

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INMEDIATA POR
REPERFUSIÓN EN CARDIOMIOCITOS EN CULTIVO**

Memoria presentada por Pilar Pina Pascual para optar al grado de
Doctora en Farmacia.

Tesis doctoral realizada en el Laboratorio de Cardiología Experimental del Hospital Vall
d'Hebrón, bajo la dirección del Dr. David García-Dorado García
y de la Dra. Marisol Ruiz-Meana.

Tesis adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona.

Tutora: Dra. Josefa Sabrià Pau

Barcelona, mayo de 2004

DAVID GARCÍA-DORADO GARCÍA, Doctor en Medicina y Jefe de Sección del Hospital Universitario Vall d'Hebrón de Barcelona, MARISOL RUIZ-MEANA, Doctora en Veterinaria e Investigadora Adjunta del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón de Barcelona y JOSEFA SABRIÀ PAU, Doctora en Química y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral: "*Estudio de la muerte celular inmediata por reperfusión en cardiomiocitos en cultivo*", presentada por PILAR PINA PASCUAL para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Dr. David García-Dorado

Dra. Marisol Ruiz-Meana

Dra. Josefa Sabrià Pau

Barcelona, 10 de mayo de 2004

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David García-Dorado, responsable del Laboratorio de Cardiología Experimental del Servicio de Cardiología del Hospital Vall d'Hebrón y Director de esta tesis doctoral. Quiero expresarle mi gratitud por haberme aceptado en su grupo de investigación y por haber dirigido esta tesis de manera excelente y con gran rigor científico, por su interés, sus consejos y su apoyo constante a lo largo de mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Marisol Ruiz-Meana, que además de codirigir esta tesis doctoral, ha participado personalmente en el diseño y en la realización del trabajo experimental que aquí se presenta, y por haberse mostrado no sólo como codirectora sino como compañera y amiga durante todos estos años.

A la Dra. Josefa Sabrià Pau, por haber aceptado ser Tutora de esta tesis doctoral, la cual ha supervisado con rigurosidad y eficacia, por su amistad, su dedicación y sus buenos consejos.

Al Dr. Jordi Soler-Soler, Jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Vall d'Hebrón, por acogerme en su equipo y por su entusiasmo e interés que demuestra siempre en todos los proyectos que lleva a cabo nuestro laboratorio

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cardiología Experimental: Gemma, Noelia, Maribel, Arancha, Alberto, Antonio, Ferran, Lourdes, Mónica, Angeles, Javier, Luis, Pepe, Ignasi, Bet i Eli. Por todo lo que me han enseñado, por su colaboración desinteresada en muchos aspectos de este trabajo y sobretodo por su apoyo, su amistad y su generosidad.

Por último, quiero agradecer a mi familia, a mis amigos y a Eduard su apoyo incondicional y constante, su comprensión y porque sin todos ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A mis padres

A Eduard

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	X
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. NECROSIS MIOCÁRDICA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN	4
1.1. Daño inducido por la isquemia	4
1.1.1. Acidosis e incremento del Na ⁺ intracelular	5
1.1.2. Edema celular asociado a la isquemia	5
1.1.3. Incremento del Ca ²⁺ intracelular	6
1.1.4. Comunicación intercelular	6
1.1.5. Fragilidad estructural	7
1.2. Daño inducido por reperfusión	8
1.2.1. Daño letal inmediato por reperfusión	9
1.2.2. Daño letal tardío por reperfusión	10
2. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DAÑO LETAL INMEDIATO POR REPERFUSIÓN	12
2.1. Hipercontractura	12
2.2. Comunicación intercelular durante la reperfusión	14
2.3. Edema celular asociado a la reperfusión	15
3. LAS MITOCONDRIAS	17
3.1. Estructura y función de las mitocondrias.....	17

3.2. Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.....	20
3.2.1. Estructura molecular del PTPm	21
3.2.2. Regulación del PTPm	21
3.2.3. Contribución del PTPm al daño por isquemia/reperfusión	23
3.2.4. PTPm como diana terapéutica en el daño por isquemia/reperfusión	25
4. LA GLICINA.....	26
4.1. La glicina como neurotransmisor	27
4.2. Efecto citoprotector de la glicina	28
4.2.1. Receptores no neuronales de la glicina	29
4.2.2. Efectos de la glicina sobre la producción de radicales libres y mediadores de la inflamación	31
4.2.3. Efectos de la glicina sobre el edema celular.....	33
4.2.4. Otros efectos de la glicina	34
4.3. Consideraciones clínicas	35
II. OBJETIVOS	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
A. MODELOS, PROTOCOLOS Y VARIABLES ESTUDIADAS.....	43
1. CARDIOMIOCITOS HL-1	43
1.1. Características generales	43
1.2. Cultivo y almacenamiento.....	45
1.3. Protocolos experimentales en cardiomiocitos HL-1	47

1.4. Variables estudiadas en cardiomiocitos HL-1	48
1.4.1. Muerte celular por necrosis	48
1.4.2. Muerte celular por apoptosis	48
1.4.3. Cambios en la morfología y volumen celulares.....	49
1.4.4. Determinación del pH intracelular	50
1.4.5. Concentración intracelular de Na ⁺	51
1.4.6. Expresión del receptor de glicina	51
1.4.6.1. Técnica de Western blot	51
1.4.6.2. Tinción inmunocitoquímica.....	53
1.4.7. Concentración intracelular de glicina	54
2. MITOCONDRIAS AISLADAS DE RATA.....	55
2.1. Aislamiento de mitocondrias de corazón de rata.....	55
2.2. Protocolos experimentales en mitocondrias aisladas	55
2.3. Variables estudiadas en mitocondrias aisladas	56
2.3.1. Determinación del edema mitocondrial	56
2.3.2. Cuantificación de la liberación de calceína	56
B. MATERIAL Y REACTIVOS	57
C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
IV. RESULTADOS	61
A. ESTUDIOS CON CARDIOMIOCITOS HL-1	61
1. Caracterización de la muerte celular inducida por isquemia simulada y posterior reoxigenación	61
1.1. Necrosis y apoptosis.....	61
1.2. Papel del Ca ²⁺ en el daño por IS/Rx	62

1.3. Papel del pH extracelular en el daño por IS/Rx	63
1.4. Efecto de la glicina sobre el daño por IS/Rx.....	64
2. Efecto del pH y de la glicina sobre los cambios en el volumen celular durante la Rx.....	67
3. Efecto de la glicina sobre el pH y el Na ⁺ intracelulares durante la IS/Rx.....	69
4. Papel del receptor de glicina	71
4.1. Determinación del receptor por Western blot e inmunocitoquímica.....	72
4.2. Caracterización farmacológica.....	73
4.2.1. Efecto de agonistas-antagonistas glicinérgicos en el daño por IS/Rx	74
4.2.2. Papel del Cl ⁻ extracelular en el efecto protector de la glicina	78
5. Implicación de otros mecanismos de acción en el efecto protector de la glicina	81
6. Efecto del Rutenium Red en el daño por IS/Rx.....	82
7. Resumen de resultados derivados del estudio con cardiomiocitos HL-1	85
B. ESTUDIOS CON MITOCONDRIAS AISLADAS DE CORAZÓN DE RATA	87
1. Efecto de la Rx sobre la aparición de edema mitocondrial	87
2. Efecto de la glicina sobre el edema mitocondrial inducido por sobrecarga de Ca ²⁺ en condiciones normóxicas	89
3. Liberación de calceína inducida por sobrecarga de Ca ²⁺	90
4. Resumen de resultados derivados del estudio con mitocondrias aisladas.....	93
C. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE GLICINA.....	94

V. DISCUSIÓN	99
1. Muerte celular por isquemia simulada y reoxigenación en cardiomiocitos HL-1	100
1.1. Muerte celular en ausencia de hipercontractura	100
1.2. Daño celular por corrección de la acidosis intracelular (paradoja del pH)	101
2. La glicina previene del daño celular asociado a la reoxigenación.....	103
2.1. Recuperación del pH intracelular y sobrecarga de Na ⁺	105
2.2. El receptor de glicina no participa en la protección contra la paradoja del pH	106
3. La apertura del PTPm contribuye a la muerte celular por normalización del pH durante la reoxigenación	109
4. La glicina previene del daño celular debido a la normalización del pH al interferir con la apertura del poro de transición del permeabilidad mitocondrial	112
5. Papel deletéreo de la depleción de glicina durante la reoxigenación.....	113
6. Implicaciones terapéuticas	116
VI. CONCLUSIONES	119
VII. BIBLIOGRAFÍA	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cambios celulares que tienen lugar durante la isquemia	8
Figura 2: Desarrollo de hipercontractura durante la reperfusión	13
Figura 3: Modelo fisiopatológico de daño mecánico letal por reperfusión	16
Figura 4: Vías energéticas mitocondriales	19
Figura 5: Mecanismo molecular de apertura del PTPm	23
Figura 6: Síntesis y degradación de la glicina	26
Figura 7: Esquema de los componentes celulares de un cardiomiocito HL-1	44
Figura 8: Cardiomiocitos HL-1	45
Figura 9: Muerte celular apoptótica y necrótica en células HL-1 tras 60 minutos de IS y 30 minutos de Rx.....	62
Figura 10: Papel del Ca ²⁺ en el daño por Rx.....	63
Figura 11: Efecto del pH extracelular en el daño por IS/Rx	64
Figura 12: Efecto de la Gly en la muerte celular por IS/Rx	66
Figura 13: Cambios en el volumen celular durante la IS/Rx.....	67
Figura 14: Cambios en el volumen celular durante la IS/Rx (efecto del pH).....	68
Figura 15: Cambios en el volumen celular durante la IS/Rx (efecto de la Gly)	69
Figura 16: Cambios en el pH intracelular durante la IS/Rx	70
Figura 17: Sobrecarga de Na ⁺ durante la IS/Rx.....	71
Figura 18: Detección del RGly mediante Western blot.....	72
Figura 19: Detección del RGly mediante técnicas de inmunocitoquímica	73
Figura 20.A: Efecto de la taurina en la muerte celular por IS/Rx.....	75
Figura 20.B: Acción de la estricnina sobre el efecto protector de la Gly	76
Figura 20.C: Acción del BN-52021 (ginkgolide B) sobre el efecto protector de la Gly...76	
Figura 20.D: Efecto de la estricnina en la muerte celular por IS/Rx.....	77

Figura 21: Efecto de la eliminación del Cl ⁻ del medio extracelular sobre la muerte celular durante la IS/Rx.....	79
Figura 22: Efecto del DIDS sobre el daño por IS/Rx	80
Figura 23: Efecto de otros compuestos en la muerte celular por IS/Rx	82
Figura 24: Efecto del RuR en la muerte celular por IS/Rx.....	83
Figura 25: Cambios en la absorbancia a 550 nm en mitocondrias aisladas de corazón de rata	88
Figura 26: Cambios en la absorbancia a 550 nm en mitocondrias aisladas de corazón de rata sometidas a sobrecarga de Ca ²⁺	89
Figura 27: Liberación de calceína en mitocondrias aisladas de corazón de rata.....	91
Figura 28: Determinación de la concentración intracelular de Gly	94
Figura 29: Mecanismo de acción propuesto para la Gly en cardiomiocitos HL-1	115

ABREVIATURAS

AIF: "apoptosis inducing-activating factor"

ANF: factor natriurético atrial

ANT: translocasa de nucleótidos de adenina

Anx: anexina

BAPTA-AM: éster acetoximetilado del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxy)-etano-*N,N,N',N'* tetracético

BDM: 2,3-Butanodiona monoxima

4- BPB: bromuro de 4-bromofenacilo

BSA: albúmina bovina

CP: Creatina fosfato

CsA: ciclosporina A

CyP-D: ciclofilina D

DIDS: ácido 4,4'-diisotiocianato-estilbeno-2,2'-disulfónico

DMSO: dimetil sulfoxido

D₂O: deuterio

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FBS: suero bovino fetal

FITC: fluoresceína

Gly: glicina

HEPES: ácido N-[2-hidroxietyl]-piperazina-N'-[2-etanosulfónico]

IAM: infarto agudo de miocardio

IM: inhibición metabólica

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IS: isquemia simulada

NCX: intercambiador Na⁺/Ca²⁺

NHE: intercambiador Na⁺/H⁺

NF-κ B: factor nuclear kappa B

PBS: solución salina tamponada de fosfatos

PI: yoduro de propidio

PLA₂: fosfolipasa A2

PMN: polimorfonucleares

PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

RGly: receptor de glicina

RLO: radicales libres de oxígeno

RS: retículo sarcoplasmático

RuR: rutenium red

Rx: reoxigenación

SCA: síndromes coronarios agudos

SDS: dodecil sulfato sódico

SfA: sangliferina A

SNC: Sistema Nervioso Central

STR: estriquina

TEMED: N,N,N,N'-tetrametilendiamina

TNF- α : factor de necrosis tumoral

TSP: ácido tri-metil-silil-tetra-deutero propiónico

VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje

RESUMEN

La isquemia miocárdica aparece cuando el aporte de oxígeno al corazón es insuficiente para cubrir sus necesidades metabólicas. La reinstauración del flujo sanguíneo es indispensable para evitar la muerte de las células miocárdicas sometidas a isquemia severa. Sin embargo, aunque la reperfusión se efectúe precozmente, en pacientes con síndrome coronario agudo y elevación del segmento ST no evita, generalmente, la muerte de una proporción variable de miocitos isquémicos. Parte de los miocitos que mueren como consecuencia de un episodio de isquemia transitoria lo hacen en el momento de la reperfusión, y su muerte puede ser evitada con intervenciones aplicadas en ese momento. Este fenómeno se conoce como daño letal por reperfusión y los mecanismos responsables del mismo dependen en parte de la corrección rápida de la acidosis intracelular (paradoja del pH). Aunque la hipercontractura constituye un mecanismo fisiopatológico muy importante en la muerte celular por reperfusión, en los últimos años se ha propuesto que pueden existir mecanismos de daño letal por reperfusión independientes de la hipercontractura. Las mitocondrias, en particular mediante el desarrollo de la transición a la permeabilidad, podrían participar activamente en el daño letal inmediato por reperfusión asociado a la normalización de la acidosis intracelular.

El presente trabajo se dirigió a estudiar el mecanismo molecular responsable del efecto beneficioso de la glicina, un aminoácido citoprotector, en el daño celular por isquemia/reperfusión, y su posible interacción con la aparición de la transición a la permeabilidad mitocondrial. Se utilizaron cultivos de cardiomiocitos adultos (células HL-1) y mitocondrias aisladas de corazón de rata. Los cultivos de cardiomiocitos HL-1 sometidos a isquemia simulada presentaron durante la reoxigenación una muerte celular aguda independiente de hipercontractura y de tipo necrótico, que se asoció a la normalización del pH. La adición de glicina durante la reoxigenación previno completamente, y de manera dosis-dependiente, la muerte celular por necrosis asociada a la normalización del pH. El efecto protector de la glicina no se relacionó con la modificación del pH o del Na^+ intracelulares, con la prevención de la activación de enzimas de degradación ni con la activación de sus receptores de membrana. Sin embargo, la glicina previno el desarrollo de edema mitocondrial y la liberación de calceína, estrategias asociadas a la formación de la permeabilidad, en mitocondrias

aisladas de corazón de rata sometidas a isquemia simulada y posterior reoxigenación, o a un protocolo de sobrecarga de Ca^{2+} bajo condiciones normóxicas. La eficacia de la glicina para prevenir la transición de la permeabilidad mitocondrial fue similar a la de la CsA, un potente inhibidor de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Mediante técnicas de espectroscopía de RMN se observó una reducción significativa del contenido intracelular de glicina durante la reoxigenación, fenómeno que se revertía cuando los cardiomiocitos se reoxigenaban en presencia de glicina extracelular.

En conjunto, estos resultados demuestran que el efecto protector de la glicina durante la reoxigenación está relacionado con la inhibición de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, y que la depleción de la concentración intracelular de glicina que se produce durante la isquemia/reoxigenación aumenta la vulnerabilidad de las células miocárdicas a la muerte celular por necrosis durante los primeros minutos de reoxigenación, por mecanismos independientes de la hipercontractura. Los resultados obtenidos sugieren la participación de la transición de la permeabilidad mitocondrial en este tipo de muerte celular y describen por primera vez el efecto inhibitorio de la glicina sobre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica incluye un amplio espectro clínico que abarca desde la isquemia silente hasta el infarto agudo de miocardio y la muerte súbita y constituye una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en las sociedades desarrolladas. Se calcula que para el año 2020 será la primera causa de mortalidad en todo el mundo.

El substrato de la cardiopatía isquémica es la enfermedad coronaria que estrecha la luz de los vasos y puede llegar a limitar el flujo en el tejido miocárdico. Las consecuencias más importantes de la limitación del flujo miocárdico son las arritmias cardíacas y la muerte celular. El síndrome coronario agudo se define como una alteración aguda de la lesión ateromatosa que produce trombosis intracoronaria es isquemia miocárdica La trombosis puede ser completa o parcial, y puede ser persistente o reversible. En este último caso, la oclusión coronaria trombótica es transitoria y se sigue de reperfusión del tejido isquémico.

La extensión de la necrosis miocárdica que se produce durante el síndrome coronario agudo es el principal factor determinante de la supervivencia y calidad de vida en pacientes con cardiopatía isquémica. La extensión de la necrosis miocárdica depende del daño celular desarrollado durante la oclusión coronaria y del que ocurra durante la reperfusión, ya sea por recanalización espontánea o terapéutica.

Desde el punto de vista terapéutico las principales estrategias encaminadas a disminuir la mortalidad y la morbilidad por cardiopatía isquémica son la detención de la progresión de las lesiones coronarias (control de los factores de riesgo), la prevención de la oclusión coronaria (tratamiento antitrombótico, técnicas percutáneas de intervención intracoronaria, cirugía) y la resolución de la oclusión coronaria cuando ésta se produce causando un cuadro de infarto de miocardio (tratamiento trombolítico, intervención percutánea). Aunque se ha producido una importante disminución de la mortalidad por cardiopatía isquémica en la mayoría de países, las estadísticas de mortalidad evidencian que este éxito es sólo parcial y depende directamente del tiempo que tarda el paciente en llegar al hospital.

Por ello es importante desarrollar nuevas estrategias destinadas a paliar las consecuencias de una oclusión coronaria transitoria de una duración dada. Estas estrategias deben basarse en el potencial efecto beneficioso de intervenciones aplicadas en el momento de la reperfusión, capaces de reducir o prevenir la muerte celular después de un período de isquemia miocárdica severa.

1. NECROSIS MIOCÁRDICA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

1.1. DAÑO INDUCIDO POR LA ISQUEMIA

La isquemia miocárdica aparece cuando el aporte de oxígeno al corazón es insuficiente para cubrir sus necesidades metabólicas. La principal causa de los síndromes coronarios agudos es la disminución de la perfusión miocárdica debida a la obstrucción del flujo coronario (por ejemplo por rotura o erosión de una placa aterosclerótica sobre la que se forma un trombo).

Los cardiomiocitos son capaces de tolerar breves episodios de isquemia si la reperfusión es precoz. Sin embargo cuando la oclusión coronaria se prolonga, se produce una lesión irreversible que provoca necrosis celular. La extensión de la necrosis depende del tamaño del área en riesgo, de la duración de la oclusión coronaria y del flujo colateral residual.

A los pocos segundos de interrumpirse el flujo coronario ya aparecen cambios fisiológicos y bioquímicos característicos de la isquemia. El metabolismo energético aeróbico o mitocondrial pasa a ser anaeróbico. La cadena de transporte electrónico de la membrana interna de la mitocondria se para, el gradiente de H^+ se disipa, y la síntesis de ATP cesa. Puesto que la demanda de energía de los miocitos supera a la energía obtenida a partir de la glucólisis anaeróbica, el ATP que queda disponible es rápidamente hidrolizado por las múltiples ATPasas implicadas en la actividad contráctil y en el mantenimiento de la homeostasis iónica y en consecuencia los niveles de ADP y Pi se acumulan. Este último es el principal responsable del fallo contráctil total que se instaura durante los primeros segundos de isquemia. La reserva de fosfatos de alta energía también disminuye. La acumulación de catabolitos, como lactato y H^+ provenientes de otras vías hace que el pH descienda rápidamente hasta valores de

acidosis severa con lo que se inhibe la glucólisis anaeróbica y se produce un aumento dramático de la osmolaridad intra y extracelular, causando edema intracelular (García-Dorado, 2003; Llevadot González, 2004).

1.1.1. ACIDOSIS E INCREMENTO DE Na^+ INTRACELULAR

Para contrarrestar la acidosis derivada de la puesta en marcha de la glucólisis anaeróbica se activan los sistemas de transporte iónico del sarcolema que van asociados a una entrada de Na^+ al interior celular, como el intercambiador Na^+/H^+ y el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Piper *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 2000). Además, la caída de ATP induce un fallo de la bomba Na^+/K^+ ATPasa del sarcolema. Todos estos fenómenos hacen que la concentración de Na^+ comience a elevarse después de algunos minutos de isquemia. La sobrecarga de Na^+ tiene gran importancia en el daño celular porque el Na^+ es intercambiado por Ca^{2+} mediante el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La dirección del intercambiador y el movimiento neto de cargas positivas viene determinado por las concentraciones intra y extracelulares de Na^+ y Ca^{2+} y del potencial transmembrana (Blaustein & Lederer, 1999). El transporte en modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es de gran importancia cuando la concentración intracelular de Na^+ es elevada, como ocurre durante la isquemia y los primeros minutos de reperfusión.

1.1.2. EDEMA CELULAR ASOCIADO A LA ISQUEMIA

El contenido de agua miocárdica aumenta precozmente en la isquemia severa. La acumulación de productos metabólicos con gran actividad osmótica en el interior de la célula provoca elevaciones severas de la osmolaridad intracelular, que se acompañan de edema osmótico. Sin embargo, tras una fase inicial de generación de edema celular, la capacidad de la mayoría de los metabolitos para atravesar la membrana provoca la desaparición del gradiente osmótico transmembrana y la progresión del edema osmótico se enlentece o detiene. Los cambios en la permeabilidad del sarcolema a distintos iones, y especialmente al Na^+ , también contribuyen a la aparición del edema.

1.1.3. INCREMENTO DE Ca^{2+} INTRACELULAR

Cuando la concentración citosólica de ATP alcanza valores próximos a cero se generan enlaces tipo rigor (enlaces rígidos), independientes de Ca^{2+} , entre la actina y la miosina y se produce contractura isquémica (Allshire *et al.*, 1987). Este fenómeno es de gran importancia en la progresión de daño isquémico porque coincide con el comienzo del aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} y con una aceleración de la hidrólisis de ATP (Steenbergen *et al.*, 1990). La aparición del rigor isquémico tiene lugar normalmente entre 15 y 30 minutos después del inicio de la isquemia y causa un acortamiento en la longitud total de los miocitos en aproximadamente un 50% de su longitud inicial. No se conocen bien los mecanismos que relacionan la aparición del rigor con la elevación del Ca^{2+} (Koretsune & Marban, 1990). El aumento neto de Ca^{2+} citosólico durante la isquemia es atribuido fundamentalmente al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que actúa en modo reverso eliminando Na^+ y favoreciendo la entrada de Ca^{2+} , y posiblemente a una disminución en la recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático.

El incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} activa numerosos enzimas Ca^{2+} -dependientes como las fosfolipasas, las proteasas y las fosfatasas, iniciándose importantes cascadas de señalización intracelular. El grado de sobrecarga de Ca^{2+} citosólico al inicio de la reperfusión es un importante determinante del grado de daño celular asociado a la reperfusión.

1.1.4. COMUNICACIÓN INTERCELULAR

En el tejido miocárdico, los cardiomiocitos están estrechamente interconectados a través de miles de uniones intercelulares distribuidas en los discos intercalares llamadas "gap junctions" (Spray *et al.*, 1985). Las "gap junctions" son regiones altamente especializadas de la membrana plasmática celular que ponen en contacto directo el citoplasma de células adyacentes, garantizando el acoplamiento eléctrico y químico del corazón, y permitiendo que se comporte como un sincitio funcional. La comunicación intercelular mediada por "gap junctions" tiene un papel relevante en la funcionalidad del miocardio pues permite la rápida propagación de la despolarización entre células adyacentes.

En condiciones de isquemia se produce una serie de alteraciones en el comportamiento eléctrico que pueden estar relacionadas con la disminución de la propagación del potencial eléctrico entre células adyacentes, como consecuencia del cierre de las "gap junctions". Además, la aparición de estas anomalías eléctricas coincide temporalmente con el desarrollo de la contractura por rigor (Dekker *et al.*, 1996).

El desacoplamiento eléctrico inducido por la isquemia se ha interpretado como un mecanismo defensivo destinado a limitar la difusión del daño citosólico de célula a célula. Aunque las evidencias existentes sobre el desacoplamiento eléctrico durante la isquemia son muy sólidas estudios recientes demuestran que puede persistir cierta comunicación química residual a través de las "gap junctions" (Ruiz-Meana *et al.*, 2001). Esta comunicación química podría favorecer la propagación del daño isquémico, probablemente debido a la aparición de un gradiente intercelular de ATP que favorecería la disminución de ATP de la célula adyacente, lo suficiente como para inducir el desarrollo de rigor.

1.1.5. FRAGILIDAD ESTRUCTURAL

Previamente al desarrollo de daño irreversible como consecuencia de la isquemia, los miocitos pasan por un estadio de fragilidad estructural en el que, aunque conservan la integridad de su sarcolema, presentan una disminución de su capacidad para soportar una sobrecarga mecánica. Este aumento de la fragilidad del sarcolema/citoesqueleto puede ponerse de manifiesto mediante sobrecarga osmótica (Ruiz-Meana *et al.*, 1995). Por otra parte, las células sometidas a privación energética severa y prolongada presentan un incremento de la susceptibilidad al Ca^{2+} , fenómeno que favorece el colapso estructural de la célula durante la hipercontractura (Ladilov *et al.*, 1997).

La isquemia también favorece la activación de fosfatasa y de proteína quinasas que fosforilan proteínas claves que ponen en marcha complejas cascadas de señalización intracelular, importantes para la supervivencia y la función celular. Las proteasas no lisosomales dependientes de Ca^{2+} , conocidas como calpaínas, son activadas durante la isquemia provocando lesiones en el citoesqueleto y en sus anclajes al sarcolema. La activación de fosfolipasas como la PLA_2 daña la estructura

Aunque la reperfusión tiene siempre un efecto beneficioso – mayor o menor dependiendo del momento en que se aplique - sobre el tamaño de la necrosis y sobre la función del ventrículo izquierdo, este efecto beneficioso está atenuado por la ocurrencia de efectos colaterales adversos sobre las células reperfundidas, lo que se conoce como daño letal por reperfusión (Piper *et al.*, 1998).

El daño letal por reperfusión se define como el daño causado por la reinstauración del flujo sanguíneo después de un período isquémico y que es capaz de producir la muerte de células que todavía no estaban irreversiblemente dañadas durante la isquemia previa. El daño por reperfusión tiene el potencial interés terapéutico de que puede prevenirse mediante intervenciones aplicadas en el momento de la reinstauración del flujo.

Hay que distinguir entre el daño letal inmediato por reperfusión y el daño letal tardío por reperfusión. El daño letal inmediato por reperfusión tiene lugar durante los primeros minutos de reinstauración del flujo y produce la muerte de los miocitos por necrosis (Piper & Garcia-Dorado, 1999). El daño letal tardío por reperfusión puede desarrollarse a lo largo de las horas siguientes, o incluso días después de la reinstauración del flujo y se debe fundamentalmente a la llegada de células sanguíneas al miocardio reperfundido y a la puesta en marcha de una respuesta inflamatoria (Jordan *et al.*, 1999).

1.2.1. DAÑO LETAL INMEDIATO POR REPERFUSIÓN.

La reperfusión del miocardio isquémico produce la reinstauración de la síntesis de ATP y la normalización del pH y de la osmolaridad del medio extracelular. Aunque la recuperación energética es imprescindible para reinstaurar las funciones celulares, el ATP en presencia de concentraciones elevadas de Ca^{2+} puede inducir la hipercontractura una vez se normaliza el pH intracelular. Además, la rápida recuperación de la energía celular va acompañada de un abrupto aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. La normalización del pH intracelular lleva asociada una sobrecarga de Na^+ debido a la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. El aumento en la concentración intracelular de Na^+ y la despolarización de la célula después de un largo período de isquemia, favorece que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ funcione en modo reverso durante los primeros minutos de

reperfusión, eliminado Na^+ e introduciendo Ca^{2+} al interior celular, lo que empeora la sobrecarga de Ca^{2+} (Inserte *et al.*, 2002).

La sobrecarga de Ca^{2+} durante el inicio de la reperfusión es un importante determinante de la aparición de hipercontractura y de arritmias de reperfusión. El exceso de Ca^{2+} es, en parte, captado por el retículo sarcoplasmático, pero como excede su capacidad de almacenamiento vuelve a ser liberado, lo que establece un círculo de captación-liberación (oscilaciones de Ca^{2+}) que puede acabar por inducir la hipercontractura celular. Las mitocondrias también pueden captar Ca^{2+} durante la reperfusión, pero la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial puede tener consecuencias letales para la célula porque puede inducir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial una vez se ha normalizado el pH.

Las anomalías en la concentración intracelular de Ca^{2+} pueden provocar la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , en particular de proteasas y de fosfolipasas (Cummings *et al.*, 2000; Goll *et al.*, 2003). Aunque el Ca^{2+} ya se encuentra elevado durante la isquemia, la actividad de ciertas enzimas puede aumentar considerablemente durante la reperfusión debido a la corrección de la acidosis intracelular, como es el caso de la calpaína. Estas proteasas pueden causar daño celular al actuar sobre proteínas estructurales contribuyendo a la ruptura del sarcolema y a la muerte celular.

1.2.2. DAÑO LETAL TARDÍO POR REPERFUSIÓN.

Tras un período de isquemia miocárdica se produce una disfunción endotelial aguda que resulta en una disminución de la reactividad vascular frente a las células sanguíneas (Tsao *et al.*, 1990). Los estudios experimentales han demostrado que en el fenómeno de "no reflujo" juegan un papel fundamental los leucocitos polimorfonucleares (PMN) activados y su interacción con el endotelio microvascular y las plaquetas. Por una parte, la isquemia/reperfusión induce la producción y liberación de radicales libres, citocinas y otros mediadores proinflamatorios, que activan tanto el endotelio vascular coronario como los neutrófilos de la circulación coronaria. Por otra parte, en estas condiciones se observa una disminución en la producción endotelial de NO, agente vasodilatador responsable de mantener la homeostasia vascular, e inhibidor de la adhesión de los neutrófilos. Estos factores quimiotácticos inducen la

expresión de moléculas de adhesión en la superficie del endotelio y de los neutrófilos, como las selectinas (P-selectina, L-selectina y E-selectina), las β_2 -Integrinas (complejo CD11/CD18) y la familia de inmunoglobulinas (ICAMs, VCAMs, PECAMs).

Los neutrófilos participan activamente en la respuesta inflamatoria que acontece durante la reperfusión. Existe una correlación directa entre la duración de la isquemia, el tamaño del infarto y el acúmulo de neutrófilos en el miocardio (Barrabés *et al.*, 1996a). La participación de los neutrófilos en el daño microvascular se inicia con su activación y reclutamiento, mediado por factores quimiotácticos liberados por el miocardio isquémico, como el fragmento C5a del complemento y citoquinas como el TNF- α , y las IL-6 y IL-8. Los neutrófilos enlentecen su flujo y empiezan a interactuar con el endotelio mediante un fenómeno de rodamiento a lo largo de la superficie endotelial, gracias a la interacción entre moléculas de adhesión del endotelio como la p-selectina y la glicoproteína PSGL-1 de la superficie de los neutrófilos. Tras la adhesión ligera al endotelio se establece una unión firme de los neutrófilos al endotelio gracias a la interacción entre el complejo CD11/CD18 de los neutrófilos y las moléculas de adhesión ICAMs, lo que favorece la migración transendotelial de los neutrófilos hacia el parénquima miocárdico. En su camino, los neutrófilos liberan colagenasas, elastasas y radicales libres de oxígeno que favorecen el daño tisular a la vez que facilitan su camino. La firme unión de los neutrófilos al endotelio capilar provoca obstrucción mecánica del flujo, al tiempo que la reserva vasodilatadora de los vasos sometidos previamente a isquemia está alterada debido a la reducción en la generación de factores vasodilatadores como NO y las prostaciclina y al aumento en la producción de endotelina. Igualmente existe una interacción directa entre neutrófilos activados y plaquetas, que a su vez liberan productos que reclutan más plaquetas activadas, colaborando en el daño tisular y favoreciendo la vasoconstricción que, en último término, acaba limitando el flujo en la microcirculación (Vinten-Johansen, 2004).

2. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DAÑO LETAL INMEDIATO POR REPERFUSIÓN

2.1. HIPERCONTRACTURA

La hipercontractura constituye el mecanismo fisiopatológico más importante de la muerte celular que tiene lugar durante los primeros minutos de la reperfusión. La hipercontractura es un acortamiento brusco de la longitud celular debido a una activación exagerada de la maquinaria contráctil. Esta sobrecarga mecánica se produce cuando se normalizan los niveles de ATP en presencia de una concentración anormalmente elevada de Ca^{2+} citosólico., una vez que se ha corregido la acidosis. La sobrecarga mecánica causada por esta contractura, al actuar sobre estructuras fragilizadas por la isquemia, destruye la arquitectura celular y rompe el sarcolema causando la muerte celular y dando lugar al cuadro histológico de necrosis en bandas de contracción (Ganote, 1983; Garcia-Dorado *et al.*, 1992a). Este patrón constituye aproximadamente el 90% de la extensión total de la necrosis miocárdica cuando la reperfusión se produce precozmente, es decir, en el momento en que se consigue salvar el miocardio en riesgo (Solares *et al.*, 1995). Estudios realizados en el miocardio in situ muestran una estrecha correlación entre la necrosis en bandas de contracción y la magnitud del acortamiento de la longitud diastólica en un segmento miocárdico, así como con la liberación enzimática durante los primeros minutos de la reinstauración del flujo sanguíneo (Barrabés *et al.*, 1996b), lo que demuestra que la necrosis post-isquémica y el desarrollo de hipercontractura son fenómenos relacionados.

Durante los primeros minutos de reperfusión el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} no induce una activación contráctil excesiva debido a la presencia de acidosis intracelular. Sin embargo, las oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular, que persisten incluso después de la corrección del pH, pueden ir asociadas a una activación contráctil máxima (Siegmund *et al.*, 1997). La recuperación contráctil es más rápida que la normalización de los niveles de Ca^{2+} citosólico lo que produce una contracción incontrolada dependiente de Ca^{2+} . El mecanismo por el que se produce la hipercontractura asociada a la sobrecarga de Ca^{2+} en células reoxigenadas ha sido caracterizado por Siegmund y cols (Siegmund *et al.*, 1992) en experimentos realizados con miocitos aislados en los que se monitorizó la concentración de calcio intracelular, tras someter las células a 60 minutos de anoxia seguida de reoxigenación. Observaron

que la reoxigenación producía una rápida caída en el Ca^{2+} citosólico seguida por un período de oscilaciones de Ca^{2+} y finalmente un restablecimiento del control de los niveles de Ca^{2+} basal. La caída inicial de Ca^{2+} y las oscilaciones siguientes están producidas por el secuestro temporal del exceso de Ca^{2+} citosólico dentro del retículo sarcoplasmático y de la mitocondria. Cuando se satura la capacidad máxima de almacenamiento del retículo se inicia un ciclo de liberación-recaptación de Ca^{2+} que contribuye a la aparición de hipercontractura. La frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} depende del influjo de Ca^{2+} a través del sarcolema durante los primeros minutos de reoxigenación a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que funciona en modo reverso, debido a que durante este período el gradiente de Na^+ transarcolema aún esta reducido, con lo que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ elimina Na^+ al espacio extracelular. Por ello la restauración de un gradiente de Na^+ suficiente a través de la membrana es un requisito indispensable para la extrusión del Ca^{2+} (Piper *et al.*, 2004).

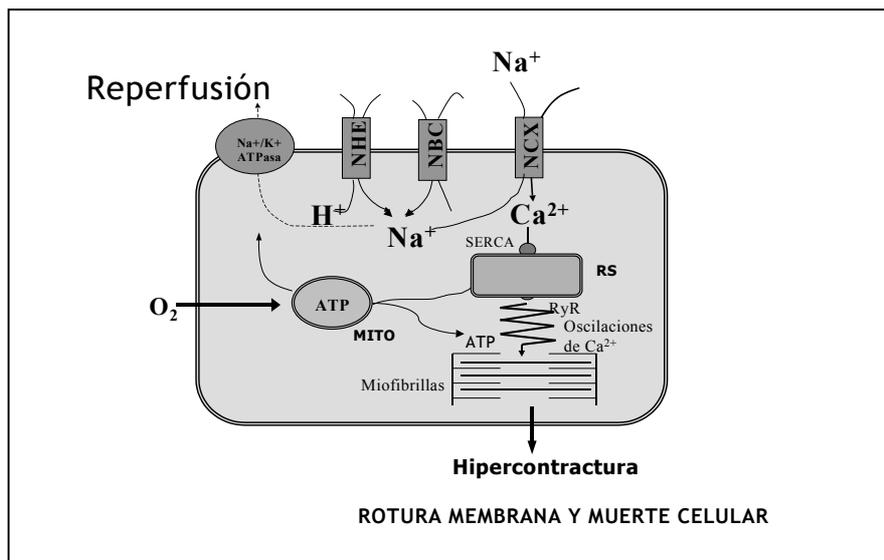


Figura 2: Desarrollo de hipercontractura durante la reperfusión. Durante la isquemia, los cardiomiocitos acumulan Ca^{2+} debido a la sobrecarga inicial de Na^+ y a la subsiguiente entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) que funciona en modo reverso. Durante los primeros minutos de reperfusión continua entrando Ca^{2+} , debido al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que todavía funciona en modo reverso, pero la síntesis *de novo* de ATP permite que el exceso de Ca^{2+} citosólico sea secuestrado por el retículo sarcoplasmático (RS) y por la mitocondria (MITO), iniciándose un ciclo de liberación-recaptación de Ca^{2+} como queda reflejado por las oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico. La sobrecarga de Ca^{2+} contraída durante la isquemia y agravada durante los

primeros minutos de reperfusión inducen una activación exagerada de la maquinaria contráctil, lo que lleva al desarrollo de hipercontractura.

Estudios experimentales realizados en corazón porcino *in situ* y en cardiomiocitos aislados han demostrado que la hipercontractura inducida por la reoxigenación puede prevenirse si la maquinaria contráctil de los miocitos se inhibe en la primera fase de la recuperación energética (Siegmund *et al.*, 1991; Garcia-Dorado *et al.*, 1992a) durante el tiempo suficiente para restablecer el control de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Parte de los efectos beneficiosos del GMPc y de la acidosis citosólica pueden atribuirse a una inhibición de la contractilidad, ya que estos agentes disminuyen la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} .

2.2. COMUNICACIÓN INTERCELULAR DURANTE LA REPERFUSIÓN

En los infartos miocárdicos secundarios a una oclusión coronaria y reperfusión, las áreas de necrosis en bandas de contracción están constituidas por miocitos no viables conectados entre ellos de manera continua (Solares *et al.*, 1995). Estudios de simulación por computador sugieren que para explicar esta geometría es necesario tener en cuenta las interacciones célula a célula, que parece que participan activamente en la expansión de la necrosis celular (Garcia-Dorado *et al.*, 1989; Garcia-Dorado & Ruiz-Meana, 2000).

La hipercontractura va asociada a cambios en la composición citosólica y en la geometría celular y probablemente origina interacciones físicas y químicas entre las células adyacentes. Esta interacción se ha demostrado en parejas de cardiomiocitos conectados entre sí a través de "gap junctions" sometidos a isquemia simulada, en los que se observó que el desarrollo de hipercontractura en una de las células va seguido por el desarrollo casi simultáneo de hipercontractura en la célula contigua. En contraposición, esta simultaneidad en el desarrollo de hipercontractura no se observó si las células estaban próximas pero no tenían contacto físico (Garcia-Dorado *et al.*, 1997b). La transmisión de hipercontractura en parejas de células conectadas fue mediada por "gap junctions", ya que pudo inhibirse con bloqueantes de las "gap junctions" (Garcia-Dorado *et al.*, 1997b).

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la propagación de la hipercontractura entre miocitos adyacentes está mediada por la transmisión del Na^+ a través de las "gap junctions" y de su intercambio por Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la célula adyacente (Ruiz-Meana *et al.*, 1999), La propagación de la hipercontractura entre células contiguas favorece la expansión del infarto de miocardio y puede modificarse farmacológicamente (Garcia-Dorado *et al.*, 1997b).

2.3. EDEMA CELULAR ASOCIADO A LA REPERFUSIÓN

La reperfusión tras un período prolongado de isquemia se acompaña de un aumento brusco y masivo del contenido miocárdico de agua. Este incremento afecta sobretudo al espacio intracelular. El mecanismo del edema celular por reperfusión es múltiple; en parte se debe a la generación de un gradiente osmótico y en parte se debe a mecanismos iónicos relacionados con la sobrecarga de Na^+ causada por el período previo de isquemia.

Durante la reperfusión el fluido intravascular hiperosmótico es sustituido rápidamente por sangre normosmótica lo que crea un gradiente osmótico entre el espacio intra y extravascular. A medida que el agua se desplaza hacia el espacio intersticial y los iones osmóticamente activos son lavados, disminuye la osmolaridad de este espacio. Se crea entonces un gradiente osmótico a través de las membranas de los miocitos viables, que tienen una elevada concentración de catabolitos intracelulares y que resulta en edema celular. La magnitud del edema celular depende principalmente de la duración y severidad del episodio isquémico previo (Garcia-Dorado *et al.*, 1993).

La importancia del edema osmótico durante la reperfusión se ha demostrado en experimentos en los que se ha realizado una reperfusión hiperosmótica usando manitol como agente osmótico (Garcia-Dorado *et al.*, 1992b). El aumento de la osmolaridad durante la reperfusión inicial se ha relacionado con una disminución del edema miocárdico. El efecto de la reperfusión hiperosmótica sobre la necrosis miocárdica es más controvertido. Algunos autores no observan ningún efecto beneficioso sobre el tamaño del infarto cuando la reperfusión se realiza en presencia de manitol (Klein *et al.*, 1985), mientras que otros estudios demuestran una reducción significativa en el

contenido de agua y en el tamaño del infarto en corazones in situ que recibieron una reperfusión hiperosmótica tras la oclusión coronaria (Garcia-Dorado *et al.*, 1992b).

Además del gradiente osmótico, otros mecanismos deben contribuir al edema celular durante la reperfusión. Estudios recientes han demostrado un rápido e importante aumento del contenido de agua en el miocardio reoxigenado a pesar de que en el modelo de anoxia/reoxigenación no se genera un gradiente osmótico apreciable. La inhibición del intercambio Na^+/H^+ durante la anoxia, pero no durante la reoxigenación, previene el edema, y este acúmulo es aditivo con el de la inhibición del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Estas observaciones sugieren que durante la reoxigenación la rápida corrección de los desequilibrios iónicos causados por privación energética, y en especial del acúmulo de Na^+ y HCO_3^- se acompaña de ganancia neta de agua (Inserte *et al.*, 1997).

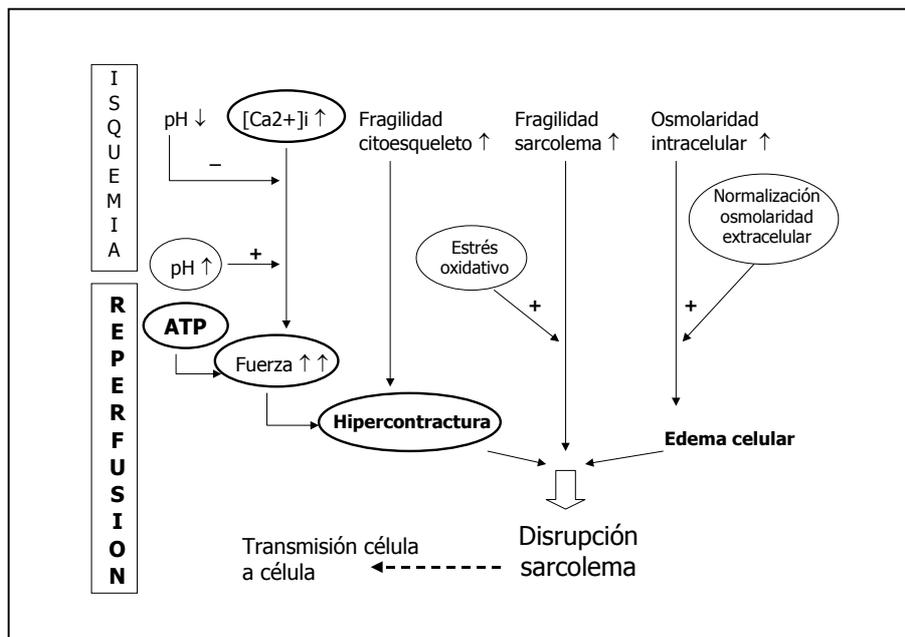


Figura 3: Modelo fisiopatológico de daño mecánico letal por reperfusión.

Basado en Ruiz-Meana M, *Mecanismo del daño mecánico letal por reoxigenación en miocitos cardíacos*. Tesis Doctoral (1997).

3. LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias son orgánulos celulares, presentes en todos los organismos eucariotas, cuya función principal es suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. Las mitocondrias juegan un importante papel en la supervivencia celular, aunque en los últimos años su activa participación en los procesos de muerte celular ha sido objeto de investigación en múltiples áreas. En este sentido, las anomalías en la función y estructura de las mitocondrias se han encontrado cada vez con mayor frecuencia asociadas a enfermedades cardiovasculares, como la miocardiopatía dilatada e hipertrófica, defectos en la conducción cardíaca y muerte súbita, miocardiopatía isquémica y alcohólica, y miocarditis. Algunas anomalías mitocondriales pueden tener una base genética, mientras que otras parecen ser debido a agresiones cardiotóxicas más esporádicas o ambientales, o a causas todavía no identificadas.

3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias son orgánulos de forma oval, de 0.5 a 1 μm de diámetro y una longitud aproximada de 2 μm , cuya función principal es la de proporcionar la energía necesaria a la célula. Poseen dos membranas altamente especializadas: una de ellas lisa, localizada en la parte externa de la mitocondria, y la otra muy plegada, localizada en la parte más interna. Cada pliegue de la membrana mitocondrial interna se denomina cresta, y se encuentra delimitando la matriz mitocondrial. El espacio entre ambas membranas se denomina espacio intermembrana.

La membrana externa de las mitocondrias es bastante permeable a moléculas pequeñas y iones, y aunque el mecanismo de regulación de esta permeabilidad no se conoce bien parece estar relacionado con una proteína de transporte llamada porina o VDAC ("voltage-dependent anion channel"), que se encuentra formando poros o canales acuosos no específicos a través de la bicapa que permiten la libre difusión de moléculas de PM inferior a 5000 Da. La membrana mitocondrial interna es muy impermeable a casi todos los iones y a la mayoría de las moléculas con carga. Contiene una elevada proporción de un fosfolípido llamado cardiolipina, responsable de la impermeabilidad de la membrana mitocondrial a los iones, además de diversas proteínas transportadoras encargadas de mantener la homeostasis iónica mitocondrial

y de permitir el intercambio ATP/ADP. En la membrana interna es donde tiene lugar la fosforilación oxidativa (Alberts *et al.*, 1994). La fosforilación oxidativa o cadena de transporte electrónico es un proceso bioquímico que consiste en la transferencia de electrones de los equivalentes reducidos NADH, NADPH y FADH obtenidos en la glicólisis y en el ciclo de Krebs hasta el oxígeno molecular, proceso acoplado a la síntesis de ATP.

Las mitocondrias son muy abundantes en el corazón, por ser un tejido de gran demanda energética, donde constituyen un 20-40 % del volumen celular. La producción energética mitocondrial depende de factores genéticos, codificados por el núcleo y por el ADN mitocondrial, que modulan la función mitocondrial normal incluyendo la actividad enzimática y la disponibilidad de cofactores, y de factores ambientales, como la disponibilidad de combustibles (ácidos grasos, azúcares y proteínas).

Diversas vías bioenergéticas interaccionan contribuyendo al metabolismo energético mitocondrial: la oxidación del piruvato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la betaoxidación de los ácidos grasos y la vía final común de la fosforilación oxidativa, que genera el 80-90 % del ATP celular. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo a partir de complejos enzimáticos localizados en la membrana mitocondrial interna, que incluyen los complejos I-IV de la cadena respiratoria de transporte de electrones, la ATP sintasa, y la translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT). Los ácidos grasos son el principal sustrato energético para la producción de ATP en el músculo cardíaco a partir de la fosforilación oxidativa. La betaoxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los hidratos de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos genera la mayor parte del NADH y del FADH intramitocondriales, que son la fuente directa de electrones para la cadena de transporte electrónico.

El aporte de ATP a partir de otras fuentes, como por ejemplo el metabolismo glucolítico, es limitado en el tejido cardíaco normal. Además de las vías bioenergéticas y de los intermediarios metabólicos, el corazón contiene fosfatos de alta energía, como la fosfocreatina producida por la creatinquinasa mitocondrial a partir del ATP del ANT, estrechamente relacionada y de la sintasa de ATP mitocondrial (Marín-García & Goldenthal, 2002).

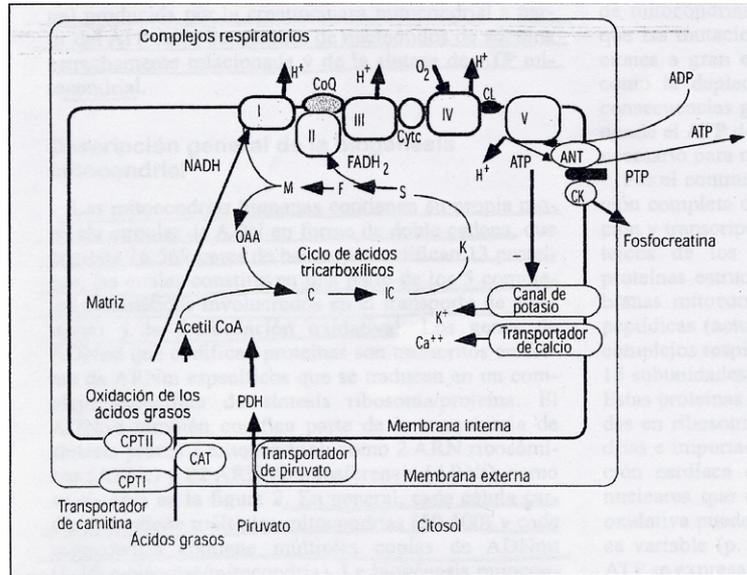


Figura 4: Vías energéticas mitocondriales. Los complejos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico están localizados en la membrana mitocondrial interna, mientras que en el interior de la matriz encontramos los enzimas que participan en las vías de oxidación del piruvato, la betaoxidación de los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. CoQ: coenzima Q; Cyt_c: citocromo c; ANT: translocasa de nucleótidos de adenina; CK: creatinquinasa mitocondrial. Basado en Marín-García J et al., Rev Esp Cardiol. 55 (2002).

Además de la síntesis de ATP, la mitocondria participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} . El Ca^{2+} entra en la mitocondria a favor de gradiente electroquímico, a través de su transportador en la membrana mitocondrial interna (el "uniporter" de Ca^{2+}), y sale intercambiándose con Na^+ a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Estos dos sistemas, junto con el intercambiador Na^+/H^+ , establecen un transporte cíclico de Ca^{2+} a través de la membrana interna de la mitocondria. En condiciones fisiológicas la mitocondria secuestra Ca^{2+} del citosol para que más tarde sea liberado y recaptado por el retículo endoplasmático, existiendo así un continuo intercambio entre ambos orgánulos (Duchen, 1999). La acumulación excesiva de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en determinadas condiciones puede tener un efecto letal para la célula.

3.2. PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

En condiciones fisiológicas normales la membrana interna de la mitocondria es impermeable a la mayoría de iones y metabolitos, lo que permite mantener el gradiente de H^+ necesario para la síntesis de ATP. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, se produce la apertura de un megacanal no específico, conocido como poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm), que destruye la impermeabilidad de la membrana ya que permite la libre difusión de cualquier molécula de peso molecular inferior a 1.5 kDa (Crompton, 1999).

El PTPm es un complejo multiproteico dinámico, localizado en los puntos de contacto de la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria, que en condiciones fisiológicas tiene una configuración cerrada. Una consecuencia directa de la apertura del PTPm es la aparición de edema mitocondrial debido, principalmente, a la entrada de agua al interior de la matriz como consecuencia del gradiente osmótico. Aunque los pliegues o crestas que forman la estructura de la membrana interna mitocondrial permiten que ésta se expanda sin llegar a romperse, la membrana mitocondrial externa puede romperse debido al edema y liberar proteínas del espacio intermembrana, como el citocromo c y otros factores proapoptóticos, que participan de manera activa en el inicio de la muerte celular por apoptosis. Otra consecuencia de la apertura del PTPm es la disipación del potencial de membrana y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, de manera que la actividad ATPasa mitocondrial se revierte, y el ATP se hidroliza en lugar de sintetizarse. En estas condiciones, la concentración de ATP empieza a declinar rápidamente, alterando la homeostasis iónica y metabólica e induciendo la activación de enzimas de degradación, como las fosfolipasas, las nucleasas y las proteasas. A menos que se produzca el cierre del PTPm, esta cadena de sucesos ocasionará un daño celular irreversible que resultará en muerte celular por necrosis. Incluso en el caso de que se produzca el cierre del PTPm, el edema mitocondrial originado y la ruptura de la membrana externa pueden ser suficientes para inducir la cascada de apoptosis. La conductancia del poro es tan grande que la apertura de unos pocos, ya es suficiente para causar despolarización, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y edema mitocondrial (Lemasters, 1999).

Uno de los principales responsables de la apertura del PTPm es la sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, especialmente cuando va acompañado de estrés

oxidativo, depleción de nucleótidos de adenina, concentraciones elevadas de fosfatos y despolarización mitocondrial. Estas condiciones son exactamente aquellas que tienen lugar durante la reperfusión del miocardio postisquémico. Por todo ello, cada vez existen más evidencias de la implicación del PTPm en la aparición del daño irreversible por reperfusión (Halestrap *et al.*, 2004).

3.2.1. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.

La composición molecular exacta del PTPm todavía no se conoce con exactitud. Parece ser que los componentes estructurales principales son el intercambiador de nucleótidos de adenina (ANT) de la membrana mitocondrial interna, cuya función principal es la de transportar ATP y ADP a través de la membrana, la ciclofilina D (CyP-D), proteína de la matriz mitocondrial con actividad isomerasa, y la porina, también llamada VDAC, de la membrana mitocondrial externa. Existen otras proteínas, como el receptor de benzodiazepinas, la hexoquinasa y la creatinquinasa, que actuarían como moléculas reguladoras (Weiss *et al.*, 2003).

Todavía no se conoce bien cuál es el mecanismo molecular que induce la apertura del PTPm. Algunos estudios han sugerido que la formación del PTPm tiene lugar por la unión del Ca^{2+} al ANT y por la actividad isomerasa de la CyP-D que producirían un cambio conformacional en la proteína ANT convirtiéndola en un canal no específico. La unión de los nucleótidos de adenina al ANT está favorecida por el potencial de membrana, de manera que en condiciones de desenergización, el Ca^{2+} , que compite con los nucleótidos de adenina por el lugar de unión al ANT, puede unirse él favoreciendo la apertura del PTPm (Halestrap *et al.*, 2004). Sin embargo, otras observaciones recientes sugieren que el ANT no participa directamente en la apertura del PTPm (Kokoszka *et al.*, 2004). Cada vez existen más evidencias que implican directamente al VDAC en la apertura del PTPm (Cesura *et al.*, 2003, Granville & Gottlieb, 2003)

3.2.2. REGULACIÓN DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.

Se sabe que la probabilidad de apertura del PTPm está aumentada en presencia de una sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, por el estrés oxidativo (que

favorece la modificación de los grupos tiol del ANT, induciendo la unión a la CyP-D), por la disipación del potencial de membrana (que favorece la unión del ANT al Ca^{2+}) y por valores de pH > a 7.0 (ya que los H^+ son un potente inhibidor de la unión del Ca^{2+} al ANT). La familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2, mediante su translocación a la mitocondria y la unión a componentes de la membrana mitocondrial externa también promueven la apertura del PTPm, aunque se desconoce por que mecanismos (Weiss *et al.*, 2003).

La ciclosporina A (CsA) actúa como potente inhibidor de la apertura del PTPm al prevenir la unión del ANT a la CyP-D. Recientemente se ha descrito otro inhibidor, la Sanglifehrina A (SfA), que actuaría por un mecanismo distinto a la CsA, al inhibir la actividad isomerasa de la CyP-D, impidiendo el cambio conformacional del ANT, necesario para la inducción del PTPm (Clarke *et al.*, 2002). Aunque el inhibidor más potente de la apertura del PTPm en mitocondrias aisladas es la CsA, su efecto puede ser anulado por concentraciones suficientemente elevadas de Ca^{2+} , lo que sugiere que el principal papel de la unión de la CyP-D a otros componentes sería aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} . Además, la eficacia de la CsA en células intactas es inconsistente debido a su incapacidad por controlar otros factores citoplasmáticos que podrían favorecer la apertura del PTPm. Otros inhibidores de la apertura del PTPm son los nucleotidos de adenina (inhiben la unión del Ca^{2+} al ANT), el Mg^{2+} (que compite con el Ca^{2+} por el lugar de unión al ANT), la acidosis, las poliaminas, y la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, como la Bcl-2 y la Bcl-x_L (Weiss *et al.*, 2003)

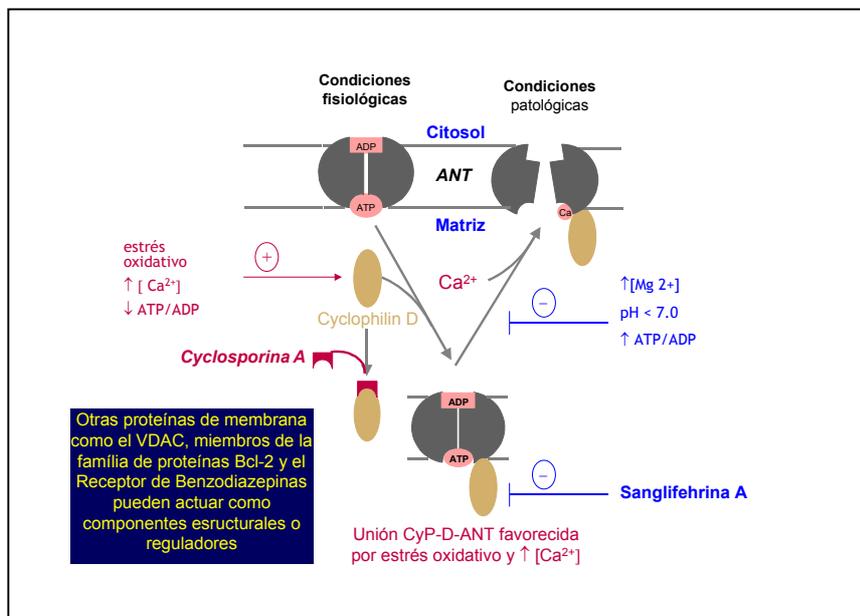


Figura 5: Mecanismo molecular de apertura del PTPm.

Basado en Halestrap AP et al., Cardiovasc Res 61 (2004)

3.2.3. CONTRIBUCIÓN DEL PTPm EN EL DAÑO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN.

En cardiomiocitos la función principal de la mitocondria es proporcionar ATP a través de la fosforilación oxidativa, para satisfacer la elevada demanda energética que requiere el corazón. En una situación de anoxia o isquemia, el suplemento de oxígeno disminuye y la fosforilación oxidativa cesa, disminuye la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos y la producción de ATP se deteriora. La disminución de la concentración de nucleótidos de adenina y la acumulación de fosfatos de alta energía que se produce durante la isquemia, así como el aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ sensibilizan al PTPm a abrirse. Sin embargo, el PTPm permanece cerrado debido a la acidosis intracelular, que es un potente inhibidor de la apertura del PTPm, aunque si el período de isquemia es suficientemente prolongado la célula sufre un daño irreversible debido a la activación de enzimas de degradación como las fosfolipasas y proteasas, que por si mismas pueden comprometer la función mitocondrial.

Durante la reperfusión la mitocondria recupera su capacidad funcional y de síntesis de ATP, de manera que empieza a recaptar el exceso de Ca²⁺ citosólico, que se acumula en la matriz. Sin embargo, la rápida corrección de la acidosis intracelular junto con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno como consecuencia del

funcionamiento de nuevo de la cadena respiratoria, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y de fosfatos de alta energía, y a la baja concentración de nucleótidos de adenina que se producen durante la reperfusión, representan un escenario óptimo para que se produzca la apertura del PTPm. Si el insulto causado por la isquemia/reperfusión no es muy grave, la mitocondria puede sufrir una permeabilidad transitoria, seguida de cierre del poro, que le permite deshacerse del exceso de Ca^{2+} (Ichas *et al.*, 1997). Si el número de mitocondrias sanas es suficiente, se restablece la síntesis de ATP y el Ca^{2+} liberado por las mitocondrias permeabilizadas puede ser recaptado de nuevo. Por ello el balance entre el número de mitocondrias permeabilizadas y el número de mitocondrias no permeabilizadas será crítico para determinar si la célula sobrevive o muere. Cuando la célula presenta muchas mitocondrias permeabilizadas se libera gran cantidad de Ca^{2+} al citosol y se hidroliza el ATP, lo que conduce a una situación de daño irreversible y muerte por necrosis.

La apertura transitoria del PTPm puede tener implicaciones a largo plazo porque puede iniciar la muerte celular programada por apoptosis. La apertura del PTPm está asociada a la aparición de edema mitocondrial, que puede producir una expansión de la membrana mitocondrial interna suficiente como para producir la ruptura de la membrana mitocondrial externa, liberándose proteínas localizadas en el espacio intermembrana y factores proapoptóticos como el citocromo c o el AIF-1 ("apoptosis-inducing activating factor 1"). Una vez en el citosol, el citocromo c, la procaspasa 9 citosólica y el AIF-1 forman un complejo proteico llamado apoptosoma que activa la caspasa 9, que a su vez activa la caspasa 3, iniciándose la cascada apoptótica. Esta proteasa es la responsable de la proteólisis de una serie de proteínas implicadas en el mantenimiento del citoesqueleto, de la membrana plasmática y del núcleo, que originan los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Zimmermann *et al.*, 2001). Se ha escrito que la familia de proteínas Bcl-2 podrían interactuar con componentes del PTPm, probablemente con el complejo VDAC-ANT-CyP-D y controlar su actividad, regulando la vía apoptótica desencadenada por la mitocondria (Crompton, 1999)

La diferencia entre la muerte celular por necrosis y la muerte celular por apoptosis radica en los niveles de ATP. Para que se ejecute la muerte celular programada se necesita ATP, mientras que la muerte celular por necrosis no depende de ATP. Sólo si el PTPm se abre lo suficiente como para producir la pérdida de citocromo c, pero luego

se cierra para asegurar la producción de ATP, la célula morirá por apoptosis. Un infarto de miocardio reperfundido está constituido en su mayor parte por células necróticas, como se observa por el patrón histológico característico en bandas de contracción, lo que refleja la apertura masiva del PTPm y la disrupción de la función mitocondrial. Sólo en la periferia del infarto, donde el insulto isquémico es menos severo pero la depleción de ATP es suficiente como para inducir la activación transitoria del PTPm, puede producirse muerte por apoptosis (Halestrap *et al.*, 2004). Sin embargo, parece claro que la contribución de la apoptosis al tamaño final de un infarto reperfundido es pequeña.

3.2.4. PTPm COMO DIANA TERAPEUTICA EN EL DAÑO POR REPERFUSIÓN

Si la apertura del PTPm es un factor crítico en la transición del daño por reperfusión reversible al daño por reperfusión irreversible, el desarrollo de inhibidores del PTPm puede constituir una aproximación terapéutica muy eficaz en la prevención del daño por isquemia/reperfusión. Parece claro que las estrategias destinadas a reducir el daño por reperfusión actuarían, o bien disminuyendo la permeabilidad mitocondrial, o bien favoreciendo el cierre del PTPm. Este efecto puede conseguirse a través de una inhibición directa de la apertura del PTPm (con agentes como la CsA o la SfA) o mediante un efecto indirecto a través de la disminución de los factores responsables de la apertura del PTPm como el estrés oxidativo o la sobrecarga de Ca^{2+} .

4. LA GLICINA

La glicina es un aminoácido no esencial que consiste en un único átomo de carbono unido a un grupo amino y a un grupo carboxilo, con un grupo R no polar hidrofóbico. La síntesis de glicina tiene lugar, principalmente, a partir del 3-D-fosfoglicerato, intermediario de la vía glicolítica, el cual, a través de compuestos fosforilados (fosfohidroxipiruvato y fosfoserina) da lugar a serina y a glicina.

La glicina es un aminoácido glucogénico: se degrada a piruvato y este a acetil-CoA, que entra en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs), a partir del cual se sintetiza glucosa por la vía de la gluconeogénesis.

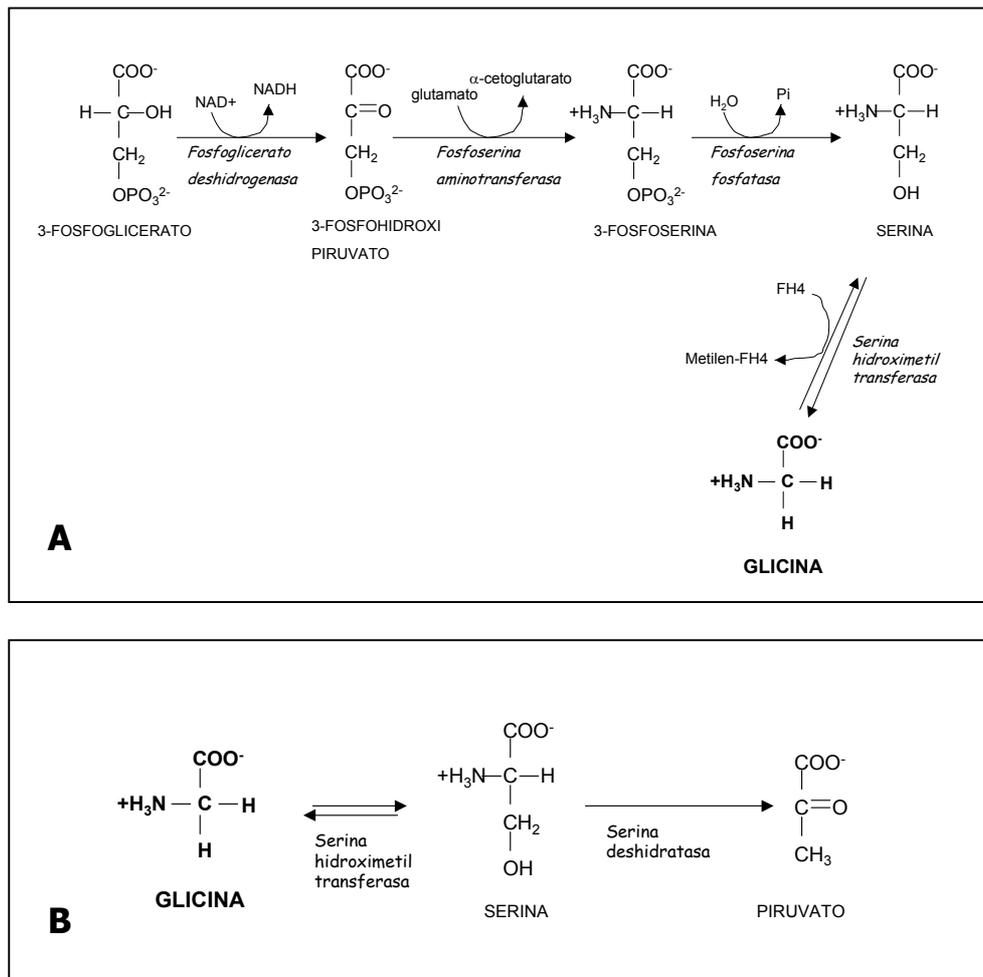


Figura 6: Síntesis (A) y degradación (B) de la glicina.

En cuanto a sus funciones biológicas, además de ejercer un papel muy importante en la estructura de ciertas proteínas debido a su pequeño tamaño, la glicina constituye uno de los principales neurotransmisores inhibidores del SNC de vertebrados. Se encuentra a concentraciones elevadas en la médula espinal y en bulbo raquídeo y está implicada en el comportamiento motor. Además de su función como mediador biológico, la glicina es precursora de ciertas biomoléculas: se incorpora en forma intacta como constituyente de las purinas; contribuye a la síntesis del δ -aminolevulinato, compuesto que se encuentra en el camino de formación de porfirinas; y a la síntesis de glutatión, además de intervenir en la síntesis de proteínas, de nucleótidos y de los ácidos nucleicos.

4.1. LA GLICINA COMO NEUROTRANSMISOR

La glicina actúa como neurotransmisor inhibidor en el sistema nervioso central (Rajendra *et al.*, 1997). La neurotransmisión mediada por glicina es esencial para las respuestas reflejas y para el control del movimiento voluntario y el procesamiento de la señal sensorial procedente del bulbo raquídeo. La disrupción de la señal nerviosa mediada por glicina, ya sea por neurotoxinas o por determinados desórdenes hereditarios, resulta en la aparición de movimientos reflejos anormales, pérdida del tono muscular, convulsiones y muerte.

La glicina ejerce su función a través de la activación de receptores específicos localizados en la membrana postsináptica de neuronas de la médula espinal y del bulbo raquídeo. La identidad de la glicina como un neurotransmisor inhibidor fue propuesta inicialmente por Aprison y cols (Aprison & Werman, 1965) y por Davidoff y cols (Davidoff *et al.*, 1967), que describieron en detalle la distribución de la glicina en el SNC. Estudios funcionales posteriores revelaron que la activación del receptor de glicina (RGly) produce un incremento de la conductancia al Cl^- a través de la membrana neuronal postsináptica, hiperpolarizando la membrana y bloqueando así la acción despolarizante de los neurotransmisores excitadores (Kandel *et al.*, 2000). Esta inhibición puede ser bloqueada por la estricnina, un alcaloide vegetal altamente selectivo, a partir del cual se pudo caracterizar funcionalmente la acción de la glicina en el SNC (Young & Snyder, 1973) y purificar el receptor para estudiar su composición (Pfeiffer & Betz, 1981; Pfeiffer *et al.*, 1982)

El RGly es una proteína oligomérica, que junto con los receptores para los neurotransmisores ácido γ -aminobutírico (GABA), acetilcolina y serotonina forma parte de la superfamilia de receptores tipo canales iónicos acoplados a ligando (Pfeiffer *et al.*, 1982). El RGly constituye un complejo pentamérico que forma un canal transmembrana selectivo de cloro. Está formado por tres tipos de subunidades: la subunidad α , de 48 kDa, de unión al ligando, de la que se han descrito 4 isoformas (α_1 , α_2 , α_3 y α_4); la subunidad β , de 58 kDa, de tipo estructural (sólo se ha descrito una isoforma) y una proteína citoplasmática de anclaje, la gefirina, de 93 kDa, que forma un complejo con la región citoplasmática de la subunidad β . Las propiedades funcionales del RGly están relacionadas con la composición de las subunidades del pentámero completo (Rajendra *et al.*, 1997). Las subunidades α pueden formar canales homodímeros, aunque con distinta afinidad por los agonistas, mientras que la subunidad β es incapaz de formar canales por sí misma (Jentsch *et al.*, 2002). La composición de subunidades del RGly varía durante el desarrollo: los receptores fetales de glicina son, probablemente, homómeros de α_2 , mientras que los receptores adultos son heterómeros de las subunidades α y β (Breitinger & Becker, 2002). En este contexto, mutaciones génicas en las subunidades α y β del receptor de glicina originan desórdenes motores hereditarios (Kuhse *et al.*, 1995) y la flaccidez acontecida en el shock espinal está relacionada con concentraciones elevadas de glicina (Simpson, Jr. *et al.*, 1993). Los valores de EC_{50} para la activación de los RGly se encuentran en el rango de concentraciones de 20 a 150 μ M. Estos valores son consistentes con los obtenidos con RGly recombinantes en células de mamífero, sin embargo, muchos RGly recombinantes tienen una menor sensibilidad por la glicina, con EC_{50} en el rango de concentraciones de 0.3 a 1 mM (Rajendra *et al.*, 1997).

4.2. EFECTO CITOPROTECTOR DE LA GLICINA.

Desde la década de los 90 se viene investigando el papel beneficioso que ha demostrado tener la glicina en varios estados patológicos. Varios estudios "in vitro" e "in vivo" han puesto de manifiesto el papel citoprotector de la glicina frente al daño celular inducido por una variedad de estímulos citotóxicos (Wheeler *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2003). En 1987 Weinberg y cols (Weinberg *et al.*, 1987) demostraron el efecto protector de la glicina frente al daño por hipoxia en células tubulares renales. Estudios posteriores confirmaron estos resultados demostrando que la glicina era protectora también en células hepáticas (Marsh *et al.*, 1993). Más tarde se observó que si se

incluía glicina en las soluciones destinadas a la conservación de órganos para trasplante, como la "Caroline rinse solution", se reducía significativamente el daño por reperfusión, mejorando la supervivencia tras el trasplante (Bachmann *et al.*, 1995; Currin *et al.*, 1996). A estos estudios le siguieron otros que demostraban el efecto protector de la glicina frente al daño celular en una variedad de tipos celulares y frente distintos estados patológicos. Por ejemplo, se sabe que un suplemento de glicina en la dieta protege al organismo frente al shock hipovolémico o endotóxico (Ikejima *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1999; Mauriz *et al.*, 2001). Se ha observado que la glicina reduce la concentración de alcohol en el estómago y que aumenta la recuperación de la hepatitis producida por alcohol (Iimuro *et al.*, 1996), que disminuye el daño hepático inducido por fármacos hepatotóxicos (Stachlewitz *et al.*, 1999) y que bloquea la apoptosis (Zhang *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 2003; Omasa *et al.*, 2003). En el riñón disminuye la nefrotoxicidad inducida por el fármaco inmunosupresor ciclosporina A (Thurman *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2001) y reduce la formación de radicales libres inducida por ciclosporina A (Zhong *et al.*, 1998). La glicina puede ser útil en enfermedades con procesos inflamatorios ya que disminuye la formación de citoquinas (Grotz *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Tsune *et al.*, 2003). Datos preliminares procedentes de estudios clínicos parecen indicar efectos beneficiosos de la glicina en humanos tras trasplante de hígado (Schemmer *et al.*, 2001).

Los mecanismos mediante los cuales la glicina ejerce sus acciones beneficiosas aún no han sido identificados. Algunos autores han propuesto que la glicina podría actuar inactivando los mecanismos de señalización celular inducidos por calcio, o por inhibición de la señalización celular inducida por citoquinas durante los procesos inflamatorios. Otros autores proponen un efecto beneficioso de la glicina sobre la formación de radicales libres y otros mediadores tóxicos, o por inhibición de la permeabilización de la membrana celular durante la necrosis por oncosis, etc... En definitiva, los mecanismos implicados en la función protectora de la glicina no están claros, e incluso algunos autores postulan que actuaría a distintos niveles ejerciendo su acción a través de múltiples mecanismos con efectos aditivos o sinérgicos.

4.2.1. RECEPTORES NO NEURONALES DE GLICINA.

Aunque el receptor de glicina se expresa principalmente en tejido nervioso, se ha demostrado su existencia en una variedad de tipos celulares no neuronales. Se ha

localizado en retina (Greferath *et al.*, 1994), en la glándula adrenal (Yadid *et al.*, 1995), en esperma (Meizel, 1997), en células implicadas en la inflamación y en la respuesta inmune, como las células de Kupffer (Ikejima *et al.*, 1997; Froh *et al.*, 2002) y otras células de la serie blanca, como los macrófagos alveolares (Froh *et al.*, 2002), los neutrófilos (Wheeler *et al.*, 2000a), los linfocitos T (Stachlewitz *et al.*, 2000) y los monocitos (Spittler *et al.*, 1999). También se ha descrito en células endoteliales (Yamashina *et al.*, 2001) y en riñón (Heyman *et al.*, 1992; Miller & Schnellmann, 1994a; Venkatachalam *et al.*, 1996).

La activación de los RGly es uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto beneficioso de la glicina en células no neuronales. Algunos trabajos indican que la glicina bloquea el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducido por distintos estímulos, tales como las endotoxinas bacterianas LPS (lipopolisacárido) o PG-PS (peptidoglicano-polisacárido), la D-galactosamina o la ciclosporina A, entre otros (Ikejima *et al.*, 1996; Stachlewitz *et al.*, 1999; Stachlewitz *et al.*, 2000; Wheeler *et al.*, 2000a; Wheeler *et al.*, 2000b; Li *et al.*, 2001). Este efecto puede revertirse al administrar estricnina y prevenirse eliminando el Cl^- del medio extracelular (Waters & Schnellmann, 1998; Wheeler *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2001; Yamashina *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2002), lo que sugiere que la protección ejercida por la glicina sería debida, en parte, a un efecto directo sobre la regulación del calcio intracelular.

Es probable que este mecanismo de acción esté relacionado con la hiperpolarización de la membrana plasmática inducida por la glicina, que conferiría a la célula una menor sensibilidad a estímulos tóxicos. Estos compuestos, al unirse a sus correspondientes receptores y mediante mecanismos acoplados a proteína G, activan la fosfolipasa C produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 induce la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, mientras que a su vez, la despolarización de la membrana plasmática activa canales de Ca^{2+} voltaje dependientes causando un influjo de Ca^{2+} extracelular. El incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico resultante activa una serie de mecanismos implicados en la muerte celular, como la PLA_2 , que induce la formación de ácido araquidónico y la producción de mediadores vasoactivos y quimiotácticos como las prostaglandinas y los leucotrienos. Por otro lado, incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} activan la NADPH oxidasa, aumentando la producción de especies reactivas de O_2 , que no sólo causan daño celular de manera directa, sino que también activan factores de transcripción, como el factor nuclear

NF κ -B, e inducen la producción de citoquinas proinflamatorias y mitógenas como el factor de necrosis tumoral TNF- α y las interleuquinas (IL) 1 y 6 (Matilla *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2003). La glicina al activar sus receptores de membrana induciría una corriente de Cl⁻, produciendo hiperpolarización de la membrana disminuyendo la concentración intracelular de Ca²⁺ y, en consecuencia, inhibiendo la cascada de señalización intracelular inducida por el Ca²⁺.

Sin embargo, existen otros trabajos que sugieren lo contrario. Miller y cols han observado que el efecto de la glicina en células sometidas a hipoxia o inhibición metabólica está mediado por un bloqueo de la entrada de Cl⁻ a la célula, probablemente por bloqueo de sus receptores de membrana (Miller & Schnellmann, 1993; Miller & Schnellmann, 1994b; Miller & Schnellmann, 1995). Dichos estudios se basan en el hecho de que el efecto protector de la glicina puede ser reproducido cuando se elimina el Cl⁻ del medio extracelular o bien cuando se sustituye la glicina por su antagonista en el SNC, la estricnina. Se ha descrito que a concentraciones elevadas la glicina podría actuar desensibilizando el RGly y por lo tanto, bloqueando la entrada de Cl⁻ de manera similar a la estricnina (Tokutomi *et al.*, 1989). La inhibición del influjo de iones Cl⁻ disminuye, consecuentemente, la entrada de iones Na⁺ (Rajendran *et al.*, 1995), por lo que el efecto de la glicina podría estar relacionado con la prevención de la sobrecarga de Na⁺ intracelular al interferir en el influjo de Cl⁻ inducido por la depleción de ATP, minimizando el edema celular previo a la lisis celular (Carini *et al.*, 1997)

4.2.2. EFECTOS DE LA GLICINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES Y MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN.

Las especies reactivas de oxígeno o radicales libres son metabolitos altamente reactivos originados como consecuencia del metabolismo de determinados componentes celulares, o como subproductos de reacciones de transferencia de electrones. Estos compuestos pueden dañar importantes macromoléculas biológicas como los lípidos, las proteínas y el ADN, además de activar toda una serie de enzimas y aumentar la producción de mediadores vasoactivos y factores de transcripción, favoreciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de moléculas de adhesión con efectos muy adversos para la célula. Para protegerse de los efectos dañinos de estos compuestos la célula posee varias enzimas antioxidantes como la superóxido

dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Se habla de estrés oxidativo cuando los mecanismos antioxidantes de la célula no son capaces de superar la generación de radicales libres. El aumento en la producción RLO bajo determinadas condiciones patológicas puede desencadenar toda una serie de alteraciones en los tejidos afectados (Thannickal & Fanburg, 2000)

Algunos estudios indican que la glicina podría actuar disminuyendo el estrés oxidativo originado tras determinadas situaciones patológicas. Por ejemplo, el shock hemorrágico y la posterior reinfusión producen cambios críticos en varios órganos al aumentar la producción de radicales libres de oxígeno y de citoquinas inflamatorias. Recientemente Mauriz y cols (Mauriz *et al.*, 2001) observaron que en ratas alimentadas con una dieta suplementada con glicina al 5% y sometidas a shock hemorrágico y posterior retransfusión presentaban una reducción de los parámetros indicadores de estrés oxidativo, así como un aumento de la actividad de los enzimas hepáticos antioxidantes. Similares resultados se obtuvieron en un estudio anterior (Deters *et al.*, 1997) en el que observaron que la glicina prevenía, de manera dosis dependiente, la necrosis celular, mejorando la función hepática y los índices de peroxidación lipídica inducidos por hipoxia/reoxigenación en células hepáticas. En este sentido se ha observado que ratas tratadas con CsA (fármaco inmunosupresor con alta toxicidad renal) y que recibieron una dieta suplementada con glicina, presentaban una menor producción de radicales libres respecto a las ratas control (Zhong *et al.*, 1998).

Es posible que el efecto ejercido por la glicina sobre la generación de radicales libres se deba a la inhibición de la activación de las células de Kúpffer (Zhong *et al.*, 1999), macrófagos hepáticos productores de radicales libres, minimizando la respuesta inflamatoria progresiva. El estrés oxidativo favorece la producción de citoquinas, como el TNF- α , y la activación de factores de transcripción, como el NF κ -B o la AP-1 (Baldwin, Jr., 1996; Hanada & Yoshimura, 2002). Se ha demostrado que la glicina previene el aumento en la producción de TNF- α mediado por las células de Kúpffer y por macrófagos alveolares como respuesta a endotoxinas y a procesos de isquemia/reperfusión (Ikejima *et al.*, 1996; Ikejima *et al.*, 1997; Grotz *et al.*, 2001).

El efecto inmunomodulador de la glicina también se ha demostrado en células sanguíneas y en monocitos humanos aislados de sangre periférica tratados con lipopolisacárido, en los que se observó una disminución de la síntesis de TNF- α y de

IL-1 β mientras que favorecía la expresión de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Spittler *et al.*, 1999). También se ha demostrado un efecto de la glicina sobre el factor de transcripción NF κ -B. El NF κ -B participa en la respuesta inflamatoria a través de la regulación de genes implicados en la producción de determinadas citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y determinados enzimas inducibles como la COX-2 y la iNOS. La glicina inhibe la activación del NF κ -B y la expresión de iNOS en varios modelos experimentales como la inducción de shock hemorrágico en ratas (Mauriz *et al.*, 2001), y la exposición de macrófagos a endotoxinas (Li *et al.*, 2001).

Algunos autores sugieren un efecto de la glicina sobre otros mediadores lipídicos como las prostaglandinas y leucotrienos (Mangino *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 2001) y sobre enzimas de degradación como las proteasas y fosfolipasas (Nichols *et al.*, 1994; Tijssen *et al.*, 1997; Waters & Schnellmann, 1998) todos ellos componentes importantes relacionados con los procesos de inflamación.

4.2.3. EFECTOS DE LA GLICINA SOBRE EL EDEMA CELULAR.

La integridad de la membrana plasmática es indispensable para el mantenimiento de la viabilidad celular. Alteraciones en la función y en la estructura de la membrana plasmática son fenómenos característicos de la muerte celular por necrosis (Majno & Joris, 1995), como la acontecida durante la isquemia/reperfusión.

Uno de los mecanismos responsables de la ruptura de la membrana plasmática es la aparición de edema celular. Nishimura y cols han observado que durante la depleción energética por isquemia o hipoxia, la glicina reduce la aparición del edema celular originado por el gradiente osmótico, disminuyendo la tensión y estabilizando la membrana plasmática (Nishimura & Lemasters, 2001). Este efecto estaría relacionado con cambios en la permeabilidad de la membrana que se producirían como consecuencia de la depleción energética. En la fase temprana de la isquemia o de la hipoxia, y debido a la inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ ATPasa, se produce un ligero edema osmótico debido al colapso de los gradientes de Na⁺ y de K⁺ y a la apertura de canales catiónicos en la membrana celular. La progresión del daño isquémico provocaría más tarde la apertura de canales aniónicos inespecíficos, sensibles a glicina, que iniciarían la entrada de aniones aumentando la generación de edema celular que,

en última instancia, provocaría el desarrollo de defectos en la bicapa lipídica y ruptura de la membrana plasmática. Estudios previos ya habían relacionado el efecto protector de la glicina con la aparición de poros inespecíficos en la membrana plasmática de las células como consecuencia de la anoxia (Venkatachalam *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2000).

4.2.4. OTROS EFECTOS DE LA GLICINA.

Además de la actividad de la glicina sobre determinadas dianas celulares descritas anteriormente, su efecto beneficioso en una amplia variedad de estados patológicos ha sido documentado en varios estudios.

Por ejemplo, la glicina es un firme candidato en la terapia destinada a la prevención del rechazo de órganos después del trasplante. Se ha observado que la conservación del órgano extraído en una solución que contenga glicina protege a las células del daño celular y aumenta la supervivencia tras el trasplante (Currin *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 2002). Por otro lado, la manipulación del órgano durante la extracción causa hipoxia y alteraciones en la microcirculación que pueden reducir el éxito del trasplante. En este sentido se ha comprobado que la administración de glicina vía intravenosa a las ratas donantes minimiza el daño celular debido a la manipulación y extracción del órgano para el trasplante, mejorando la supervivencia (Schemmer *et al.*, 1999). En este contexto las perspectivas son muy optimistas: en un estudio publicado recientemente realizado en humanos se ha observado que la administración intravenosa de glicina una hora antes del trasplante y durante los días siguientes reduce los niveles de transaminasas así como la bilirrubina total, mejorando la recuperación funcional (Schemmer *et al.*, 2001).

La glicina también ha demostrado ser eficaz frente al shock. El shock hemorrágico y endotóxico ocurre frecuentemente en enfermos críticos, y, entre otras causas, la hipoxia/reperfusión y la respuesta inflamatoria resultante así como las alteraciones en la coagulación participan activamente en la aparición de fallo multiorgánico y muerte (Abello *et al.*, 1994). Se ha observado, en modelos experimentales de shock hemorrágico y endotóxico, que la administración de glicina disminuye la respuesta inflamatoria y mejora la supervivencia (Ikejima *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2000b; Grotz *et al.*, 2001).

También se ha descrito un efecto antiangiogénico e inhibidor del desarrollo de tumores en ratones a los que se les implantó células B16 de melanoma (Rose *et al.*, 1999b), probablemente debido a la capacidad de la glicina de inhibir la proliferación de las células endoteliales. Estos mismos investigadores ya habían observado previamente que la glicina, al disminuir la activación de las células de Kupffer y la producción de TNF- α , disminuía la proliferación de las células hepáticas por acción del carcinógeno WY-14643 (Rose *et al.*, 1999a)

Estudios in vitro han descrito un efecto antitrombótico de la glicina, probablemente mediado por inhibición de la unión del fibrinógeno a las plaquetas (Roth *et al.*, 2003). También se ha observado un menor requerimiento de heparina en cerdos sometidos a cirugía gastrointestinal y tratados con una infusión de glicina (Roth *et al.*, 2003).

A nivel hepático la glicina también ha demostrado beneficios, siendo capaz de disminuir el desarrollo de fibrosis hepática por alcohol o tóxicos, probablemente al prevenir la activación de las células de Kúpffer, disminuyendo así la respuesta inflamatoria (Iimuro *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1998).

A nivel gástrico la glicina presenta propiedades antiulcerosas por su capacidad de inhibir la secreción gástrica y proteger la mucosa de úlceras inducidas experimentalmente (Tariq & Al Moutaery, 1997).

4.3. CONSIDERACIONES CLÍNICAS.

En base a los efectos beneficiosos de la glicina descritos anteriormente, sería razonable considerar la utilización de este compuesto como tratamiento para una variedad de enfermedades humanas. Entre sus dianas terapéuticas destacarían el tratamiento de la sepsis y de la endotoxemia que se puede presentar en enfermos sometidos a cirugía abdominal o trauma, en enfermedades respiratorias con un componente inflamatorio como el asma, o en la prevención y/o tratamiento de ciertos tipos de cáncer. En el campo de los trasplantes, el tratamiento pre y post-trasplante con glicina, en combinación con otros agentes inmunosupresores estándares, es una posibilidad muy interesante, con el fin de minimizar los efectos tóxicos que presentan la mayoría de estos compuestos. Teniendo en cuenta los beneficios descritos para la glicina y el hecho de que pueda administrarse simplemente como un suplemento

dietético, la factibilidad de estas aproximaciones terapéuticas y/o preventivas es muy prometedora.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

- ADAPTAR UN MODELO CELULAR DE CARDIOMIOCITOS EN CULTIVO QUE PERMITA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR ASOCIADOS A LA ISQUEMIA/REOXIGENACIÓN IN VITRO

- CARACTERIZAR EL DAÑO CELULAR E IDENTIFICAR LOS COMPONENTES QUE CONSTITUYEN LA MUERTE CELULAR POR NECROSIS ASOCIADA A LA REOXIGENACIÓN.

- INVESTIGAR EL PAPEL DE LA GLICINA COMO AMINOÁCIDO CITOPROTECTOR Y CARACTERIZAR SU RESPUESTA EN EL MODELO CELULAR DE CARDIOMIOCITOS DURANTE LA REOXIGENACIÓN

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y METODOS

Para la realización de los experimentos desarrollados en este trabajo se utilizaron dos modelos experimentales: la línea celular de cardiomiocitos adultos de ratón HL-1 y el modelo de mitocondrias aisladas de rata. Todos los procedimientos experimentales que han requerido el uso de animales han cumplido con las exigencias de la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" publicada por el National Institute of Health de los EEUU (NIH Publication nº 85-23 revisada en 1996) y han sido aprobados por el Comité Etico del Hospital Vall d'Hebrón.

A. MODELOS, PROTOCOLOS EXPERIMENTALES Y VARIABLES ESTUDIADAS

1. CARDIOMIOCITOS HL-1

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La línea celular HL-1 fue establecida por Claycomb y cols (Claycomb *et al.*, 1998), a partir de células AT-1, linaje tumoral de cardiomiocitos atriales inducido en ratones transgénicos. Es una línea estable, capaz de dividirse y de mantener su fenotipo cardíaco diferenciado a lo largo de los distintos pases, y que permite su recuperación a partir de stocks congelados en nitrógeno líquido. Actualmente constituyen un modelo de cardiomiocitos adultos proliferativos ampliamente utilizado en investigación cardiovascular.

Morfológicamente las células HL-1 presentan una ultraestructura similar a la de los cardiomiocitos adultos de ratón y, tras cada división celular, una reorganización citoplasmática similar a la de los cardiomiocitos embrionarios. Crecen en cultivo formando monocapas celulares y la unión entre células adyacentes es mediante discos intercalares. Contienen un único núcleo central rodeado de miofibrillas contráctiles, dispuestas de manera circular, y gránulos de ANF, así como filamentos de miosina y de desmina. Presentan un perfil genético característico de cardiomiocitos atriales adultos:

expresan genes específicos para la isoforma α de la miosina (α -MHC), la isoforma α de la actina y transcritos para el ANF y la conexina 43 (proteína mayoritaria de las "gaps junctions"). Estudios farmacológicos con agonistas inotrópicos y cronotrópicos revelan la existencia de receptores funcionales específicos de miocitos, como los receptores α -noradrenergicos (McWhinney *et al.*, 2000; Gonzalez-Juanatey *et al.*, 2003), el receptor de adenosina (Chaudary *et al.*, 2002), los transportadores 1 y 2 de los nucleósidos y el receptor opiáceo delta (Neilan *et al.*, 2000), así como las proteínas que participan en las cascadas de señalización intracelular. Los cultivos confluentes exhiben potenciales de acción espontáneos y un latido que tiende a ser sincronizado. Mediante técnicas de "patch-clamp" se han identificado corrientes de K^+ repolarizantes de características similares a las corrientes de K^+ que presentan los miocitos adultos. También se han observado corrientes de Na^+ y de Ca^{2+} de tipo L (Sartiani *et al.*, 2002; White *et al.*, 2004)

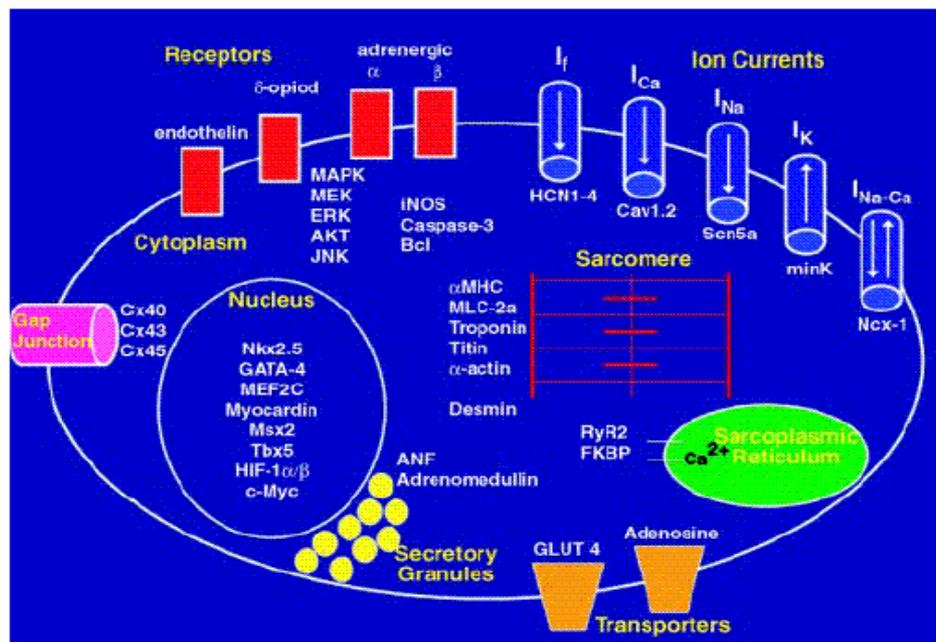


Figura 7: Esquema de los componentes celulares de un cardiomiocito HL-1. Aunque se han descrito otros componentes celulares adicionales, solo se han esquematizado aquellos que han sido publicados. Basado en Claycomb W *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 (2004).

1.2. CULTIVO Y ALMACENAMIENTO.

Cultivo

Durante todo el proceso de cultivo se mantuvieron unas estrictas condiciones de esterilidad. El vidrio y las soluciones que no tenían componentes termosensibles se esterilizaron en un autoclave (120 °C y 1 atm). Los medios de cultivo, sueros y aditivos fueron esterilizados mediante filtros estériles comerciales con un tamaño de poro de 0.22 μm . Las soluciones tamponadas se prepararon a partir de agua destilada estéril.

Para su mantenimiento las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm^2 de superficie pretratados con una solución de gelatina al 0.01 % y a una densidad de 2×10^4 cel/ cm^2 en medio Claycomb de crecimiento compuesto por : Medio Claycomb (JRH Biosciences) suplementado con 10 % de FBS (JRH Biosciences), 100 μM de norepinefrina (Sigma), 4 mM de L-Glutamina (Invitrogen), 100 UI/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina (Invitrogen). Los cultivos se mantenían en un incubador con una atmósfera compuesta en un 95 % de aire y un 5 % de CO_2 , a 37 °C y humedad saturada. Cada dos o tres días, y teniendo en cuenta la densidad celular, se realizaron los subcultivos pertinentes. Las células HL-1 crecieron formando monocapas celulares adheridas al sustrato mediante mucoproteínas.

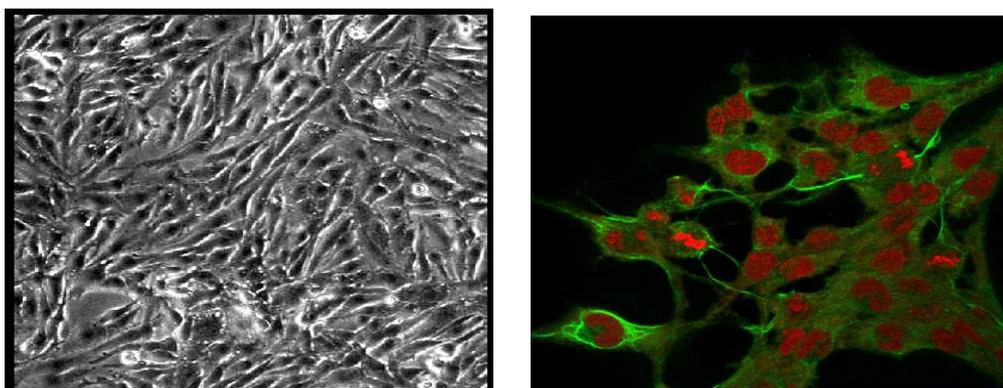


Figura 8: Cardiomiocitos HL-1 Izda: Cultivo confluyente de cardiomiocitos HL-1 (fotografía obtenida mediante microscopio invertido de contraste de fases). Dcha: Cardiomiocitos HL-1 con los núcleos teñidos con PI (en rojo) y con un anticuerpo para la conexina 43 (en verde) (fotografía obtenida mediante microscopio confocal).

Congelación y descongelación

Para tener stocks de células, parte de los cultivos se congelaban cuando alcanzaban el 80 % de confluencia. La congelación se realizó a partir de suspensiones celulares obtenidas por tripsinización y resuspendidas en medio de congelación (95 % DMSO + 5 % FBS). Las células resuspendidas se repartían en criotubos (1ml) y se sometían a un protocolo paulatino de congelación (4°C durante 2 h, a - 20°C durante 2 h, y a - 80°C durante 12 h) y se sumergían en nitrógeno líquido.

Para la descongelación las células se sumergieron rápidamente en un baño a 37°C y se transfirieron muy lentamente (gota a gota) a un frasco de cultivo con medio Claycomb de crecimiento.

Subcultivo

El crecimiento celular en estado proliferativo requiere la realización de subcultivos periódicos cuando se alcanza la confluencia. El subcultivo se realizó tripsinizando la monocapa celular con tripsina-EDTA (0.5 g/L tripsina(1:250) + 0.2 g/L EDTA) durante dos incubaciones de 2 y 4 minutos para levantar las células del sustrato e inactivando seguidamente la tripsina con un inhibidor para evitar la degradación de proteínas celulares. La suspensión obtenida se centrifugó a 150x g durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el sedimento se resuspendió en medio de crecimiento fresco a 37 °C. Se transfirió un volumen adecuado de medio a un nuevo frasco, pretratado previamente con la solución de gelatina, a una densidad final de 20.000 cel/cm².

Recuento de células y determinación de la viabilidad celular

El recuento celular y la estimación de la viabilidad se realizó mediante la cámara de Neubauer y la tinción de Trypan Blue. Para ello se tripsinizó la monocapa de células y se resuspendió en un volumen conocido de medio de cultivo. Se centrifugó a 150x g durante 5 minutos, el sedimento se resuspendió y se depositó una alícuota en un eppendorf, donde se mezcló con otra alícuota de colorante. Al cabo de unos tres minutos se añadió una alícuota de la mezcla en uno de los lados de la cámara y se dejó que entrase por capilaridad. Una vez enfocadas las líneas de separación de la cámara con la ayuda del microscopio, se contó el número de células presentes en los cuadrados del área central (el área mayor que se puede observar rodeada de tres

líneas paralelas). Este área equivale a una superficie de 1 mm^2 , y como la altura entre el cubreobjetos y la cámara es de 0.1 mm, el número de células por ml se obtuvo al multiplicar por 10^4 el número de células contadas. Teniendo en cuenta la dilución realizada inicialmente al añadir el colorante y el volumen de la suspensión inicial se determinó el número de células por ml de la muestra y el número de células totales. La viabilidad celular se calculó a partir del número de células que excluyeron el colorante Trypan Blue (por tener la membrana intacta) respecto al número total de células.

1.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES EN CARDIOMIOCITOS HL-1

Las células HL-1 en suspensión se sometieron a un protocolo común de 60 minutos de isquemia simulada y 30 minutos de reoxigenación. Para ello se tripsinizaron y centrifugaron tal y como se ha descrito anteriormente y el sedimento celular se resuspendió en un medio de inhibición metabólica que contenía (en mM): NaCl 140, KCl 3.6, CaCl_2 2, MgSO_4 1.2 y HEPES 20 y NaCN 2 / 2-deoxyglucosa 20 (para inhibir la respiración celular) a pH 6.4 y 37 °C. La reoxigenación se simuló eliminando el inhibidor de la respiración celular, añadiendo glucosa 5 mM y normalizando el pH a 7.4 (medio de reoxigenación), en células sedimentadas después de centrifugar a 150x g durante 5 minutos.

Se estudió el efecto de diversas intervenciones farmacológicas durante la reoxigenación sobre diversos indicadores de daño celular. Las principales intervenciones farmacológicas que se investigaron fueron:

- a) Efecto del pH: se investigó el papel de la normalización del pH en la muerte celular reoxigenando a pH 6.4 versus pH 7.4
- b) Efecto del calcio: se investigó el papel del calcio en la muerte celular utilizando un tampón de reoxigenación sin calcio.
- c) Efecto de la glicina: se investigó el potencial efecto protector de la glicina añadiendo distintas concentraciones de la misma en el tampón de reoxigenación.
- d) Otras intervenciones orientadas a caracterizar los mecanismos de acción responsables del efecto beneficioso de la glicina.

1.4. VARIABLES ESTUDIADAS EN CARDIOMIOCITOS HL-1

1.4.1. MUERTE CELULAR POR NECROSIS.

La muerte celular por necrosis se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo. El PI es un fluorocromo que se une a los ácidos nucleicos con una relación estequiométrica y que se excita a 488 nm y emite a 630 nm. Es capaz de penetrar a través de la membrana de las células no viables (ya que está permeabilizada o bien está rota) de manera que al acceder al interior celular interacciona con el ADN nuclear emitiendo una fluorescencia roja muy intensa.

Tras someter la suspensión celular al protocolo experimental correspondiente, se añadieron 5 μ l de PI stock (concentración final: 1 μ g/ml) a cada una de las muestras y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La viabilidad celular se determinó utilizando un citómetro de flujo FACSScalibur (Becton Dickinson Inc., San Jose, CA. USA) calibrado semanalmente. La población celular se identificó en función de los parámetros de "forward" y "side scatter" en modo logarítmico y la fluorescencia emitida por el PI se detectó en el canal FL3. Para cada muestra se recogieron 15.000 células. Los datos se analizaron con el software CELLQuest™ (Becton Dickinson) y los resultados se expresaron en función del porcentaje de células positivas para PI (porcentaje de células muertas)

1.4.2. MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada en la que la célula participa de forma activa. La muerte celular por apoptosis se divide en varias fases que incluyen cambios a nivel nuclear, con condensación de la cromatina, cambios en las organelas intracitoplasmáticas y alteraciones en la membrana celular. Uno de los primeros sucesos que tiene lugar es la pérdida de asimetría de la membrana plasmática. Durante la muerte apoptótica la fosfatidilserina, fosfolípido de la membrana celular, se transloca de la cara interna a la cara externa de la membrana. La anexina V- FITC es una proteína unida a fluoresceína que en presencia de calcio presenta alta afinidad por la fosfatidilserina, de manera que se unirá a las células apoptóticas emitiendo fluorescencia verde cuando se exciten a 450-480 nm. Para excluir las células necróticas se usa a la vez el PI, que al unirse a los ácidos nucleicos permite diferenciar

entre las células apoptóticas, que fijan anexina V-FITC y excluyen al PI (ya que aún tienen la membrana celular intacta), de las células necróticas, que captan tanto la anexina-FITC como el PI. Las células viables excluyen ambos fluorocromos.

La tinción doble con anexina V-FITC y PI se llevó a cabo según se había descrito anteriormente (Vermes et al., 1995). Tras someter la suspensión celular al protocolo experimental correspondiente, se añadieron 5 μ l de PI stock (concentración final: 1 μ g/ml) y 5 μ l de solución comercial de anexina V-FITC (dilución 1:200) a cada una de las muestras y se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en la oscuridad. La muerte celular se determinó utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Inc., San Jose, CA. USA) calibrado semanalmente. La población celular se identificó en función de los parámetros de "forward" y "side scatter" en modo logarítmico. La fluorescencia emitida por cada fluorocromo se midió en diferentes canales, FL1 para FITC y FL2 para PI, compensando adecuadamente las fluorescencias emitidas por ambos fluorocromos. Para cada muestra se recogieron 15.000 células. Los datos se analizaron con el software CELLQuest™ (Becton Dickinson) y los resultados se expresaron en función del porcentaje de células positivas para anexina V-FITC en el caso de las células apoptóticas, y en función del porcentaje de células positivas para PI y anexina V-FITC en el caso de las células necróticas.

1.4.3. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA Y VOLUMEN CELULARES.

Los parámetros de "forward scatter" y "side scatter" (dispersión frontal y lateral respectivamente) obtenidos mediante el análisis de la población celular por citometría de flujo se relacionaron respectivamente con el tamaño y la complejidad citoplasmática de dicha población. El haz de luz láser cuando atraviesa una célula sufre una dispersión que puede ser evidenciada en un fotodetector, situado detrás de la corriente de células y justo enfrente de la fuente emisora, como una disminución de la luz incidente. El tiempo que dure el corte en la llegada de fotones al detector será proporcional al diámetro, y por tanto el volumen celular. Este estudio de interrupción frontal del haz láser se denomina en términos anglosajones como "forward scatter" (FSC). Además del detector de luz situado frente al haz láser, existe otro grupo óptico, el más importante, que detecta la luz dispersada por las células y que se coloca formando un ángulo de 90° con el haz láser. Esta luz es descompuesta mediante los filtros apropiados, para poder estudiar tanto la dispersión de luz de la misma longitud de onda del láser como

la emitida por los fluorocromos. La mayor o menor dispersión de la luz, y por tanto la mayor o menor detección de luz en este detector, será proporcional a la rugosidad de la superficie celular y a las estructuras y organelas celulares. En términos anglosajones la dispersión de la luz en un ángulo de 90° se denomina "side scatter" (SSC)

Para estimar la morfología celular los datos obtenidos se analizaron con el software CELLQuest™ en función de los parámetros de "forward" y "side scatter" y los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos se expresaron en relación a los datos obtenidos en las células control para cada una de las poblaciones estudiadas.

1.4.4. DETERMINACIÓN DEL pH INTRACELULAR.

Los cambios en el pH intracelular se determinaron utilizando el sistema de ratiofluorescencia por imagen (QuantiCell 2000, Visitech, UK). Para ello los cardiomiocitos HL-1 se sometieron a 60 minutos de isquemia simulada (con medio de inhibición metabólica) a pH 6.4 y posterior reoxigenación en presencia de glucosa 5 mM y pH normalizado a 7.4 (medio de reoxigenación) durante 30 minutos. Préviamente las células se cargaron con 1 µM del éster acetoximetilado del 2',7'-bis(2-carboxietil)-5,6-carboxi-fluoresceína (BCECF), a 37°C durante 30 minutos, en medio de reoxigenación. Tras la incubación con BCECF las células se lavaron y se incubaron de nuevo durante 20 minutos en medio de reoxigenación, con el fin de favorecer la hidrólisis del éster en el interior de las células. Después de la segunda incubación se inició el protocolo experimental. Las placas con las células cargadas con BCECF se colocaron en una platina termostatzada de un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX70, Japan) y se seleccionaron campos confluentes utilizando el objetivo de inmersión X400 (UplaFL, Olympus, Japan). Antes de iniciar la isquemia simulada se recogieron, en una zona de la placa libre de células, dos señales correspondientes al "background" para cada una de las longitudes de onda, de manera que los valores de "background" fueron sustraídos automáticamente de cada una de las posteriores señales. Durante la isquemia simulada la monocapa celular fue excitada, alternativamente, a 450 nm y a 490 nm, con un ancho de banda de 15 nm, mediante un monocromador de alta velocidad. Para evitar el fenómeno de "photobleaching" del fluoróforo el tiempo de exposición durante el experimento para cada una de las longitudes de onda de excitación fue siempre inferior a 20 milisegundos y las imágenes fueron captadas cada 60 segundos. La luz emitida (520-560 nm) fue recogida

mediante una cámara digital refrigerada e intensificada con una resolución de 640x640 pixels. Los ratios 450/490 se generaron automáticamente en pares de imágenes consecutivas y se les asignó un código de color. La media de los valores de los ratios se calculó para las regiones de interés definidas en cada imagen.

1.4.5. CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE Na⁺.

Los cambios en la concentración de intracelular Na⁺ se determinaron utilizando el sistema de ratiofluorescencia por imagen (QuantiCell 2000, Visitech, UK), y con un marcador específico de Na⁺, el SBFI. El sistema es el mismo que el utilizado para la determinación del pH intracelular, exceptuando que la excitación de la monocapa celular se realizó alternativamente a 340 nm y a 380 nm y la luz emitida se recogió a 505 nm. Antes de iniciar el protocolo experimental los cardiomiocitos HL-1 se cargaron con 5 µM del éster acetoximetilado SBFI (Molecular Probes, USA) a 37 °C durante 30 minutos, en medio de reoxigenación. Tras la incubación con SBFI las células se lavaron y se incubaron de nuevo durante 20 minutos en medio de reoxigenación con el fin de favorecer la hidrólisis del éster en el interior de las células. Después de esta segunda incubación se inició el protocolo experimental de IS/Rx, colocando las placas en una platina termostatizada de un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX70, Japan). Los campos confluentes se seleccionaron utilizando el objetivo de inmersión X400 (UplaFL, Olympus, Japan).

1.4.6. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA.

Para determinar si los cardiomiocitos HL-1 expresaban el RGly en su membrana se utilizaron dos tipos de abordajes: la técnica de Western blot y la tinción por inmunocitoquímica.

1.4.6.1. Técnica de Western blot.

Los tampones utilizados en la técnica de Western blot fueron los siguientes:

- Tampón de homogeneización: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 40 µl de cocktail de inhibidores de proteasas comercial.
- Tampón de electroforesis: solución comercial 10x Tris/Glicina/SDS

- Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 190 mM Gly, 20% v/v metanol
- Tris-buffered saline (TBS): 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6
- TBS-T: TBS-Tween 0.1%
- Tampón de bloqueo: TBS-T, 5% leche desnatada en polvo.

Preparación de las muestras

Las células HL-1 se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² de superficie a una densidad de 2×10^4 cel/cm² en medio de crecimiento. Cuando alcanzaron la confluencia se tripsinizaron, se centrifugaron a 150x g durante 5 minutos y se homogeneizaron con 750 µl de tampón en un homogeneizador Plotter-Elvehjem durante 3 minutos a máxima velocidad. Tras centrifugación a 200x g durante 10 minutos a 4 °C, las muestras se diluyeron con reactivo de Laemmli en una proporción 1:1, se hirvieron durante 5 minutos y se enfriaron para después congelarlas a – 80°C hasta su utilización. La cantidad de proteína de los extractos se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot.

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente utilizada. Consiste en la electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS. Fue descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se trata de un tipo de electroforesis en que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, y SDS (detergente anfipático que desnaturaliza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos) lo que permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, formando una red más o menos compleja según el ratio acrilamida: bisacrilamida. Esta polimerización es inducida por el

ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) en forma de persulfato de amonio y esta catalizada por TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina).

Una vez separadas electroforéticamente las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y se hibridan con anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas de interés. La utilización de un anticuerpo secundario marcado permite visualizar el resultado.

Procedimiento:

Las muestras homogeneizadas se descongelaron a temperatura ambiente, se hirvieron durante 5 minutos y se separaron en geles de poliacrilamida al 10 %. En cada carril se cargaron 12.5 μ g de proteína. La electroforesis se desarrolló durante 60 minutos a una intensidad de 25 mA y durante otros 60 minutos a una intensidad de 40 mA. Finalizada la electroforesis, se separaron los geles y se equilibraron en tampón de transferencia durante 30 minutos. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa, en frío y en agitación, a 100 V durante 75 minutos. Transcurrido este tiempo, y antes de iniciar la incubación con el anticuerpo primario, la membrana con las proteínas transferidas se sumergió en una solución de bloqueo durante 90 minutos, en agitación constante, para prevenir la unión no específica. Posteriormente se incubó durante 90 minutos con el anticuerpo primario monoclonal específico (anti-GlyR MAb4a) diluido en tampón de bloqueo dirigido contra la subunidad α de 48 y 58 kDa del RGly de SNC, a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de tres lavados de 10 minutos con tampón TBS-T y de un último lavado de 30 minutos, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en tampón de bloqueo, en agitación constante durante 60 minutos. Finalizada la incubación, y tras tres lavados de 10 minutos con tampón TBS-T y un último lavado de 30 minutos, las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate, Pierce)

1.4.6.2. Tinción inmunocitoquímica.

La visualización del RGly se llevo a cabo mediante tinción selectiva con un marcador específico. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata contra la subunidad α del RGly (anti-GlyR MAb4a). Los tampones utilizados fueron los siguientes:

Tampón TBS: Tris-HCl 0.05 mM, pH 7.4

Tampón de bloqueo: FBS 10%, BSA 0.01 % en tampón TBS

Tampón fosfato PBS: solución comercial

Las células HL-1 se sembraron en placas Leica con el fondo de vidrio a una densidad de 20.000 cel/cm². Una vez alcanzada la confluencia, se aspiró el medio y las placas se lavaron con 2 ml de tampón TBS pH 7.4, durante 5 minutos. Seguidamente las células se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS durante 1 hora a 4°C. Tras la fijación, y después de un lavado con tampón TBS, las células se incubaron con 2 ml de tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el bloqueo se inició la incubación con el anticuerpo primario monoclonal específico (dilución 1:100), en tampón de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, y tras mantener las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, se inició la incubación con el anticuerpo secundario (FITC-anti-IgG, dilución 1: 50) en tampón de bloqueo, durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalizada la incubación las placas se lavaron con tampón TBS para retirar el exceso de anticuerpo, se añadieron 2 ml de PBS frío para evitar que las células se secan y se mantuvieron a 4°C hasta su visualización mediante el microscopio confocal.

1.4.7. CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE GLICINA.

La determinación de la concentración intracelular de glicina en cardiomiocitos HL-1 se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopia por resonancia magnética nuclear. Para ello los cardiomiocitos HL-1 se tripsinizaron y se centrifugaron a 150x g durante 5 minutos. El sedimento celular, a una concentración final de 3-5 x 10⁶ células por muestra, se extrajo con 1.2 ml de una solución de cloroformo:metanol (1:2), a temperatura ambiente, durante 1 hora. Para separar las dos fases se añadió 0.5 ml de cloroformo y 0.5 ml de H₂O y las muestras se centrifugaron a 1500x g durante 5 minutos. La fase superior (metanol y H₂O) se separó de la fase inferior (cloroformo) y se secó bajo una corriente de N₂ gas. Los extractos secos se disolvieron en 400 µl de D₂O y se añadió TSP 1mM como referencia de concentración y desplazamiento químico. La espectroscopia se llevó a cabo a 300 °K en un espectrómetro Bruker ARX (Bruker, Madrid) a 400 MHz. Los espectros, con restauración de la señal de agua residual y completamente relajados (tiempo entre pulsos = 35 segundos), consistieron

en la acumulación de 128 repeticiones, con un tiempo total de adquisición de 1 hora, previamente a la transformación de Fourier.

2. MITOCONDRIAS AISLADAS DE RATA

2.1. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE RATA

Las mitocondrias de corazón de rata se aislaron mediante centrifugación diferencial, de acuerdo con el método descrito por Holmuhamedov et al (Holmuhamedov *et al.*, 1998). Los corazones se obtuvieron a partir de ratas anestesiadas con pentobarbital (100 mg/Kg) y se sumergieron en un tampón de aislamiento frío que contenía (en mM): sucrosa 50, manitol 200, KH_2PO_4 5, EGTA 1, MOPS 5 y BSA 0.1 %, a pH 7.15 ajustado con KOH. El tejido cardíaco de los ventrículos se homogeneizó en tres ciclos de 20 segundos con la ayuda de un homogeneizador Heidolph DIAX 600 y se centrifugó a 750x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 7000x g durante 20 minutos a 4°C y el sedimento resultante, enriquecido en mitocondrias, se resuspendió en el tampón de aislamiento sin EGTA, y se volvió a centrifugar a 7000x g durante 20 minutos a 4°C. La concentración de proteína de la suspensión mitocondrial se determinó por el método de Bradford, y se ajustó a 1 mg/ml.

2.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES EN MITOCONDRIAS AISLADAS

Las mitocondrias se sometieron a dos protocolos experimentales: un protocolo de IS/Rx y un protocolo de sobrecarga de calcio. Para simular la isquemia la suspensión mitocondrial se centrifugó y el sedimento se resuspendió en un tampón de inhibición metabólica que contenía (en mM): KCl 150, NaCl 7, HEPES 6, KH_2PO_4 0.5, sucrosa 50, CaCl_2 0.01 y NaCN 2 mM, a pH 6.4 durante 1 hora a 37 °C. La reoxigenación se simuló sustituyendo el tampón de inhibición metabólica por un tampón sin NaCN, en el que el pH se normalizó a 7.2 y en el que se añadieron 0.3 mM de ATP y 2.5 mM de ácido ascórbico para permitir la recuperación metabólica. Se estudió el efecto del pH ácido (6.4), de la glicina (1, 3 o 10 mM) y de la CsA (0.1 o 1 μM) sobre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) durante los primeros 30 minutos de reoxigenación en distintos grupos experimentales. El grupo control se sometió a las

mismas manipulaciones experimentales, con la excepción de que el tampón contenía una concentración de calcio de 0.1 μM y que el ATP y el ácido ascórbico estuvieron presentes durante todo el experimento. El efecto inhibitor del pH ácido, de la glicina y de la CsA en la apertura del PTPm también fue analizado en mitocondrias normóxicas sometidas a sobrecarga de calcio (200 μM) durante 15 minutos.

2.3. VARIABLES ESTUDIADAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS

Para investigar la posible apertura del PTPm en la IS/Rx, se utilizaron 2 técnicas distintas: la medida de la absorbancia de la suspensión mitocondrial por espectrofotometría, y la medida de fluorescencia liberada a partir de mitocondrias previamente marcadas con el fluorocromo calceína.

2.3.1. DETERMINACIÓN DEL EDEMA MITOCONDRIAL MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA.

El incremento en el volumen de la matriz mitocondrial fue determinado espectrofotométricamente en suspensiones mitocondriales a 25°C utilizando microplacas de 96 pocillos. Los cambios en la absorbancia se determinaron a una longitud de onda de 550 nm y se estudiaron cuatro grupos experimentales: mitocondrias control (basal), mitocondrias sometidas a 60 minutos de IS, mitocondrias sometidas a 60 minutos de IS/Rx y mitocondrias sometidas a sobrecarga de Ca^{2+} . La apertura del PTPm se asoció a un descenso brusco en la absorbancia, lo que refleja un aumento en el volumen de la matriz o edema mitocondrial.

2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CALCEÍNA.

La calceína es un fluorocromo que emite fluorescencia verde, capaz de entrar en el interior de las mitocondrias en forma de éster de calceína, compuesto que no emite fluorescencia. Una vez dentro se desesterifica quedando retenido en forma de calceína, que será liberada al espacio extramitocondrial al abrirse el PTPm. La especificidad del método se verificó utilizando CsA, inhibidor de la apertura del PTPm. La liberación de calceína se monitorizó en mitocondrias aisladas utilizando microplacas de 96 pocillos y mediante ensayo fluorimétrico. Para ello la suspensión de mitocondrias se centrifugó y se incubó con 1 μM de calceína-AM durante 15 minutos a 37 °C. Tras la incubación las

mitocondrias se lavaron y se sometieron a un protocolo de sobrecarga de Ca^{2+} . Al final del experimento se determinó la fluorescencia emitida por la calceína en el compartimento extramitocondrial, a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 538 nm. La apertura del PTPm se determinó en base a la pérdida de calceína en el compartimento intramitocondrial, fenómeno inhibido por la Cs A.

B. MATERIAL Y REACTIVOS

El material utilizado para el cultivo de células (frascos de 25 y 75 cm², placas de cultivo, tubos, criotubos, pipetas y puntas de pipetas) fue suministrado por Cultek, Falcon, Leica, Sarstedt y Nirco. Los filtros de 0.22 μm de tamaño de poro para esterilizar soluciones fueron suministrados por Millipore. Las soluciones para el cultivo de células se esterilizaron en un autoclave Sterilmax de P-Selecta. El incubador de CO_2 para mantener la línea celular fue el modelo AIRE de Nirco. El citómetro de flujo utilizado fue el modelo FACScalibur de Becton Dickinson Inc. (San Jose, CA). Todo el material utilizado para la electroforesis y el Western blot fue suministrado por Bio Rad y Amersham Pharmacia Biotech. El sistema de ratiofluorescencia por imagen utilizado fue el QuantiCell 2000 de Visitech (UK) y el microscopio de fluorescencia invertido fue el modelo Olympus IX70 (Japón). Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Spectra III de SLT (Austria). Los experimentos de fluorescencia se realizaron utilizando un fluorímetro SpectraMax GeminiXS de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Los experimentos de resonancia magnética nuclear se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker ARX (¿)

La mayor parte de los reactivos empleados en la realización de los experimentos fueron suministrados por Sigma. El resto de los reactivos fueron adquiridos en las siguientes compañías: JRH Biosciences (medio Claycomb); Invitrogen (FBS, glutamina, penicilina/estreptomina, tripsina-EDTA, inhibidor de tripsina soybean); Becton Dickinson (gelatina); MERCK (etanol, metanol, HCl 1N, cloroformo); Alexis Biochemicals (anticuerpo monoclonal para el receptor de glicina anti-GlyR MAb clon 4a); Zymed (anticuerpo secundario anti-Ig de ratón FITC-conjugado); Roche Diagnostics (anexina-V-FITC); Molecular Probes (fura-AM, calceína-AM, BCECF-AM,

SBFI); Bio Rad (soluciones comerciales para electroforesis), Pierce (reactivo para la detección de proteínas mediante quimioluminiscencia)

En general, las sustancias químicas fueron disueltas en agua destilada estéril en el caso de las sustancias solubles, o bien en DMSO o etanol en el caso de las sustancias químicas insolubles en agua, siempre a concentraciones de solvente inferiores al 0.001 %, las cuales no afectan a la supervivencia celular.

La línea celular HL-1 fue suministrada por el Dr. William C. Claycomb, de la Universidad de Louisiana, en New Orleans (USA). Las ratas utilizadas en los experimentos de aislamiento de mitocondrias fueron suministradas por Harlan.

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores se expresan como la media \pm error estándar. Las comparaciones entre grupos experimentales se realizaron mediante aplicación de los tests de análisis de la varianza ANOVA y de Tukey. Para todos los análisis se estableció como significativo un valor de p inferior a 0.05