólica (mmHg).

Los datos corresponden a la media±SEM (n=9 por grupo). * P<0.05 respecto a IR.

Al finalizar el protocolo se cuantificó histológicamente el tamaño del infarto en los corazones en función del área en riesgo (Figura 43A). Mientras que el área en riesgo en ambos grupos fue similar, descartándose diferencias en cuanto a las características anatómicas de la oclusión, las ratas tratadas con MDL-28170 mostraron menos infarto que las control (IR) (Figura 43B). Este descenso en la muerte celular, aunque moderado, fue significativo y demostró que la inhibición de las calpaínas durante la reperfusión puede prevenir la muerte celular. Con el fin de evaluar el grado de inhibición de las calpaínas alcanzado con el protocolo utilizado, se realizó una nueva serie de experimentos, con las

RESULTADOS

mismas condiciones salvo que la reperfusión se detuvo a los 15 minutos, para analizar por Western blot la degradación de α -fodrina en estos corazones. Como se observa en la figura 43C, los corazones del grupo tratado con MDL-28170 presentaron una menor activación de las calpaínas.

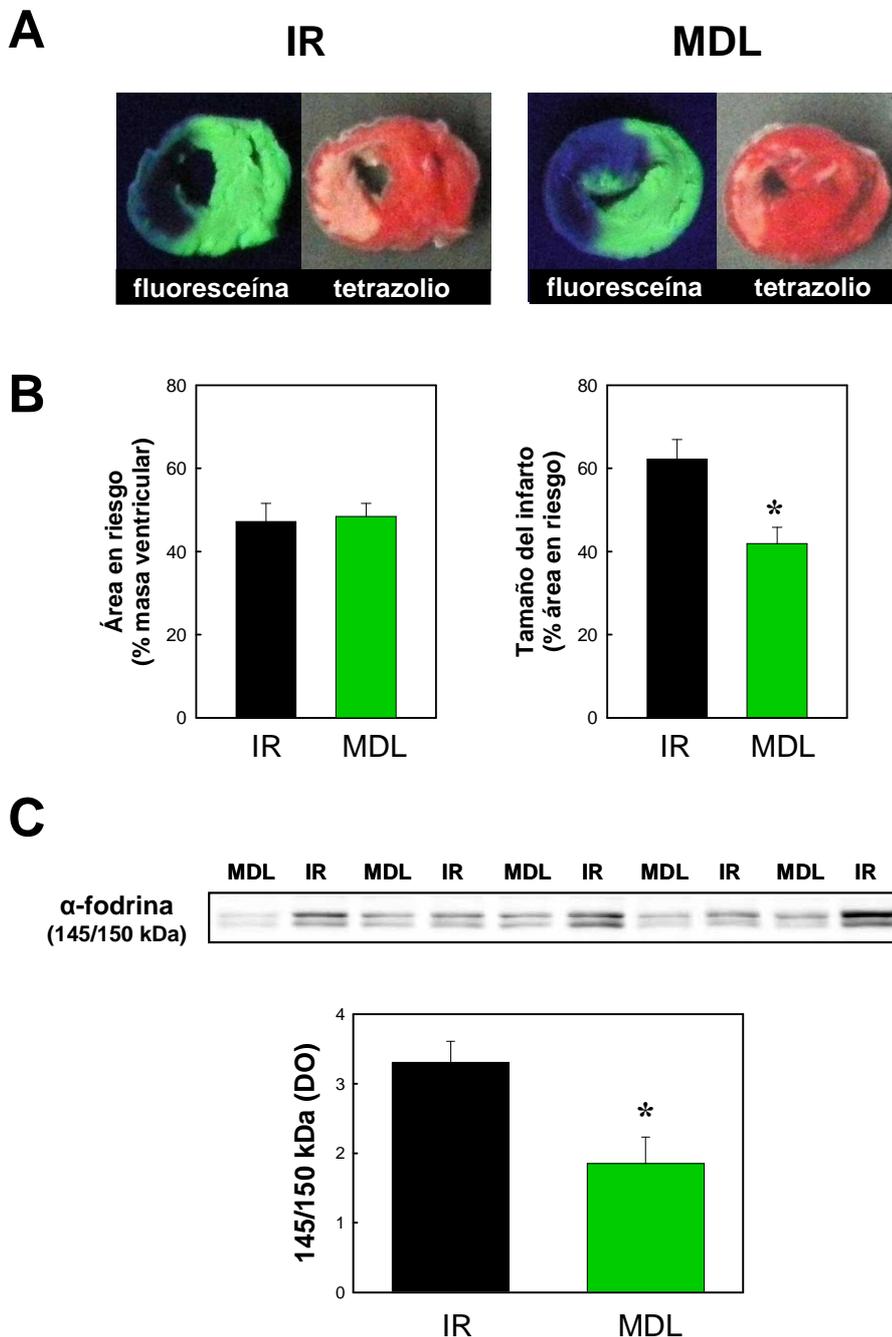


Figura 43. A) Imágenes representativas del área en riesgo (delimitada con fluoresceína) y del tamaño del infarto (delimitado con trifeniltetrazolio) de secciones de corazones de ratas tratadas con vehículo (IR) o con 10 mg/kg de MDL-28170 los últimos 8 minutos de ischemia y los 2 primeros de reperfusión e infusión a 3.3 mg/kg/h los 30 minutos siguientes (MDL). B) Área en riesgo y tamaño del infarto de los grupos IR y MDL. C) Degradación de α -fodrina en los corazones de los grupos IR y MDL. Los datos corresponden a la media \pm SEM, n=9 (tamaño del infarto y área en riesgo), n=5 (145/105 kDa). * P<0.05 respecto a IR.

DISCUSIÓN

1. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS CALPAÍNAS DURANTE LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICAS

1.1. LA ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS CONTRIBUYE DE MANERA RELEVANTE AL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

La constatación de la proteólisis de substratos conocidos de las calpaínas, así como el uso de inhibidores de su actividad en corazones aislados y modelos animales *in vivo* sujetos a isquemia transitoria, han demostrado que la activación de las calpaínas ocurre de manera previa al daño sarcolemal y participa de manera importante tanto en la muerte celular como en la disfunción contráctil inducidas por la reperfusión (Inserte et al., 2004; Khalil et al., 2005; Neuhof et al., 2008). Nuestros resultados confirman en nuestro modelo de corazón aislado y perfundido estas observaciones anteriores y profundizan tanto en la regulación de la actividad de las calpaínas durante la isquemia/reperfusión como en los mecanismos mediante los cuales éstas contribuyen al daño por reperfusión.

1.2. LAS CALPAÍNAS SE ACTIVAN EXCLUSIVAMENTE DURANTE LA REPERFUSIÓN

A pesar de todos los estudios previos que han mostrado la importancia de la actividad de las calpaínas en el daño por isquemia/reperfusión, ninguno de ellos ha definido la cinética de la activación de las calpaínas. Conocer en qué momento se produce la activación de las calpaínas es esencial dado que si éstas se activaran durante la isquemia perderían interés terapéutico debido a la imposibilidad de impedir sus efectos en aquellos pacientes que sufren un infarto agudo de miocardio.

En condiciones patológicas en las cuales la homeostasis del Ca^{2+} no está preservada, como ocurre durante isquemia/reperfusión, la estricta regulación de la actividad de las calpaínas se pierde provocando una sobreactivación. Esta sobrecarga de Ca^{2+} se inicia durante el episodio isquémico, asociada a la depleción energética, y tiene un incremento rápido y transitorio en el inicio de la reperfusión (Ladilov et al., 1999). Sin embargo, la isquemia causa una rápida acidificación intracelular, con unos valores de pH que *in vitro* son capaces de prevenir la activación de las calpaínas en presencia de elevadas concentraciones de Ca^{2+} (Kendall et al., 1993; Zhao et al., 1998). Por tanto, las calpaínas podrían estar inhibidas durante la isquemia a pesar de la sobrecarga de Ca^{2+} . En

dos estudios anteriores, no se observó activación de las calpaínas durante la isquemia. Sin embargo, en ellos la duración de la isquemia fue de tan sólo 20 minutos (Yoshida et al., 1995; Sorimachi et al., 1997); considerando que la pérdida de la homeostasis catiónica coincide con la depleción energética, manifestada como rigor isquémico hacia los 15 minutos de isquemia (Allshire et al., 1987), es posible que isquemias más prolongadas, que alcanzan una concentración intracelular de Ca^{2+} más elevada, puedan activar las calpaínas. Los resultados aquí presentados muestran que las calpaínas no se activan durante la isquemia, aun cuando ésta se prolongue hasta los 90 minutos. En cambio, en los corazones reperfundidos tras tiempos de isquemia superiores a 30 minutos sí se observó activación de las calpaínas, demostrando que la activación tiene lugar durante la reperfusión.

1.3. LA m-CALPAÍNA TRANSLOCA A MEMBRANA DURANTE LA ISQUEMIA

Nuestros resultados demostraron que la m-calpaína transloca a membrana durante la isquemia y que el inicio de esta translocación se correlaciona temporalmente con el desarrollo de rigor isquémico. A pesar de que la translocación a membrana de las calpaínas ha sido considerada como uno de los pasos del proceso de activación de las calpaínas en condiciones fisiológicas (Molinari and Carafoli, 1997), éstas permanecieron inactivas durante la isquemia, poniendo en duda que este modelo de activación de las calpaínas sirva para explicar lo que sucede en situaciones de sobrecarga de Ca^{2+} como sucede durante la isquemia/reperfusión miocárdica. Sin embargo, durante la reperfusión las calpaínas se activaron en un grado proporcional a la duración de la isquemia y a la translocación de la m-calpaína, sugiriendo una relación entre la translocación y la activación. El hecho de que la μ -calpaína no translocara a membrana durante la isquemia y la reperfusión es coherente con estudios que atribuyen a esta calpaína funciones de mantenimiento y que la consideran activa en condiciones fisiológicas, por lo que su regulación sería diferente a la de la m-calpaína (Galvez et al., 2007).

La localización celular de la m-calpaína translocada a membrana podría afectar su especificidad proteolítica. Debido a la utilización para Western blot de muestras de fracción microsomal, que además de membrana plasmática incluye orgánulos como el retículo sarcoplasmático o el aparato de Golgi, podría haber m-calpaína en la membrana externa de estos orgánulos (Hood et al., 2006). La inmunofluorescencia del anticuerpo para la m-calpaína se comparó con la de la α -fodrina en tejido miocárdico de rata; esta proteína como componente del citoesqueleto de membrana marca toda la membrana plasmática.

El marcaje de la m-calpaína mostró un patrón difuso, propio de una proteína citosólica, junto con marcaje de membrana plasmática y bandas regulares coincidentes con los túbulos T marcados con la α -fodrina. Estas bandas en el marcaje contra m-calpaína podrían ser tanto túbulos T como cisternas terminales del retículo sarcoplasmático como discos Z del sarcómero, dado que todas estas estructuras colocalizan en el cardiomiocito (Severs, 2000). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Western blot, el túbulo T (membrana plasmática) o la cisterna terminal son las regiones más probables para la asociación a membrana de la m-calpaína. La presencia de la calpaína en esta zona podría tener consecuencias diversas, como ponerla en presencia de incrementos locales de Ca^{2+} procedente tanto del medio extracelular como del retículo (Hood et al., 2006) o potenciar la degradación de substratos presentes en la zona como proteínas del retículo, de membrana plasmática o del disco Z (Reville et al., 1976; Singh et al., 2004; Walker et al., 2008). No se observaron cambios en la distribución del marcaje de m-calpaína con la isquemia o la reperfusión; sin embargo, se observó una clara tendencia al aumento del marcaje en membrana, lo que apoya los resultados obtenidos por Western blot que indican una translocación de la proteasa durante la isquemia.

1.4. LA ACTIVACIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE LAS CALPAÍNAS ES DEPENDIENTE DE Ca^{2+}

Durante la isquemia existe una multitud de factores que pueden estar modulando la actividad de las calpaínas, como la sobrecarga de Ca^{2+} (Steenbergen et al., 1990; Ladilov et al., 1999), cambios en el estado de fosforilación de las proteínas en el cardiomiocito debidos a que las cinasas carecen de ATP mientras que las fosfatasas permanecen activas (Armstrong et al., 1998), la acidificación del citosol (Allen and Orchard, 1987), etc. Con los resultados obtenidos inhibiendo la actividad reversa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se ha confirmado que el principal de ellos, la entrada de Ca^{2+} citosólico a través del NCX, es responsable tanto de la translocación a membrana como de la activación de las calpaínas. Esta activación no se debió a la entrada masiva de Ca^{2+} causada por la ruptura del sarcolema, dado que ésta se previno con la administración de BDM durante la reperfusión. La BDM es un inhibidor de la actividad ATPasa de la actomiosina que previene la formación de puentes cruzados y provoca una inhibición completa y reversible de la actividad contráctil (Perreault et al., 1992), lo que previene la hipercontractura y la muerte derivada de ésta (Garcia-Dorado et al., 1992a; Schlack et al., 1994).

1.5. LA ACIDOSIS INHIBE LA ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS

Con el fin de analizar si la causa de la ausencia de actividad de las calpaínas durante la isquemia aun en presencia de sobrecarga de Ca^{2+} es la acidosis intracelular del miocardio isquémico, se utilizó un modelo de inducción de entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en ausencia de isquemia (Inserte et al., 2004). Este modelo produce una sobrecarga de Ca^{2+} en ausencia de otros factores presentes durante la isquemia que podrían confundir la interpretación de los resultados. La perfusión a 7.4 provocó degradación de α -fodrina que fue inhibida cuando la entrada de Ca^{2+} se indujo con un medio ajustado a pH 6.4, lo cual confirma los estudios previos realizados *in vitro* (Kendall et al., 1993; Zhao et al., 1998) y apoya la hipótesis de que la acidosis intracelular isquémica es la responsable de la ausencia de actividad de las calpaínas durante la isquemia.

La translocación de las calpaínas a membrana ha sido propuesta como necesaria en el proceso de activación bajo condiciones fisiológicas, en las cuales la concentración citosólica de Ca^{2+} está estrictamente regulada (Molinari and Carafoli, 1997). Sin embargo, la cuestión de la necesidad de la translocación para la activación de las calpaínas en situaciones patológicas en las que existe sobrecarga de Ca^{2+} es controvertida (Ostwald et al., 1994; Liu et al., 2001). En este modelo de entrada de Ca^{2+} sin isquemia, no se observó un aumento de la m-calpaína en membrana en aquellos corazones en los que se activaron las calpaínas.

Estos resultados, junto con los resultados obtenidos previamente en los que la presencia de m-calpaína en membrana era mayor durante la isquemia que durante la reperfusión, sugerían que la translocación a membrana podría ser un paso intermedio en el proceso de activación y que la mayor presencia de la enzima en membrana indicaría un bloqueo en un paso del proceso de activación que sería dependiente de actividad proteolítica. De ser así, la administración terapéutica de inhibidores de calpaínas, aguda y en el inicio de la reperfusión, habría perdido mucha efectividad porque sólo retrasaría el inicio de su actividad hasta el lavado del inhibidor, lo que podría ser insuficiente. Si la presencia de m-calpaína en membrana se debe a un bloqueo en su activación debido a la inhibición de su actividad, tanto la inhibición farmacológica de las calpaínas como el pH ácido deberían aumentar la cantidad de calpaína en membrana cuando se induce una sobrecarga de Ca^{2+} . Sin embargo, no se observó un aumento de la translocación, descartándose así esta hipótesis.

1.6. LA INHIBICIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DE m-CALPAÍNA A MEMBRANA NO REDUCE LA ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS

Nuestro estudio había mostrado translocación durante la isquemia no asociada a actividad, pero coherente con la actividad observada en los corazones reperfundidos. Por tanto, estos resultados sugerían que la translocación a membrana pudiera ser un estado de preactivación de la m-calpaína, pero los experimentos con sobrecarga de Ca^{2+} inducida sin isquemia descartaron esta posibilidad. Aun así, era posible que en las condiciones presentes en isquemia/reperfusión la translocación a membrana de las calpaínas fuera necesaria para su activación. Para comprobarlo se intentó prevenir la translocación de la m-calpaína y observar el efecto en la actividad proteolítica de corazones sometidos a isquemia y reperfusión.

Algunos estudios previos han propuesto que las calpaínas se asocian preferentemente a *lipid rafts* cuando translocan a membrana (Morford et al., 2002; Goudenege et al., 2005; Nuzzi et al., 2007). En nuestro estudio, el uso de metil- β -ciclodextrina para desestabilizar estos dominios ricos en colesterol redujo los niveles de m-calpaína en membrana durante la isquemia. A pesar de ello, la actividad de las calpaínas durante la reperfusión no resultó afectada, confirmando que en presencia de sobrecarga de Ca^{2+} la translocación a membrana no es un paso necesario en su proceso de activación (Spencer and Tidball, 1996; Liu et al., 2001). Aunque estos resultados no descartan que la fracción de m-calpaína translocada a membrana pueda tener un efecto sobre la proteólisis de determinados sustratos, la ausencia de efecto de la inhibición de la translocación, tanto sobre la actividad total como sobre la muerte celular, minimiza la importancia de la translocación de las calpaínas a membrana en el daño miocárdico causado por isquemia/reperfusión.

1.7. LA CALPASTATINA ES DEGRADADA DURANTE LA REPERFUSIÓN

La calpastatina es el inhibidor endógeno de las calpaínas y es expresado en todos los tipos celulares. Sin embargo, la isoforma expresada varía y en el caso del corazón de rata este estudio ha detectado una isoforma con una movilidad similar a la forma expresada en eritrocitos de cerdo (Goll et al., 2003). Aunque el dominio inhibidor está repetido tres veces en la proteína, esta isoforma carece de los dominios XL, L y del dominio inhibidor I y esto puede variar la regulación de su función. Por un lado, se ha implicado al dominio L en la interacción entre calpastatina y calpaínas a concentraciones fisiológicas

de Ca^{2+} (Melloni et al., 2006), por lo que según este trabajo la isoforma detectada en nuestro estudio en el corazón de rata no interactuaría con la calpaína en condiciones basales. Por otro lado, el dominio L también está implicado en la localización de la calpastatina en agregados perinucleares cuando es fosforilada por PKA, por lo que esta vía de control de la interacción calpastatina-calpaína tampoco debería existir en el miocardio de rata (De Tullio et al., 2009).

La calpastatina fue degradada por las calpaínas durante la reperfusión, lo cual confirma que la calpastatina es sustrato de las calpaínas en la reperfusión miocárdica (Sorimachi et al., 1997; Doumit and Koohmaraie, 1999; De Tullio et al., 2000). A pesar de que la calpastatina expresada en corazón de rata tiene repetido tres veces el dominio inhibidor y que su proteólisis podría producir fragmentos que conserven su capacidad para inhibir a las calpaínas (De Tullio et al., 2000; Goll et al., 2003), en los estudios anteriormente citados la proteólisis de la calpastatina se asocia finalmente a un descenso en su actividad inhibitoria (Sorimachi et al., 1997; Doumit and Koohmaraie, 1999; De Tullio et al., 2000). Por consiguiente, la degradación del inhibidor endógeno de las calpaínas debería potenciar su actividad en la reperfusión.

2. CONTRIBUCIÓN DE LAS CALPAÍNAS A LA PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS CATIONICA

Recientemente nuestro grupo ha demostrado en un modelo de corazón aislado de rata sometido a isquemia/reperfusión que la activación de las calpaínas provoca la degradación de proteínas estructurales incluyendo la fodrina y la anquirina, dando lugar a un aumento en la fragilidad del sarcolema, lo que favorece la rotura de éste al coincidir con el estrés mecánico generado por la hipercontractura y el edema celular (Inserte et al., 2004). Dado que la fodrina y la anquirina forman un complejo estructural con la Na^+/K^+ -ATPasa que mantiene la estabilidad de ésta en la membrana (Jordan et al., 1995), en este estudio se planteó la hipótesis de que la actividad de las calpaínas no contribuye únicamente al aumento de la fragilidad sino que también provoca la disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa, impidiendo así la rápida normalización del gradiente de Na^+ y favoreciendo con ello la entrada de Ca^{2+} a través del NCX y en consecuencia el daño por reperfusión.

La entrada de Ca^{2+} a través del NCX contribuye de forma crítica a la muerte de los cardiomiocitos (Inserte et al., 2002), que se produce principalmente durante los primeros minutos de la reperfusión. El modo reverso del NCX depende de la rapidez con la que se reestablece el gradiente transarcolema de Na^+ . Por tanto la magnitud del daño por reperfusión va a depender de lo rápido que se normalice la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

Estudios previos habían descrito una disminución en la actividad de la bomba de Na^+ en corazones aislados de rata sujetos a isquemia/reperfusión (Elmoselhi et al., 2003). Los resultados obtenidos en este estudio confirman la reducción de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa durante los primeros minutos de reperfusión y relaciona su severidad con la duración de la isquemia precedente. En los corazones sujetos a 30 minutos de isquemia, se produce una casi completa recuperación de la Na^+/K^+ -ATPasa en los 5 primeros minutos de reperfusión. Como en otros estudios anteriores (Nawada et al., 1997; Imahashi et al., 2001), en estos corazones la inhibición con ouabaína de la actividad de la bomba de Na^+ durante los primeros minutos de reperfusión aumentó la liberación enzimática y redujo la recuperación funcional. En los corazones reperfundidos tras 60 minutos de isquemia se observó una inhibición severa de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa así como una extensa muerte celular y, en coherencia con estudios previos (Inserte et al., 2002), la inhibición del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ durante los primeros minutos de reperfusión atenuó la muerte celular y mejoró la recuperación funcional. En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la reducción de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa durante los primeros minutos de reperfusión

determina la sobrecarga de Ca^{2+} a través del NCX y a la consiguiente muerte celular en el miocardio reperfundido.

Bajo condiciones de estrés oxidativo se ha observado una alteración en la expresión de las isoformas de la Na^+/K^+ -ATPasa (Ostadal et al., 2003), así como una importante reducción en la abundancia de las isoformas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ y, en menor extensión, $\alpha 1$ en corazones aislados de rata sujetos a isquemia/reperfusión (Elmoselhi et al., 2003), y una disminución significativa en la unión a citoesqueleto de membrana de la subunidad α de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (Aufricht et al., 2002). Sin embargo, ningún estudio previo describe el mecanismo exacto causante de la reducida actividad Na^+/K^+ -ATPasa en el miocardio durante los primeros minutos de la reperfusión. Nuestros resultados concuerdan con los estudios anteriores al demostrar una reducción de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en la fracción de membrana asociada a citoesqueleto. Coincidiendo con otros grupos (Fuller et al., 2003), fuimos incapaces de detectar la isoforma $\alpha 3$ en el corazón adulto de rata por Western blot.

Este estudio también confirma la degradación de α -fodrina y la anquirina-B en el miocardio reperfundido; además, sugiere que la activación de las calpaínas es un evento temprano durante la reperfusión dado que es manifiesta tras sólo 5 minutos. La inhibición de las calpaínas con MDL-28170 previene la degradación de estas proteínas así como la disociación de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ -ATPasa del citoesqueleto en el miocardio reperfundido, y atenúa la reducción en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa, hechos que reafirman la idea de que todos estos fenómenos están relacionados, siendo la activación de las calpaínas la causa de la degradación de las proteínas estructurales, la cual provoca la disociación del citoesqueleto por parte de la bomba y el descenso en su actividad.

Recientemente ha sido demostrada una disminución en la cantidad total de las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ -ATPasa en cardiomiocitos de ratones heterocigotos para una mutación deletérea en la anquirina-B, con un 50% de reducción en la cantidad de anquirina medida por Western blot (Mohler et al., 2003). Nuestros resultados subrayan la importancia de la asociación de la Na^+/K^+ -ATPasa con el complejo anquirina-fodrina y se pueden explicar por la pérdida mediada por calpaínas del complejo citoesqueleto-membrana en la interfaz anquirina-fodrina. Sin embargo, también podrían explicarse como consecuencia de una actividad proteolítica de las calpaínas sobre las subunidades de la Na^+/K^+ -ATPasa. De hecho, cuando las secuencias aminoacídicas de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ -ATPasa fueron sometidas a un análisis de búsqueda de PEST (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind>) se identificaron tres posibles

regiones PEST (Pro, Glu(Asp), y una región Ser/Thr) para $\alpha 1$ y dos regiones PEST para $\alpha 2$ como potenciales lugares para la lisis mediada por calpaínas.

Experimentos realizados *in vitro* exponiendo la fracción particulada a m-calpaína recombinante mostró una degradación parcial de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ tras 30 minutos de incubación. Sin embargo, por varias razones parece improbable un papel prominente de la proteólisis directa mediada por calpaína en la pérdida de las subunidades α de la Na^+/K^+ -ATPasa. Primero, nuestros resultados indican que durante la reperfusión ocurre una redistribución de la Na^+/K^+ -ATPasa sin proteólisis aparente. Segundo, la α -fodrina y la anquirina-B son degradadas en paralelo con la disminución de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en la fracción insoluble a Tritón y de forma pronunciada a los 5 minutos de reperfusión. Tercero, en experimentos *in vitro*, la proteólisis de anquirina-B a los 5 minutos de incubación con calpaína era más pronunciada que aquella observada en corazones reperfundidos, mientras que la pérdida de las bandas correspondientes a las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ no era significativa a los 30 minutos de incubación *in vitro*.

Dado que la inhibición de las calpaínas está asociada a una reducción en la muerte celular, existe la posibilidad de que la preservación de la Na^+/K^+ -ATPasa observada en los corazones tratados con inhibidores de calpaínas se deba a un aumento en la supervivencia de los cardiomiocitos en lugar de ser su causa. Con el fin de descartar esta posibilidad, se analizó la disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa durante los inicios de la reperfusión en presencia de BDM. Los corazones reperfundidos durante 5 minutos en presencia de BDM, en los cuales la liberación de LDH estaba marcadamente reducida, mostraron una activación de las calpaínas, una actividad Na^+/K^+ -ATPasa y una distribución de las subunidades α de la Na^+/K^+ -ATPasa similares a aquellas observadas en ausencia de BDM, indicando que el fenómeno no es consecuencia de la muerte celular, sino que la precede.

En conjunto, estos resultados demuestran que la activación de las calpaínas, inducida por la elevación de los niveles de Ca^{2+} citosólico en los primeros minutos de reperfusión, no sólo contribuye a un incremento de la fragilidad celular (Inserte et al., 2004) sino que también causaría una reducción en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa que conduciría a una mayor elevación del Ca^{2+} citosólico, cerrando así un círculo vicioso que puede llevar a la muerte del cardiomiocito (Figura 44).

3. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA CARDIOPROTECCIÓN

3.1. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO PRESERVA LA ACTIVIDAD Na^+/K^+ -ATPASA EN EL INICIO DE LA REPERFUSIÓN MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LAS CALPAÍNAS

El preconditionamiento isquémico es una maniobra que desencadena un proceso endógeno de cardioprotección muy potente. Sin embargo, a pesar de los múltiples mecanismos propuestos para explicar su efecto protector todavía no se conocen con exactitud sus efectores finales. Se ha propuesto que el IPC podría atenuar los niveles de Na^+ citosólico durante la isquemia/reperfusión. En contraste con la ausencia de un efecto claro sobre la acumulación de Na^+ durante la isquemia (Ramasamy et al., 1995; Liu et al., 1998; Lundmark et al., 1999; Imahashi et al., 2001; Babsky et al., 2002), hay evidencias sólidas que demuestran que el preconditionamiento isquémico acelera la recuperación de la concentración citosólica de Na^+ en el inicio de la reperfusión (Ramasamy et al., 1995; Lundmark et al., 1999; Imahashi et al., 2001; Babsky et al., 2002).

Los resultados de este estudio, en los que se ha determinado en corazones de rata aislados la concentración de Na^+ por ^{23}Na -RMN, corroboran la visión mayoritaria según la cual el preconditionamiento isquémico no afecta a la acumulación de Na^+ durante la isquemia, pero mejora la recuperación de los niveles basales de Na^+ en el inicio de la reperfusión. Estas diferencias en la recuperación no fueron debidas a diferencias en el grado de muerte celular dado que se previno la ruptura del sarcolema con BDM. Por tanto, nuestros resultados apoyan aquellos estudios que afirman que los mecanismos de protección del preconditionamiento isquémico son distintos a los obtenidos con el uso de inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ , cuyo principal efecto es la reducción de la sobrecarga de Na^+ (Mosca and Cingolani, 2000; Ruiz-Meana et al., 2003). Teniendo en cuenta que la reactivación de la Na^+/K^+ -ATPasa en la reperfusión es el principal mecanismo que la célula posee para normalizar los niveles de Na^+ intracelular acumulado durante la isquemia y el inicio de la reperfusión (Van Emous et al., 1998), los resultados obtenidos por RMN indican que el IPC tendría un efecto beneficioso sobre la reactivación de la bomba de Na^+ .

Como habíamos mostrado anteriormente, existe una relación directa entre la recuperación de la Na^+/K^+ -ATPasa y la extensión del daño por reperfusión. Los resultados presentados en esta tesis muestran que la mejor recuperación de los niveles de Na^+ intra-

celular en los corazones preconditionados coincidía con una mayor actividad Na^+/K^+ -ATPasa durante los primeros minutos de la reperfusión, algo que había sido descrito en otros estudios en corazón (Lundmark et al., 1999; Elmoselhi et al., 2003; Yorozya et al., 2004) y otros tejidos (Aufricht et al., 2002); no obstante, estos estudios no descartaron la muerte celular como posible factor inhibidor de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa y sólo el trabajo de Lundmark et al. estudió la actividad de la bomba en los primeros minutos de la reperfusión, fase crítica para el desarrollo de hipercontractura y, por tanto, la muerte celular. Tampoco estos estudios previos habían descrito el mecanismo mediante el cual el preconditionamiento isquémico preserva la función de la bomba. Dado que un estudio previo de nuestro grupo había demostrado que el preconditionamiento isquémico inhibe a las calpaínas (Inserte et al., 2004), y los resultados presentados en esta tesis demuestran que las calpaínas median la estabilidad de la Na^+/K^+ -ATPasa en la membrana y su correcto funcionamiento, se planteó la hipótesis de que el preconditionamiento podría estar protegiendo la función de la Na^+/K^+ -ATPasa a través de su inhibición de las calpaínas. El análisis de la α -fodrina y la anquirina-B y de las subunidades α de la bomba en corazones preconditionados mostró una preservación de la asociación de la bomba con el citoesqueleto de membrana, efecto que se asoció a un descenso marcado de la actividad de las calpaínas. La inhibición farmacológica de estas proteasas, y la simulación farmacológica del PC mediante la activación transitoria de la PKA con CPT-cAMP (Inserte et al., 2004), reprodujeron el efecto del preconditionamiento isquémico sobre la cinética de recuperación de la concentración de Na^+ citosólico, mientras que la inhibición del IPC con H89 revirtió su efecto sobre la cinética del Na^+ . Estos resultados apuntan al importante papel que la inhibición de las calpaínas tiene en la preservación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa por parte del preconditionamiento isquémico.

3.2. EL POSTCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO RETRASA LA NORMALIZACIÓN DEL pH INTRACELULAR E INHIBE LAS CALPAÍNAS EN EL INICIO DE LA REPERFUSIÓN

Se ha sugerido que la prolongación de la acidosis durante la reperfusión es determinante para los efectos protectores del postcondicionamiento isquémico (García-Dorado and Piper, 2006; Cohen et al., 2007; Fujita et al., 2007). Sin embargo, las evidencias disponibles del papel del retraso en la recuperación del pH intracelular en la protección por postcondicionamiento eran indirectas, y el mecanismo de protección por acidosis desconocido. En este trabajo se analiza por primera vez la evolución temporal

del pH intracelular durante el postcondicionamiento y la relación entre el retraso en la recuperación del pH intracelular y la efectividad de la cardioprotección.

Con este fin en primer lugar se estudió el efecto protector de la prolongación de la acidosis intracelular mediante la reperfusión a pH ácido durante los 2 minutos iniciales de la reperfusión. La perfusión a pH ácido inhibe la expulsión de H^+ a través del NHE, lo que previene la neutralización del pH intracelular (Bers et al., 2003). Los resultados por ^{31}P -RMN en corazones aislados de rata confirmaron el retraso en la normalización del pH intracelular. Este retraso fue acompañado de una mejor recuperación funcional y una atenuación de la hipercontractura y la muerte celular. La reperfusión ácida puede inhibir la hipercontractura a través de varios mecanismos. Por un lado, la acidosis inhibe la contractilidad al reducir la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} (Orchard and Kentish, 1990) y previene el desarrollo de hipercontractura en el inicio de la reperfusión cuando la homeostasis del Ca^{2+} aún no ha sido recuperada (Kaplan et al., 1995; Preckel et al., 1998; Schafer et al., 2000; Piper et al., 2004). La acidosis puede inhibir al NHE y atenuar la entrada de Na^+ , así como reducir la entrada de Ca^{2+} al citosol inhibiendo una corriente de entrada (Irisawa and Sato, 1986) o la liberación desde el retículo sarcoplasmático (Fabiato and Fabiato, 1978). Estos efectos sobre la homeostasis del Ca^{2+} fueron demostrados por un estudio en el que la reperfusión ácida transitoria redujo la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} (Panagiotopoulos et al., 1990). Otro posible mecanismo es la inhibición de la apertura del mPTP en el inicio de la reperfusión, causada por los ROS y la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} (Halestrap et al., 2004). Finalmente, hemos demostrado en este estudio que la acidosis en condiciones de sobrecarga de Ca^{2+} puede inhibir directamente la actividad de las calpaínas y ejercer parte de su efecto protector a través de este mecanismo; además, no se puede descartar que la inhibición de la entrada de Ca^{2+} también contribuya a reducir la activación de las calpaínas.

El estudio de la capacidad del postcondicionamiento isquémico para retrasar la normalización del pH intracelular y proteger el miocardio se realizó con tres protocolos de postcondicionamiento, en los cuales se utilizaron diferentes velocidades de flujo y diferentes duraciones de los ciclos de isquemia. Un protocolo comunmente utilizado, que consistía en 6 ciclos de 10 segundos, retrasó la normalización del pH intracelular en sólo 1 minuto con respecto al control y no protegió al corazón, a pesar de una tendencia hacia la reducción de la muerte; estos resultados concordaban con un estudio previo que utilizó el mismo protocolo (Kaljusto et al., 2006). En cambio, aquellos protocolos que retrasaron la recuperación del pH intracelular más de 2 minutos fueron protectores, lo que demuestra el papel crítico que la prolongación de la acidosis intracelular tiene en la protección

por postcondicionamiento. Estudios previos habían propuesto que la duración de los ciclos de isquemia/reperfusión de un protocolo de postcondicionamiento debían ser más breves en modelos perfundidos en tampón cristaloide debido al flujo coronario utilizado, mucho mayor que en modelos *in vivo*; el flujo más veloz normaliza el pH del medio extracelular más deprisa produciendo una recuperación del pH intracelular más rápida (Cohen et al., 2007). La cardioprotección obtenida con el protocolo de 6 ciclos de 10 segundos cuando estos ciclos de perfusión se realizaron con el flujo reducido a la mitad reafirma esta hipótesis.

La cardioprotección obtenida con los distintos protocolos se correlacionó con el grado de inhibición de las calpaínas, sugiriendo que el efecto protector de la prolongación de la acidosis intracelular causada por el postcondicionamiento está mediado por la inhibición de las calpaínas. La inhibición de estas proteasas tiene diversos efectos beneficiosos, entre los que destacan la reducción de la fragilidad sarcolemal (Inserte et al., 2004) y la preservación de la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, descrita en este trabajo (Figura 44). Por otro lado, la constatación de que una maniobra realizada en el inicio de la reperfusión es capaz de inhibir a las calpaínas confirma que estas proteasas pueden ser una diana terapéutica, aunque la inmediatez de su activación podría restar efectividad a sus inhibidores.

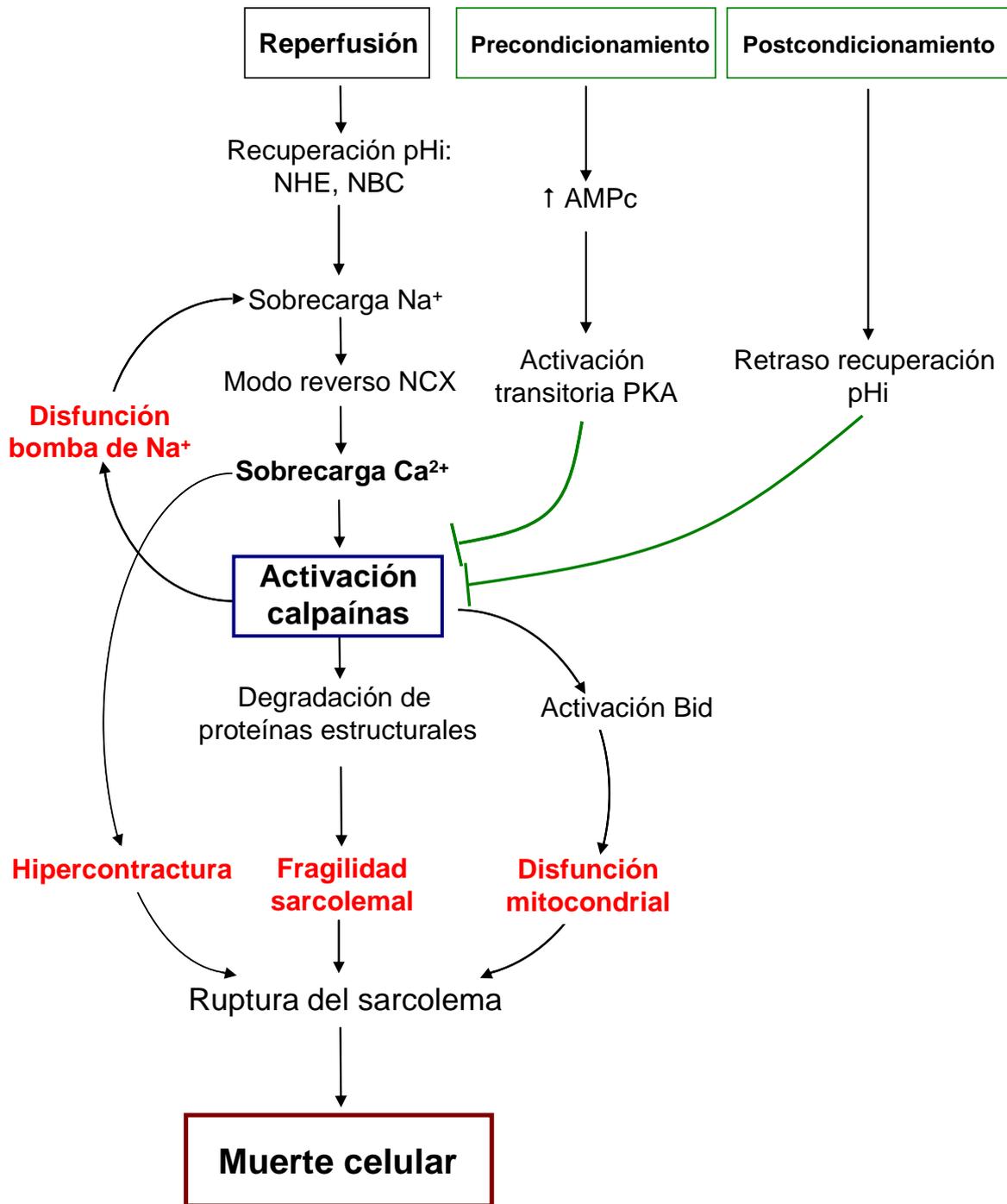


Figura 44. Mecanismos a través de los cuales la activación de las calpaínas puede contribuir al daño por reperusión en el miocardio, así como aquellos a través de los cuales los mecanismos endógenos de cardioprotección pueden inhibir las calpaínas.

3.3. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA Y POSTISQUÉMICA DE LAS CALPAÍNAS PREVIENE EL DAÑO POR REPERFUSIÓN *IN VIVO*

Como se ha detallado, la administración del inhibidor de las calpaínas antes de la isquemia y durante el inicio de la reperfusión tiene un claro efecto protector frente al daño por reperfusión (Urthaler et al., 1997; Inserte et al., 2004; Khalil et al., 2005). Sólo recientemente se ha demostrado que la administración del inhibidor exclusivamente durante la reperfusión puede tener un efecto protector en corazones aislados de conejo (Neuhof et al., 2008). En esta tesis se estudia por primera vez *in vivo* la efectividad de la inhibición farmacológica de las calpaínas durante el inicio la reperfusión. Este modelo experimental se acerca más a la situación clínica del paciente con infarto agudo de miocardio, en la cual sólo es posible una actuación farmacológica con la isquemia en progreso y/o tras la restauración del flujo coronario. El protocolo utilizado en este estudio para la administración del inhibidor sería de fácil aplicación en la clínica, ya que consiste en la infusión sistémica del fármaco minutos antes de realizar la reperfusión con el fin de que en el inicio de ésta la concentración del inhibidor en sangre sea suficiente para inhibir las calpaínas, junto con una infusión reducida para mantener niveles elevados del inhibidor, dado que el tiempo de semivida farmacocinética del MDL-28170 en plasma es de al menos 1 hora (Markgraf et al., 1998).

El efecto protector del MDL-28170 en este modelo experimental fue importante, con una reducción del tamaño del infarto del 32%, pero algo menor que en el sistema *ex vivo*; esto se puede deber a varias causas. Por un lado, la contribución de las calpaínas al daño por reperfusión en el modelo *in vivo* de isquemia regional podría ser algo menor y su inhibición sería menos efectiva. Por otro lado, el MDL-28170 tiene una baja solubilidad en agua y no fue posible aumentar de forma segura la cantidad de inhibidor infundido en el sistema circulatorio, por lo que la concentración obtenida de MDL-28170 en sangre podría haber sido subóptima y la inhibición de las calpaínas, por tanto, incompleta, tal y como refleja la degradación de fodrina. Por tanto, un inhibidor de las calpaínas con una mayor solubilidad o una mejor absorción por parte del cardiomiocito podría tener un efecto cardioprotector mayor.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de las calpaínas reduce el tamaño del infarto de forma significativa y es por tanto una estrategia terapéutica con potencial para su uso en clínica.

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESUMEN DE RESULTADOS

1) Activación y regulación de las calpaínas durante la isquemia y reperfusión miocárdicas

- 1.1) El estudio de corazones de rata aislados sometidos a isquemia de diversa duración seguida o no de reperfusión demuestra que las calpaínas permanecen inactivas durante la isquemia y que es en la reperfusión cuando se activan.
- 1.2) Resultados de este estudio muestran que en un modelo de sobrecarga de Ca^{2+} sin isquemia la acidosis intracelular es capaz de inhibir las calpaínas.
- 1.3) La translocación a membrana de las calpaínas ocurre durante la isquemia a pesar de la ausencia de actividad y es dependiente de Ca^{2+} . La reducción de la translocación con metil- β -ciclodextrina durante la isquemia no tiene efecto alguno sobre su actividad durante la reperfusión.
- 1.4) La calpastatina es expresada en el citosol del miocardio de rata y es proteolizada durante la reperfusión por las calpaínas.

2) Contribución de las calpaínas a la pérdida de la homeostasis catiónica

- 2.1) Los corazones de rata sometidos a isquemia prolongada tienen reducida la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa durante la reperfusión.
- 2.2) La disfunción de la bomba contribuye al daño por reperfusión al favorecer la sobrecarga de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.
- 2.3) La disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa es consecuencia de la degradación de α -fodrina y anquirina-B por parte de las calpaínas, que en cambio no degradan subunidades de la bomba.
- 2.4) La degradación de α -fodrina y anquirina-B provoca la disociación de las subunidades α de la bomba del citoesqueleto de membrana.

3. Papel de las calpaínas en la cardioprotección

- 3.1) El preconditionamiento isquémico acelera la cinética de recuperación del Na^+ en la reperfusión y preserva la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.
- 3.2) El preconditionamiento inhibe la actividad de las calpaínas, previniendo la degradación de α -fodrina y anquirina-B y el desanclaje de las subunidades α de la Na^+/K^+ -ATPasa del citoesqueleto de membrana.

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- 3.3) La inhibición farmacológica de las calpaínas reproduce los efectos del preconditionamiento isquémico.
- 3.4) El preconditionamiento farmacológico mediante activación transitoria de la PKA reproduce los efectos del preconditionamiento isquémico mientras que su inhibición los revierte.
- 3.5) En corazones aislados de rata sólo aquellos protocolos de postcondicionamiento isquémico capaces de retrasar la normalización del pH intracelular más de un minuto en la reperfusión reducen la muerte celular y mejoran la recuperación funcional.
- 3.6) En el postcondicionamiento isquémico tanto la cardioprotección como el retraso en la normalización del pH intracelular se correlacionan con la inhibición de las calpaínas en el inicio de la reperfusión.
- 3.7) En un modelo de isquemia/reperfusión *in vivo*, la administración del inhibidor de las calpaínas exclusivamente durante el inicio de la reperfusión reduce su actividad en el miocardio y el tamaño del infarto.

CONCLUSIONES

A partir de estos resultados, se concluye que:

- 1) Las calpaínas se activan durante la reperfusión contribuyendo a la muerte celular que se produce tras un episodio isquémico.
- 2) La actividad de las calpaínas en el miocardio reperfundido está regulada por Ca^{2+} y por el pH intracelular pero no por su translocación y provoca la disfunción de la Na^+/K^+ -ATPasa, potenciando la sobrecarga de Ca^{2+} y, por tanto, la hipercontractura y la muerte celular.
- 3) Las calpaínas juegan un papel importante en los efectos cardioprotectores del preconditionamiento y el postcondicionamiento isquémicos.
- 4) La inhibición farmacológica de las calpaínas exclusivamente en la reperfusión protege frente al daño por reperfusión en un modelo experimental *in vivo*, lo que demuestra su potencial como diana terapéutica en el infarto agudo de miocardio.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, D.G., and Orchard, C.H. (1987). Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* **60**, 153-168.
- Allshire, A., Piper, H.M., Cuthbertson, K.S., and Cobbold, P.H. (1987). Cytosolic free Ca²⁺ in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J* **244**, 381-385.
- Alvira, D., Ferrer, I., Gutierrez-Cuesta, J., Garcia-Castro, B., Pallas, M., and Camins, A. (2008). Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **14**, 309-313.
- Armstrong, S.C., Gao, W., Lane, J.R., and Ganote, C.E. (1998). Protein phosphatase inhibitors calyculin A and fostriecin protect rabbit cardiomyocytes in late ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 61-73.
- Armstrong, S.C., Latham, C.A., Shivell, C.L., and Ganote, C.E. (2001). Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1165-1179.
- Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Leupold, J.H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). NRF-1, and AP-1 regulate the promoter of the human calpain small subunit 1 (CAPNS1) gene. *Gene* **410**, 197-206.
- Aufricht, C., Bidmon, B., Ruffingshofer, D., Regele, H., Herkner, K., Siegel, N.J., Kashgarian, M., and Van Why, S.K. (2002). Ischemic conditioning prevents Na,K-ATPase dissociation from the cytoskeletal cellular fraction after repeat renal ischemia in rats. *Pediatr Res* **51**, 722-727.
- Ault, K.A., Cannon, C.P., Mitchell, J., McCahan, J., Tracy, R.P., Novotny, W.F., Reimann, J.D., and Braunwald, E. (1999). Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol* **33**, 634-639.
- Averna, M., de Tullio, R., Passalacqua, M., Salamino, F., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2001). Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation. *Biochem J* **354**, 25-30.
- Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Salamino, F., Bertuccio, M., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2007). Proteolytic degradation of nitric oxide synthase isoforms by calpain is modulated by the expression levels of HSP90. *Febs J* **274**, 6116-6127.
- Azam, M., Andrabi, S.S., Sahr, K.E., Kamath, L., Kuliopulos, A., and Chishti, A.H. (2001). Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* **21**, 2213-2220.
- Babsky, A., Hekmatyar, S., Wehrli, S., Doliba, N., Osbakken, M., and Bansal, N. (2002). Influence of ischemic preconditioning on intracellular sodium, pH, and cellular energy status in isolated perfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 520-528.
- Bai, D.S., Dai, Z., Zhou, J., Liu, Y.K., Qiu, S.J., Tan, C.J., Shi, Y.H., Huang, C., Wang, Z., He, Y.F., *et al.* (2009). Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**, 460-470.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., *et al.* (2005). Loss of cyclophilin

D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658-662.

Balijepalli, R.C., Foell, J.D., Hall, D.D., Hell, J.W., and Kamp, T.J. (2006). Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7500-7505.

Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., Lefevre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* **120**, 275-285.

Barbero, S., Mielgo, A., Torres, V., Teitz, T., Shields, D.J., Mikolon, D., Bogyo, M., Barila, D., Lahti, J.M., Schlaepfer, D., *et al.* (2009). Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* **69**, 3755-3763.

Barrabes, J.A., Garcia-Dorado, D., Mirabet, M., Inserte, J., Agullo, L., Soriano, B., Massaguer, A., Padilla, F., Lidon, R.M., and Soler-Soler, J. (2005). Antagonism of selectin function attenuates microvascular platelet deposition and platelet-mediated myocardial injury after transient ischemia. *J Am Coll Cardiol* **45**, 293-299.

Barrabes, J.A., Garcia-Dorado, D., Oliveras, J., Gonzalez, M.A., Ruiz-Meana, M., Solares, J., Burillo, A.G., Lidon, R.M., Antolin, M., Castell, J., *et al.* (1996a). Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Pflugers Arch* **432**, 663-670.

Barrabes, J.A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Piper, H.M., Solares, J., Gonzalez, M.A., Oliveras, J., Herrejon, M.P., and Soler Soler, J. (1996b). Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch* **431**, 519-526.

Barta, J., Toth, A., Edes, I., Vaszily, M., Papp, J.G., Varro, A., and Papp, Z. (2005). Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem* **278**, 1-8.

Bauza, G., Le Moyec, L., and Eugene, M. (1995). pH regulation during ischaemia-reperfusion of isolated rat hearts, and metabolic effects of 2,3-butanedione monoxime. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 1703-1713.

Becker, L.B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* **61**, 461-470.

Benetti, R., Del Sal, G., Monte, M., Paroni, G., Brancolini, C., and Schneider, C. (2001). The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *Embo J* **20**, 2702-2714.

Bers, D.M., Barry, W.H., and Despa, S. (2003). Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **57**, 897-912.

Bers, D.M., and Guo, T. (2005). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* **1047**, 86-98.

Boengler, K., Buechert, A., Heinen, Y., Roeskes, C., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G., and Schulz, R. (2008). Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res* **102**, 131-135.

- Bolli, R. (1998). Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis. A brief review of the evidence demonstrating a major role of reactive oxygen species in several forms of postischemic dysfunction. *Basic Res Cardiol* **93**, 156-162.
- Campbell, B., Adams, J., Shin, Y.K., and Lefer, A.M. (1999). Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 467-476.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J.C., and Gottlieb, R.A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* **276**, 30724-30728.
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2008). Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C460-466.
- Cohen, M.V., Yang, X.M., and Downey, J.M. (2007). The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* **115**, 1895-1903.
- Cortesio, C.L., Chan, K.T., Perrin, B.J., Burton, N.O., Zhang, S., Zhang, Z.Y., and Huttenlocher, A. (2008). Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion. *J Cell Biol* **180**, 957-971.
- Costelli, P., Tullio, R.D., Baccino, F.M., and Melloni, E. (2001). Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br J Cancer* **84**, 946-950.
- Coulter, S.A., Cannon, C.P., Ault, K.A., Antman, E.M., Van de Werf, F., Adgey, A.A., Gibson, C.M., Giugliano, R.P., Mascelli, M.A., Scherer, J., *et al.* (2000). High levels of platelet inhibition with abciximab despite heightened platelet activation and aggregation during thrombolysis for acute myocardial infarction: results from TIMI (thrombolysis in myocardial infarction) 14. *Circulation* **101**, 2690-2695.
- Cowan, C.M., Fan, M.M., Fan, J., Shehadeh, J., Zhang, L.Y., Graham, R.K., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2008). Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity. *J Neurosci* **28**, 12725-12735.
- Cuerrier, D., Moldoveanu, T., and Davies, P.L. (2005). Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. *J Biol Chem* **280**, 40632-40641.
- Das, M., Gherghiceanu, M., Lekli, I., Mukherjee, S., Popescu, L.M., and Das, D.K. (2008). Essential role of lipid raft in ischemic preconditioning. *Cell Physiol Biochem* **21**, 325-334.
- Davies, M.J., Thomas, A.C., Knapman, P.A., and Hangartner, J.R. (1986). Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* **73**, 418-427.
- Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E., and Stromer, M.H. (1976). A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* **15**, 2159-2167.

BIBLIOGRAFÍA

De Tullio, R., Aversa, M., Salamino, F., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2000). Differential degradation of calpastatin by mu- and m-calpain in Ca(2+)-enriched human neuroblastoma LAN-5 cells. *FEBS Lett* **475**, 17-21.

De Tullio, R., Cantoni, C., Broggio, C., Prato, C., Stifanese, R., Aversa, M., Antolini, R., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2009). Involvement of exon 6-mediated calpastatin intracellular movements in the modulation of calpain activation. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 182-187.

Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E.L., and Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J Cell Biol* **175**, 595-605.

Di Lisa, F., and Bernardi, P. (1998). Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem* **184**, 379-391.

Di Lisa, F., Menabo, R., Canton, M., Barile, M., and Bernardi, P. (2001). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* **276**, 2571-2575.

Dong, Y.N., Waxman, E.A., and Lynch, D.R. (2004). Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *J Neurosci* **24**, 11035-11045.

Doumit, M.E., and Koohmaraie, M. (1999). Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. *J Anim Sci* **77**, 1467-1473.

Dutt, P., Croall, D.E., Arthur, J.S., Veyra, T.D., Williams, K., Elce, J.S., and Greer, P.A. (2006). m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol* **6**, 3.

Elmoselhi, A.B., Lukas, A., Ostadal, P., and Dhalla, N.S. (2003). Preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced remodeling of Na⁺-K⁺-ATPase in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1055-1063.

Fabiato, A., and Fabiato, F. (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **276**, 233-255.

Farkas, A., Tompa, P., and Friedrich, P. (2003). Revisiting ubiquity and tissue specificity of human calpains. *Biol Chem* **384**, 945-949.

Ferdinandy, P., Schulz, R., and Baxter, G.F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* **59**, 418-458.

Fernandez-Montalvan, A., Assfalg-Machleidt, I., Pfeiler, D., Fritz, H., Jochum, M., and Machleidt, W. (2006). Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation. *Biol Chem* **387**, 617-627.

Fiolet, J.W., and Baartscheer, A. (2000). Cellular calcium homeostasis during ischemia; a thermodynamic approach. *Cardiovasc Res* **45**, 100-106.

Franco, S.J., and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* **118**, 3829-3838.

French, C.J., Spees, J.L., Zaman, A.K., Taatjes, D.J., and Sobel, B.E. (2009). The magnitude and temporal dependence of apoptosis early after myocardial ischemia with or without reperfusion. *Faseb J* **23**, 1177-1185.

French, J.P., Hamilton, K.L., Quindry, J.C., Lee, Y., Upchurch, P.A., and Powers, S.K. (2008). Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *Faseb J* **22**, 2862-2871.

French, J.P., Quindry, J.C., Falk, D.J., Staib, J.L., Lee, Y., Wang, K.K., and Powers, S.K. (2006). Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H128-136.

Fujita, M., Asanuma, H., Hirata, A., Wakeno, M., Takahama, H., Sasaki, H., Kim, J., Takashima, S., Tsukamoto, O., Minamino, T., *et al.* (2007). Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H2004-2008.

Fuller, W., Parmar, V., Eaton, P., Bell, J.R., and Shattock, M.J. (2003). Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. *Cardiovasc Res* **57**, 1044-1051.

Gafni, J., Cong, X., Chen, S.F., Gibson, B.W., and Ellerby, L.M. (2009). Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J Biol Chem* **284**, 25441-25449.

Galvez, A.S., Diwan, A., Odley, A.M., Hahn, H.S., Osinska, H., Melendez, J.G., Robbins, J., Lynch, R.A., Marreez, Y., and Dorn, G.W., 2nd (2007). Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ Res* **100**, 1071-1078.

Ganote, C.E. (1983). Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* **15**, 67-73.

Garcia-Dorado, D., and Piper, H.M. (2006). Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. *Cardiovasc Res* **69**, 1-3.

Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Agullo, L., and Cabestrero, A. (2006). The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* **70**, 274-285.

Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., and Piper, H.M. (2009). Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovasc Res* **83**, 165-168.

Garcia-Dorado, D., and Theroux, P. (2004). Myocardial Cell Protection in Acute Coronary Syndromes. In *Acute Coronary Syndromes* (Montreal, Canada, Elsevier Science (Saunders)), pp. 453-472.

Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Duran, J.M., Solares, J., Alonso, J., Sanz, E., Munoz, R., Elizaga, J., Botas, J., Fernandez-Aviles, F., *et al.* (1992a). Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* **85**, 1160-1174.

Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Elizaga, J., Galinanes, M., Solares, J., Riesgo, M., Gomez, M.J., Garcia-Dorado, A., and Fernandez Aviles, F. (1987). Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* **21**, 537-544.

Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Muñoz, R., Alonso, J., Elizaga, J., Fernandez-Aviles, F., Botas, J., Solares, J., Soriano, J., and Duran, J.M. (1992b). Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol* **262**, H17-H22.

Garg, V., Jiao, J., and Hu, K. (2009). Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels by caveolin-enriched microdomains in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **82**, 51-58.

Geesink, G.H., Nonneman, D., and Koohmaraie, M. (1998). An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Arch Biochem Biophys* **356**, 19-24.

Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., and Wells, A. (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* **24**, 2499-2512.

Glantz, S.B., Cianci, C.D., Iyer, R., Pradhan, D., Wang, K.K., and Morrow, J.S. (2007). Sequential degradation of alphaII and betaII spectrin by calpain in glutamate or maitotoxin-stimulated cells. *Biochemistry* **46**, 502-513.

Glitsch, H.G., and Tappe, A. (1995). Change of Na⁺ pump current reversal potential in sheep cardiac Purkinje cells with varying free energy of ATP hydrolysis. *J Physiol* **484** (Pt 3), 605-616.

Goette, A., Arndt, M., Rocken, C., Staack, T., Bechtloff, R., Reinhold, D., Huth, C., Ansorge, S., Klein, H.U., and Lendeckel, U. (2002). Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H264-272.

Goll, D.E., Neti, G., Mares, S.W., and Thompson, V.F. (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* **86**, E19-35.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731-801.

Gonzalez, A., Abril, E., Roca, A., Aragon, M.J., Figueroa, M.J., Velarde, P., Ruiz, R., Favez, O., Galan, J.J., Herreros, J.A., *et al.* (2003). Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5529-5536.

Goudenege, S., Poussard, S., Dulong, S., and Cottin, P. (2005). Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1900-1910.

Granfeldt, A., Lefer, D.J., and Vinten-Johansen, J. (2009). Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* **83**, 234-246.

Gustafsson, A.B., and Gottlieb, R.A. (2003). Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol* **23**, 447-459.

- Gustafsson, A.B., and Gottlieb, R.A. (2009). Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res* **104**, 150-158.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Javadov, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**, 372-385.
- Hanna, R.A., Campbell, R.L., and Davies, P.L. (2008). Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* **456**, 409-412.
- Hanna, R.A., Garcia-Diaz, B.E., and Davies, P.L. (2007). Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Lett* **581**, 2894-2898.
- Harwood, S.M., Allen, D.A., Chesser, A.M., New, D.I., Raftery, M.J., and Yaqoob, M.M. (2003). Calpain is activated in experimental uremia: is calpain a mediator of uremia-induced myocardial injury? *Kidney Int* **63**, 866-877.
- Hausenloy, D.J. (2009). Signalling pathways in ischaemic postconditioning. *Thromb Haemost* **101**, 626-634.
- Hewitt, K.E., Lesiuk, H.J., Tauskela, J.S., Morley, P., and Durkin, J.P. (1998). Selective coupling of mu-calpain activation with the NMDA receptor is independent of translocation and autolysis in primary cortical neurons. *J Neurosci Res* **54**, 223-232.
- Holly, T.A., Drincic, A., Byun, Y., Nakamura, S., Harris, K., Klocke, F.J., and Cryns, V.L. (1999). Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1709-1715.
- Holmes, K.C., and Geeves, M.A. (2000). The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 419-431.
- Hood, J.L., Brooks, W.H., and Roszman, T.L. (2006). Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient. *Bioessays* **28**, 850-859.
- Ichihara, K., Haneda, T., Onodera, S., and Abiko, Y. (1987). Inhibition of ischemia-induced subcellular redistribution of lysosomal enzymes in the perfused rat heart by the calcium entry blocker, diltiazem. *J Pharmacol Exp Ther* **242**, 1109-1113.
- Ilian, M.A., Gilmour, R.S., and Bickerstaffe, R. (1999). Quantification of ovine and bovine calpain I, calpain II, and calpastatin mRNA by ribonuclease protection assay. *J Anim Sci* **77**, 853-864.
- Iliodromitis, E.K., Downey, J.M., Heusch, G., and Kremastinos, D.T. (2009). What is the optimal postconditioning algorithm? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **14**, 269-273.
- Iliodromitis, E.K., Zoga, A., Vrettou, A., Andreadou, I., Paraskevaïdis, I.A., Kaklamanis, L., and Kremastinos, D.T. (2006). The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis* **188**, 356-362.
- Imahashi, K., Nishimura, T., Yoshioka, J., and Kusuoka, H. (2001). Role of intracellular Na(+) kinetics in preconditioned rat heart. *Circ Res* **88**, 1176-1182.

BIBLIOGRAFÍA

Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Saito, Y., and Kawashima, S. (1989). Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. *J Biol Chem* **264**, 18838-18843.

Inserte, J., Barrabes, J.A., Hernando, V., and Garcia-Dorado, D. (2009). Orphan targets for reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **83**, 169-178.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Agullo, L., Pina, P., and Soler-Soler, J. (2004). Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* **64**, 105-114.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., Barrabes, J.A., Pina, P., Agullo, L., Piper, H.M., and Soler-Soler, J. (2002). Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* **55**, 739-748.

Irisawa, H., and Sato, R. (1986). Intra- and extracellular actions of proton on the calcium current of isolated guinea pig ventricular cells. *Circ Res* **59**, 348-355.

Jordan, C., Puschel, B., Koob, R., and Drenckhahn, D. (1995). Identification of a binding motif for ankyrin on the alpha-subunit of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* **270**, 29971-29975.

Kaljusto, M.L., Mori, T., Mohammad Husain Rizvi, S., Galagudza, M., Frantzen, M.L., Valen, G., and Vaage, J. (2006). Postconditioning in rats and mice. *Scand Cardiovasc J* **40**, 334-341.

Kaplan, S.H., Yang, H., Gilliam, D.E., Shen, J., Lemasters, J.J., and Cascio, W.E. (1995). Hypercapnic acidosis and dimethyl amiloride reduce reperfusion induced cell death in ischaemic ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* **29**, 231-238.

Kendall, T.L., Koohmaraie, M., Arbona, J.R., Williams, S.E., and Young, L.L. (1993). Effect of pH and ionic strength on bovine m-calpain and calpastatin activity. *J Anim Sci* **71**, 96-104.

Khalil, P.N., Neuhof, C., Huss, R., Pollhammer, M., Khalil, M.N., Neuhof, H., Fritz, H., and Siebeck, M. (2005). Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *Eur J Pharmacol* **528**, 124-131.

Kim, S.J., Kudej, R.K., Yatani, A., Kim, Y.K., Takagi, G., Honda, R., Colantonio, D.A., Van Eyk, J.E., Vatner, D.E., Rasmusson, R.L., *et al.* (2001). A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca⁽²⁺⁾ handling. *Circ Res* **89**, 831-837.

Kramerova, I., Beckmann, J.S., and Spencer, M.J. (2007). Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A). *Biochim Biophys Acta* **1772**, 128-144.

Kupai, K., Csonka, C., Fekete, V., Odendaal, L., van Rooyen, J., Marais de, W., Csont, T., and Ferdinandy, P. (2009). Cholesterol diet-induced hyperlipidemia impairs the cardioprotective effect of postconditioning: role of peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1729-1735.

- Kupatt, C., Wichels, R., Horstkotte, J., Krombach, F., Habazettl, H., and Boekstegers, P. (2002). Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol* **72**, 455-461.
- Kurihara, S. (1994). Regulation of cardiac muscle contraction by intracellular Ca²⁺. *Jpn J Physiol* **44**, 591-611.
- Ladilov, Y., Haffner, S., Balsler-Schafer, C., Maxeiner, H., and Piper, H.M. (1999). Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* **276**, H1868-1876.
- Langford, E.J., Wainwright, R.J., and Martin, J.F. (1996). Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 51-55.
- Laws, K.H., Clanton, J.A., Starnes, V.A., Lupinetti, F.M., Collins, J.C., Oates, J.A., and Hammon, J.W., Jr. (1983). Kinetics and imaging of indium-111-labeled autologous platelets in experimental myocardial infarction. *Circulation* **67**, 110-116.
- Lebart, M.C., and Benyamin, Y. (2006). Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *Febs J* **273**, 3415-3426.
- Letavernier, E., Perez, J., Bellocq, A., Mesnard, L., de Castro Keller, A., Haymann, J.P., and Baud, L. (2008). Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* **102**, 720-728.
- Li, B., Chen, R., Huang, R., and Luo, W. (2009a). Clinical benefit of cardiac ischemic postconditioning in corrections of tetralogy of Fallot. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **8**, 17-21.
- Li, X., Li, Y., Shan, L., Shen, E., Chen, R., and Peng, T. (2009b). Over-expression of calpastatin inhibits calpain activation and attenuates myocardial dysfunction during endotoxaemia. *Cardiovasc Res* **83**, 72-79.
- Liu, H., Cala, P.M., and Anderson, S.E. (1998). Ischemic preconditioning: effects on pH, Na and Ca in newborn rabbit hearts during Ischemia/Reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 685-697.
- Liu, X., Rainey, J.J., Harriman, J.F., and Schnellmann, R.G. (2001). Calpains mediate acute renal cell death: role of autolysis and translocation. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F728-738.
- Lundmark, J.A., Trueblood, N., Wang, L.F., Ramasamy, R., and Schaefer, S. (1999). Repetitive acidosis protects the ischemic heart: implications for mechanisms in preconditioned hearts. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 907-917.
- Luo, W., Li, B., Chen, R., Huang, R., and Lin, G. (2008). Effect of ischemic postconditioning in adult valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg* **33**, 203-208.
- Lynch, G., Rex, C.S., and Gall, C.M. (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology* **52**, 12-23.
- Madden, D.T., Egger, L., and Bredesen, D.E. (2007). A calpain-like protease inhibits autophagic cell death. *Autophagy* **3**, 519-522.

BIBLIOGRAFÍA

Maekawa, A., Lee, J.K., Nagaya, T., Kamiya, K., Yasui, K., Horiba, M., Miwa, K., Uzzaman, M., Maki, M., Ueda, Y., *et al.* (2003). Overexpression of calpastatin by gene transfer prevents troponin I degradation and ameliorates contractile dysfunction in rat hearts subjected to ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 1277-1284.

Markgraf, C.G., Velayo, N.L., Johnson, M.P., McCarty, D.R., Medhi, S., Koehl, J.R., Chmielewski, P.A., and Linnik, M.D. (1998). Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **29**, 152-158.

McDonough, J.L., Labugger, R., Pickett, W., Tse, M.Y., MacKenzie, S., Pang, S.C., Atar, D., Ropchan, G., and Van Eyk, J.E. (2001). Cardiac troponin I is modified in the myocardium of bypass patients. *Circulation* **103**, 58-64.

Melloni, E., Averna, M., Salamino, F., Sparatore, B., Minafra, R., and Pontremoli, S. (2000a). Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator. *J Biol Chem* **275**, 82-86.

Melloni, E., Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Defranchi, E., Salamino, F., and Pontremoli, S. (2006). Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease? *J Biol Chem* **281**, 24945-24954.

Melloni, E., Minafra, R., Salamino, F., and Pontremoli, S. (2000b). Properties and intracellular localization of calpain activator protein. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 472-476.

Meyer, S.L., Bozyczko-Coyne, D., Mallya, S.K., Spais, C.M., Bihovsky, R., Kaywooya, J.K., Lang, D.M., Scott, R.W., and Siman, R. (1996). Biologically active monomeric and heterodimeric recombinant human calpain I produced using the baculovirus expression system. *Biochem J* **314** (Pt 2), 511-519.

Mingorance-Le Meur, A., and O'Connor, T.P. (2009). Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *Embo J* **28**, 248-260.

Mirabet, M., Garcia-Dorado, D., Inserte, J., Barrabes, J.A., Lidon, R.M., Soriano, B., Azevedo, M., Padilla, F., Agullo, L., Ruiz-Meana, M., *et al.* (2002). Platelets activated by transient coronary occlusion exacerbate ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1134-1141.

Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Agullo, E., Stahlhofen, S., Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Jorge, I., Torre, I., Vazquez, J., Boengler, K., *et al.* (2009). Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res* **83**, 747-756.

Mishizen-Eberz, A.J., Guttman, R.P., Giasson, B.I., Day, G.A., 3rd, Hodara, R., Ischiropoulos, H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Lynch, D.R. (2003). Distinct cleavage patterns of normal and pathologic forms of alpha-synuclein by calpain I in vitro. *J Neurochem* **86**, 836-847.

Miyata, H., Lakatta, E.G., Stern, M.D., and Silverman, H.S. (1992). Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ Res* **71**, 605-613.

Miyazaki, S., Fujiwara, H., Onodera, T., Kihara, Y., Matsuda, M., Wu, D.J., Nakamura, Y., Kumada, T., Sasayama, S., Kawai, C., *et al.* (1987). Quantitative analysis of contraction

band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart. *Circulation* **75**, 1074-1082.

Mohler, P.J., Schott, J.J., Gramolini, A.O., Dilly, K.W., Guatimosim, S., duBell, W.H., Song, L.S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M.E., *et al.* (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-639.

Molchanova, L.V., Nickulina, S.E., Ivanova, T.N., Ivanov, A.I., and Polyskova, E.D. (1991). Role of cAMP in regulation of activity of acid hydrolases of rat heart and liver during ischemia and after recirculation. *Resuscitation* **22**, 261-274.

Moldoveanu, T., Gehring, K., and Green, D.R. (2008). Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature* **456**, 404-408.

Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z., and Davies, P.L. (2002). A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649-660.

Molinari, M., Anagli, J., and Carafoli, E. (1994). Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem* **269**, 27992-27995.

Molinari, M., and Carafoli, E. (1997). Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J Membr Biol* **156**, 1-8.

Moon, R.B., and Richards, J.H. (1973). Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J Biol Chem* **248**, 7276-7278.

Morford, L.A., Forrest, K., Logan, B., Overstreet, L.K., Goebel, J., Brooks, W.H., and Roszman, T.L. (2002). Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 540-546.

Mosca, S.M., and Cingolani, H.E. (2000). Comparison of the protective effects of ischemic preconditioning and the Na⁺/H⁺ exchanger blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 7-13.

Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* **88**, 581-609.

Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**, 1269-1276.

Nawada, R., Murakami, T., Iwase, T., Nagai, K., Morita, Y., Kouchi, I., Akao, M., and Sasayama, S. (1997). Inhibition of sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase activity reduces the infarct size-limiting effect of preconditioning in rabbit hearts. *Circulation* **96**, 599-604.

Neuhof, C., Fabiunk, V., Speth, M., Moller, A., Fritz, F., Tillmanns, H., Neuhof, H., and Erdogan, A. (2008). Reduction of myocardial infarction by postischemic administration of the calpain inhibitor A-705253 in comparison to the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor Cariporide in isolated perfused rabbit hearts. *Biol Chem* **389**, 1505-1512.

Neuhof, C., Fabiunke, V., Deibele, K., Speth, M., Moller, A., Lubisch, W., Fritz, H., Tillmanns, H., and Neuhof, H. (2004). Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol Chem* **385**, 1077-1082.

BIBLIOGRAFÍA

- Nian, M., Lee, P., Khaper, N., and Liu, P. (2004). Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* **94**, 1543-1553.
- Nuzzi, P.A., Senetar, M.A., and Huttenlocher, A. (2007). Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. *Mol Biol Cell* **18**, 795-805.
- Orchard, C.H., and Kentish, J.C. (1990). Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* **258**, C967-981.
- Ostadal, P., Elmoselhi, A.B., Zdobnicka, I., Lukas, A., Chapman, D., and Dhalla, N.S. (2003). Ischemia-reperfusion alters gene expression of Na⁺-K⁺ ATPase isoforms in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 457-462.
- Ostwald, K., Hayashi, M., Nakamura, M., and Kawashima, S. (1994). Subcellular distribution of calpain and calpastatin immunoreactivity and fodrin proteolysis in rabbit hippocampus after hypoxia and glucocorticoid treatment. *J Neurochem* **63**, 1069-1076.
- Panagiotopoulos, S., Daly, M.J., and Nayler, W.G. (1990). Effect of acidosis and alkalosis on postischemic Ca gain in isolated rat heart. *Am J Physiol* **258**, H821-828.
- Parr, T., Sensky, P.L., Arnold, M.K., Bardsley, R.G., and Buttery, P.J. (2000). Effects of epinephrine infusion on expression of calpastatin in porcine cardiac and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* **374**, 299-305.
- Penna, C., Tullio, F., Moro, F., Folino, A., Merlino, A., and Pagliaro, P. (2009). Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Basic Res Cardiol*.
- Perreault, C.L., Mulieri, L.A., Alpert, N.R., Ransil, B.J., Allen, P.D., and Morgan, J.P. (1992). Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium. *Am J Physiol* **263**, H503-510.
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., *et al.* (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **359**, 473-481.
- Piper, H.M., Abdallah, Y., and Schafer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**, 365-371.
- Piper, H.M., Garcia-Dorado, D., and Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **38**, 291-300.
- Poussard, S., Duvert, M., Balcerzak, D., Ramassamy, S., Brustis, J.J., Cottin, P., and Ducastaing, A. (1996). Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth Differ* **7**, 1461-1469.
- Powell, S.R., Gurzenda, E.M., Teichberg, S., Mantell, L.L., and Maulik, D. (2000). Association of increased ubiquitinated proteins with cardiac apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **2**, 103-112.
- Powell, S.R., Wang, P., Katzeff, H., Shringarpure, R., Teoh, C., Khaliulin, I., Das, D.K., Davies, K.J., and Schwalb, H. (2005). Oxidized and ubiquitinated proteins may predict recovery of postischemic cardiac function: essential role of the proteasome. *Antioxid Redox Signal* **7**, 538-546.

Preckel, B., Schlack, W., Obal, D., Barthel, H., Ebel, D., Grunert, S., and Thamer, V. (1998). Effect of acidotic blood reperfusion on reperfusion injury after coronary artery occlusion in the dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**, 179-186.

Purevjav, E., Nelson, D.P., Varela, J.J., Jimenez, S., Kearney, D.L., Sanchez, X.V., DeFreitas, G., Carabello, B., Taylor, M.D., Vatta, M., *et al.* (2007). Myocardial Fas ligand expression increases susceptibility to AZT-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* **7**, 255-263.

Ramasamy, R., Liu, H., Anderson, S., Lundmark, J., and Schaefer, S. (1995). Ischemic preconditioning stimulates sodium and proton transport in isolated rat hearts. *J Clin Invest* **96**, 1464-1472.

Ravulapalli, R., Campbell, R.L., Gauthier, S.Y., Dhe-Paganon, S., and Davies, P.L. (2009). Distinguishing between calpain heterodimerization and homodimerization. *Febs J* **276**, 973-982.

Raynaud, F., and Marcilhac, A. (2006). Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *Febs J* **273**, 3437-3443.

Reimer, K.A., Lowe, J.E., Rasmussen, M.M., and Jennings, R.B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* **56**, 786-794.

Reville, W.J., Goll, D.E., Stromer, M.H., Robson, R.M., and Dayton, W.R. (1976). A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Subcellular localization of the protease in porcine skeletal muscle. *J Cell Biol* **70**, 1-8.

Rodriguez-Sinovas, A., Abdallah, Y., Piper, H.M., and Garcia-Dorado, D. (2007). Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* **12**, 207-216.

Rodriguez-Sinovas, A., Boengler, K., Cabestrero, A., Gres, P., Morente, M., Ruiz-Meana, M., Konietzka, I., Miro, E., Totzeck, A., Heusch, G., *et al.* (2006). Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res* **99**, 93-101.

Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Garcia del Blanco, B., Inserte, J., Garcia, A., and Garcia-Dorado, D. (2009). Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs. *Basic Res Cardiol* **104**, 761-771.

Rodriguez-Sinovas, A., Garcia-Dorado, D., Padilla, F., Inserte, J., Barrabes, J.A., Ruiz-Meana, M., Agullo, L., and Soler-Soler, J. (2003). Pre-treatment with the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* **58**, 109-117.

Rubtsov, A.M., and Lopina, O.D. (2000). Ankyrins. *FEBS Lett* **482**, 1-5.

Ruiz-Meana, M., Abellan, A., Miro-Casas, E., and Garcia-Dorado, D. (2007). Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* **102**, 542-552.

BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Gonzalez, M.A., Barrabes, J.A., and Soler-Soler, J. (1995). Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res* **30**, 64-69.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Hofstaetter, B., Piper, H.M., and Soler-Soler, J. (1999). Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁽⁺⁾ through gap junctions. *Circ Res* **85**, 280-287.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Miro-Casas, E., Abellan, A., and Soler-Soler, J. (2006). Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovasc Res* **71**, 715-724.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Pina, P., Inserte, J., Agullo, L., and Soler-Soler, J. (2003). Cariporide preserves mitochondrial proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H999-1006.
- Ruiz-Meana, M., Pina, P., Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., Barba, I., Miro-Casas, E., Mirabet, M., and Soler-Soler, J. (2004). Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J Physiol* **558**, 873-882.
- Saitoh, T., Nakajima, T., Takahashi, T., and Kawahara, K. (2006). Changes in cardiovascular function on treatment of inhibitors of apoptotic signal transduction pathways in left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* **15**, 130-138.
- Salamino, F., De Tullio, R., Michetti, M., Mengotti, P., Melloni, E., and Pontremoli, S. (1994). Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 1326-1332.
- Sanchis, D., Llovera, M., Ballester, M., and Comella, J.X. (2008). An alternative view of apoptosis in heart development and disease. *Cardiovasc Res* **77**, 448-451.
- Sandmann, S., Yu, M., and Unger, T. (2001). Transcriptional and translational regulation of calpain in the rat heart after myocardial infarction-effects of AT(1) and AT(2) receptor antagonists and ACE inhibitor. *Br J Pharmacol* **132**, 767-777.
- Sato, K., and Kawashima, S. (2001). Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem* **382**, 743-751.
- Schafer, C., Ladilov, Y., Inserte, J., Schafer, M., Haffner, S., Garcia-Dorado, D., and Piper, H.M. (2001). Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* **51**, 241-250.
- Schafer, C., Ladilov, Y.V., Siegmund, B., and Piper, H.M. (2000). Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1457-1463.
- Schlack, W., Uebing, A., Schafer, M., Bier, F., Schafer, S., Piper, H.M., and Thamer, V. (1994). Regional contractile blockade at the onset of reperfusion reduces infarct size in the dog heart. *Pflugers Arch* **428**, 134-141.
- Severs, N.J. (2000). The cardiac muscle cell. *Bioessays* **22**, 188-199.

- Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B., and Wells, A. (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Mol Cell Biol* **26**, 5481-5496.
- Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., and Wells, A. (2002). Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* **22**, 2716-2727.
- Shulga, N., and Pastorino, J.G. (2006). Acyl coenzyme A-binding protein augments bid-induced mitochondrial damage and cell death by activating mu-calpain. *J Biol Chem* **281**, 30824-30833.
- Siegmund, B., Koop, A., Klietz, T., Schwartz, P., and Piper, H.M. (1990). Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* **258**, H285-291.
- Siegmund, B., Schlack, W., Ladilov, Y.V., Balsler, C., and Piper, H.M. (1997). Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* **96**, 4372-4379.
- Singh, R.B., Chohan, P.K., Dhalla, N.S., and Netticadan, T. (2004). The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 101-110.
- Skyschally, A., Schulz, R., and Heusch, G. (2008). Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz* **33**, 88-100.
- Skyschally, A., van Caster, P., Boengler, K., Gres, P., Musiolik, J., Schilawa, D., Schulz, R., and Heusch, G. (2009). Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res* **104**, 15-18.
- Smith, S.D., Jia, Z., Huynh, K.K., Wells, A., and Elce, J.S. (2003). Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. *FEBS Lett* **542**, 115-118.
- Soliman, D., Hamming, K.S., Matemisz, L.C., and Light, P.E. (2009). Reactive oxygen species directly modify sodium-calcium exchanger activity in a splice variant-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol*.
- Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* **264**, 20106-20111.
- Sorimachi, Y., Harada, K., Saido, T.C., Ono, T., Kawashima, S., and Yoshida, K. (1997). Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J Biochem* **122**, 743-748.
- Spencer, M.J., and Tidball, J.G. (1996). Calpain translocation during muscle fiber necrosis and regeneration in dystrophin-deficient mice. *Exp Cell Res* **226**, 264-272.
- Sprague, C.R., Fraley, T.S., Jang, H.S., Lal, S., and Greenwood, J.A. (2008). Phosphoinositide binding to the substrate regulates susceptibility to proteolysis by calpain. *J Biol Chem* **283**, 9217-9223.

BIBLIOGRAFÍA

Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T.T., L'Huillier, I., Apetit, J.F., Bonnefoy, E., Finet, G., Andre-Fouet, X., *et al.* (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**, 2143-2148.

Steenbergen, C., Murphy, E., Watts, J.A., and London, R.E. (1990). Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* **66**, 135-146.

Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S12-18.

Takahashi, M., Tanonaka, K., Yoshida, H., Oikawa, R., Koshimizu, M., Daicho, T., Toyooka, T., and Takeo, S. (2005). Effects of ACE inhibitor and AT1 blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart. *Cardiovasc Res* **65**, 356-365.

Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S., and Greer, P.A. (2006). Conditional disruption of ubiquitous calpains in the mouse. *Genesis* **44**, 297-303.

ten Hove, M., Jansen, M.A., Nederhoff, M.G., and Van Echteld, C.J. (2007). Combined blockade of the Na⁺ channel and the Na⁺/H⁺ exchanger virtually prevents ischemic Na⁺ overload in rat hearts. *Mol Cell Biochem* **297**, 101-110.

Thibault, H., Piot, C., Staat, P., Bontemps, L., Sportouch, C., Rioufol, G., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Apetit, J.F., *et al.* (2008). Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* **117**, 1037-1044.

Thomas, S.A., Fallavollita, J.A., Lee, T.C., Feng, J., and Canty, J.M., Jr. (1999). Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine. *Circ Res* **85**, 446-456.

Thompson, P.L., Fletcher, E.E., and Katavatis, V. (1979). Enzymatic indices of myocardial necrosis: influence on short- and long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation* **59**, 113-119.

Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F., and Friedrich, P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem* **279**, 20775-20785.

Urthaler, F., Wolkowicz, P.E., Digerness, S.B., Harris, K.D., and Walker, A.A. (1997). MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts. *Cardiovasc Res* **35**, 60-67.

Van Emous, J.G., Schreur, J.H., Ruigrok, T.J., and Van Echteld, C.J. (1998). Both Na⁺-K⁺ ATPase and Na⁺-H⁺ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 337-348.

Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **61**, 481-497.

Vrbjar, N., Dzurba, A., and Ziegelhoffer, A. (1993). Kinetic and thermodynamic properties of membrane bound Ca-ATPase with low affinity to calcium in cardiac sarcolemma; response to global ischemia of the heart. *Life Sci* **53**, 1789-1794.

- Walker, M.P., Rajendra, T.K., Saieva, L., Fuentes, J.L., Pellizzoni, L., and Matera, A.G. (2008). SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet* **17**, 3399-3410.
- Wang, H., Guo, Z., Wu, F., Long, F., Cao, X., Liu, B., Zhu, Z., and Yao, X. (2005). PKA-mediated protein phosphorylation protects ezrin from calpain I cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 496-501.
- Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**, 20-26.
- Woroniecki, R., Ferdinand, J.R., Morrow, J.S., and Devarajan, P. (2003). Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F358-364.
- Xu, L., and Deng, X. (2004). Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J Biol Chem* **279**, 53683-53690.
- Xu, L., and Deng, X. (2006a). Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem* **281**, 4457-4466.
- Xu, L., and Deng, X. (2006b). Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. *J Biol Chem* **281**, 35567-35575.
- Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., *et al.* (2009). Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat Med* **15**, 1202-1207.
- Yamashima, T. (2004). Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* **36**, 285-293.
- Yamashima, T., Kohda, Y., Tsuchiya, K., Ueno, T., Yamashita, J., Yoshioka, T., and Kominami, E. (1998). Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* **10**, 1723-1733.
- Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., and Maruyama, Y. (2000). Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **45**, 630-641.
- Yellon, D.M., and Downey, J.M. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**, 1113-1151.
- Yorozuya, T., Adachi, N., Dote, K., Nakanishi, K., Takasaki, Y., and Arai, T. (2004). Enhancement of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities in multi-cycle ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Eur J Cardiothorac Surg* **26**, 981-987.
- Yoshida, H., Takahashi, M., Koshimizu, M., Tanonaka, K., Oikawa, R., Toyooka, T., and Takeo, S. (2003). Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **59**, 419-427.

BIBLIOGRAFÍA

Yoshida, K., Inui, M., Harada, K., Saido, T.C., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S., and Sobue, K. (1995). Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ Res* **77**, 603-610.

Yoshida, Y., Shiga, T., and Imai, S. (1990). Degradation of sarcoplasmic reticulum calcium-pumping ATPase in ischemic-reperfused myocardium: role of calcium-activated neutral protease. *Basic Res Cardiol* **85**, 495-507.

Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1995). A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett* **358**, 101-103.

Youn, J.Y., Wang, T., and Cai, H. (2009). An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res* **104**, 50-59.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1124-1132.

Zakharov, V.V., and Mosevitsky, M.I. (2007). M-calpain-mediated cleavage of GAP-43 near Ser41 is negatively regulated by protein kinase C, calmodulin and calpain-inhibiting fragment GAP-43-3. *J Neurochem* **101**, 1539-1551.

Zalewska, T., Thompson, V.F., and Goll, D.E. (2004). Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1693**, 125-133.

Zatz, M., and Starling, A. (2005). Calpains and disease. *N Engl J Med* **352**, 2413-2423.

Zhao, X., Newcomb, J.K., Posmantur, R.M., Wang, K.K., Pike, B.R., and Hayes, R.L. (1998). pH dependency of mu-calpain and m-calpain activity assayed by casein zymography following traumatic brain injury in the rat. *Neurosci Lett* **247**, 53-57.

Zhao, Z.Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.P., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H579-588.

Zolk, O., Schenke, C., and Sarikas, A. (2006). The ubiquitin-proteasome system: focus on the heart. *Cardiovasc Res* **70**, 410-421.

Zweier, J.L., and Talukder, M.A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **70**, 181-190.