



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Contribución del co-transporte $\text{Na}^+\text{-CO}_3\text{H}^-$ y de la anhidrasa carbónica a las alteraciones por isquemia y reperfusión: rol de la mitocondria

Ciocci Pardo, Alejandro

Doctor en Ciencias Naturales

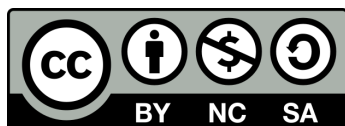
Dirección: Mosca, Susana M.

Co-dirección: Alvarez, Bernardo V.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2018

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20190328001638>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUCIÓN DEL CO-TRANSPORTADOR Na^+ - HCO_3^- Y DE
LA ANHIDRASA CARBÓNICA A LAS ALTERACIONES POR
ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN: ROL DE LA MITOCONDRIA**

Lic. Alejandro Ciocci Pardo

Directores de tesis: Dra. Susana M. Mosca

Dr. Bernardo V. Álvarez

-2018-



Dedicatoria y agradecimiento

A mi Directora Susana, por su esfuerzo, dedicación y confianza.

A mi Director Bernardo, por su predisposición y sugerencias.

Al Dr. Martin Vila-Petroff, por darme la oportunidad de formar parte del Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

A Juli y Luisa, por el día a día, risas y consejos.

A Guille, por sus consejos y aportes científicos.

A todos los integrantes del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, porque todos contribuyeron a la realización del presente trabajo de tesis.

A mis amigos, por ser mis amigos.

A mi familia, porque sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

Resumen

Los cardiomiocitos poseen en la membrana diferentes transportadores iónicos encargados de regular el pH intracelular (pHi). Cuando el pHi es ácido existen dos mecanismos alcalinizantes responsables de dicha regulación: el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y el co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC). Estudios previos describen la isoforma 1 de un NBC electrogénico (NBCe1) que en miocardio presenta una estequiometría 1 : 2 ($\text{Na}^+ : \text{HCO}_3^-$) y que, además, posee dos bucles extracelulares con propiedades regulatorias (bucles 3 y 4). Experimentos realizados en miocitos aislados demuestran que el bloqueo del bucle 3 inhibe la actividad del NBCe1 y que el bloqueo del bucle 4 la aumenta.

Las anhidrasas carbónicas (AC) son una familia de metaloenzimas que catalizan la hidratación reversible del dióxido de carbono (CO_2) para producir ácido carbónico (H_2CO_3) que espontáneamente se hidroliza en HCO_3^- y H^+ . Resultados previos demuestran que las AC interaccionan con NHE y NBC formando lo que se conoce como metabolón de transporte iónico. De esta manera, las AC proveen de los iones necesarios para el funcionamiento de dichos transportadores, favoreciendo así la actividad de los mismos.

Durante la isquemia-reperfusión (I/R) se producen cambios de pHi, que llevan a la activación de NHE y NBC, a la acumulación intracelular de Na^+ y secundariamente a la de Ca^{2+} , por activación del modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La sobrecarga de Ca^{2+} es uno de los factores responsables de las alteraciones por I/R. Por lo tanto, las "intervenciones cardioprotectoras" han sido asociadas a una disminución de la concentración intracelular de este ion. Una de ellas es la llamada "reperfusión ácida (RA)". En la RA se perfunde al corazón con una solución de pH ácido, lo que reduce la actividad de los mecanismos alcalinizantes como consecuencia de la reducción del gradiente de H^+ entre el citoplasma y el exterior celular. Esta menor actividad lleva a una menor sobrecarga de Na^+ y por lo tanto, a una menor sobrecarga de Ca^{2+} .

El exceso de Ca^{2+} citosólico determina el aumento de la concentración de este ion en la mitocondria, que conduce a la formación y/o apertura de un poro de alta conductancia denominada poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM). Este evento está ligado a las alteraciones mitocondriales por I/R y a la liberación de factores involucrados en la muerte celular.

Distintos mediadores impactan sobre la membrana de los cardiomiocitos y producen la activación de cascadas de señalización que culminan en la mitocondria. Estas cascadas involucran a diferentes proteínas quinasas, entre ellas a las activadas por mitógenos (MAPK), perteneciendo

la p38 a una de sus subfamilias. Con respecto a esta proteína quinasa, existen estudios que muestran su papel cardioprotector, mientras que otros señalan su participación en la injuria generada por la I/R.

Por todo lo expuesto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue examinar la contribución del NBCE1 y de la AC a las alteraciones miocárdicas y mitocondriales producidas por I/R, analizando las vías de señalización involucradas. Específicamente, nuestro estudio se abocó a determinar los efectos de bloqueantes de NBCE1 y AC sobre el tamaño de infarto, la función miocárdica post-isquémica, la capacidad de retención de Ca^{2+} mitocondrial, la sensibilidad del PPTM al Ca^{2+} y el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Otro de los objetivos de esta investigación fue analizar la participación de la p38MAPK en los efectos observados en las distintas intervenciones.

Para cumplir con estos objetivos corazones aislados de rata Wistar de 4 a 5 meses de edad, perfundidos por el sistema de Langendorff, fueron sometidos a una isquemia global normotérmica de 30 minutos y luego reperfundidos durante 1 hora. Otros corazones fueron tratados durante los primeros 10 minutos de la reperfusión con un anticuerpo contra el bucle 3 del NBCE1 (a-L3) o con benzolamida (BZ, inhibidor de AC). En otro grupo experimental los corazones fueron tratados durante los 10 minutos previos a la isquemia y los primeros 10 minutos de la reperfusión con 6-etoxazolamida (ETX, inhibidor de AC). Para el protocolo de RA, los corazones fueron perfundidos durante los primeros 3 minutos de la reperfusión con una solución de pH = 6.4. En este grupo la reperfusión se completó hasta alcanzar los 60 min con la solución de pH = 7.4.

La aplicación de 30 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión produjo un tamaño de infarto de aproximadamente 32 %. Este valor disminuyó significativamente con los tratamientos aplicados, llegando a aproximadamente 10, 6, 11 y 9 % en los grupos a-L3, BZ, ETX y RA, respectivamente.

La función sistólica miocárdica disminuyó aproximadamente un 80 % al final del período de reperfusión. El tratamiento con a-L3, BZ, ETX y RA mejoró la recuperación post-isquémica del miocardio y los parámetros evaluados alcanzaron valores mayores a los obtenidos en el CI y S (62, 71, 62 y 55 % respectivamente vs. 20 %). La función diastólica también mejoró con todos los tratamientos. El aumento de la presión diastólica final observado durante la reperfusión fue significativamente menor en los corazones tratados con a-L3, BZ, ETX y RA.

Las alteraciones mitocondriales detectadas en la reperfusión fueron significativamente atenuadas por los tratamientos. Así, la despolarización mitocondrial ($\Delta\psi_m$ aproximadamente -95

mV) observada en el grupo no tratado fue revertida totalmente, adquiriendo en los grupos tratados con a-L3, BZ, ETX y RA valores aproximados a -140 mV, que fueron similares a los obtenidos en corazones no isquémicos. Las muestras mitocondriales procedentes de los corazones tratados también mostraron una recuperación de la capacidad de retención de Ca^{2+} y de la respuesta a dicho ion asociada a una menor apertura del PPTM.

Con respecto a la p38MAPK, su expresión disminuyó a 41 % en los corazones sometidos a I/R pero aumentó significativamente en presencia de a-L3, BZ, ETX y RA, adquiriendo valores de alrededor de un 135 %. Con el objeto de determinar una posible vía de activación de p38MAPK y un posible blanco de dicha quinasa, evaluamos la expresión de calcineurina (fosfatasa dependiente de Ca^{2+}) y la proteína de choque térmico 27 (en inglés Heat Shock Protein 27, HSP27) en todos los grupos experimentales. Nuestros datos muestran que la expresión de calcineurina aumentó mientras que la de HSP27 disminuyó en los corazones no tratados. El bloqueo del NBCE1, la inhibición de AC y la RA disminuyeron el contenido de calcineurina y aumentaron el de HSP27.

Los datos de este trabajo de tesis también muestran que la administración de SB202190, inhibidor de p38MAPK, anula todos los efectos beneficiosos observados en los corazones tratados con a-L3, BZ, ETX y RA.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que el bloqueo del bucle extracelular 3 del NBCE1 con a-L3, la inhibición de AC con BZ o ETX y la RA:

- 1- Disminuyen el tamaño del infarto y aumentan la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas.*
- 2- Mejoran el estado mitocondrial, atenuando la despolarización y recuperando la capacidad de retención y de respuesta al Ca^{2+} .*
- 3- Promueven una disminución de la expresión de calcineurina A β y un aumento del contenido de P-p38MAPK y P-HSP27.*

Estos datos indican que una reducción en la sobrecarga de Ca^{2+} , consecuente a una actividad reducida de los mecanismos alcalinizantes, podría producir una menor activación de calcineurina y una activación de la vía p38MAPK-HSP27 que llevaría a la mejora mitocondrial, blanco final de la cardioprotección. Además, estos resultados sugieren que los tratamientos aquí ensayados podrían servir como posibles herramientas terapéuticas para atenuar los daños miocárdicos y mitocondriales producidos por la I/R.

Abstract

Cardiomyocytes have different ionic transporters in the membrane responsible for regulating intracellular pH (pHi). When the pHi is acid there are two alkalizing mechanisms responsible for this regulation: the Na^+/H^+ exchanger (NHE) and the $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) co-transporter. Previous studies describe the isoform 1 of an electrogenic NBC (NBCe1) that in myocardium has a stoichiometry of 1 : 2 ($\text{Na}^+ : \text{HCO}_3^-$) and possess two extracellular loops with regulatory properties (loops 3 and 4). Experiments performed in isolated myocytes demonstrate that the blockade of loop 3 inhibits the activity of NBCe1 and the inhibition of loop 4 increases it.

Carbonic anhydrases (CA) are a family of metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide (CO_2) to produce carbonic acid (H_2CO_3) that spontaneously hydrolyzes into HCO_3^- and H^+ . Previous results demonstrate that CA interacts with NHE and NBC forming ion transport metabolon. In this way, the CAs provide ions for the operation of these exchangers, thus improving their activity.

During ischemia-reperfusion (I /R) there are changes in pHi, which lead to the activation of NHE and NBC, the accumulation of intracellular Na^+ and secondarily that of Ca^{2+} , by activation of the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. The overload of Ca^{2+} is one of the factors responsible for the alterations by I/R. Therefore, "cardioprotective interventions" have been associated with a decrease in the intracellular concentration of this ion. One of them is the called "acid reperfusion (RA)". In RA, the heart is perfused with a solution of acid pH, that reduce the activity of alkaline mechanisms because of a reduction of the H^+ gradient between the cytoplasm and the cell exterior.

This lower activity leads to a lower overload of Na^+ and, therefore, a lower Ca^{2+} overload. The excess of cytosolic Ca^{2+} determines the increase in the concentration of this ion in the mitochondria, which leads to the formation and/or opening of a high conductance pore called mitochondrial permeability transition pore (MPTP). This event is linked to mitochondrial alterations by I/R and the release of factors involved in cell death.

Different mediators impacting on the cardiomyocyte membrane produce the activation of multiple signaling cascades that culminate on mitochondria. These cascades involve different protein kinases, including those activated by mitogens (MAPK), being p38 one of its subfamilies. With regard to this protein kinase, there are studies that show its cardioprotective role, while others indicate its participation in the injury generated by I/R.

The general objective of this thesis work was to examine the participation of NBCe1 and CA to the myocardial and mitochondrial alterations produced by I/R, analyzing the involved signaling pathways. Specifically, our study aimed to determine the effects of NBCe1 and AC blockade on infarct size, post-ischemic myocardial function, mitochondrial Ca^{2+} retention capacity, MPTP sensitivity to Ca^{2+} and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). The analysis of the participation of p38MAPK in the observed effects was also other objective of our investigation.

To achieve these objectives, isolated hearts from Wistar rats of 4 to 5 months old, perfused by the Langendorff system, were subjected to a normothermic global ischemia of 30 minutes and then reperfused for 1 hour. Other hearts were treated during the first 10 minutes of reperfusion with an antibody against loop 3 of NBCe1 (a-L3) or benzolamide (BZ, AC inhibitor). In another experimental group, the hearts were treated during the 10 minutes prior to ischemia and the first 10 minutes of reperfusion with 6-etoxyzolamide (ETX, AC inhibitor). For the RA protocol, hearts were perfused during the first 3 minutes of reperfusion with a solution of pH = 6.4. In this group, the reperfusion was completed until reaching 60 min with the solution of pH = 7.4.

The application of 30 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion produced an infarct size of approximately 32 %. This value decreased significantly with the treatments, reaching approximately 10, 6, 11 and 9 % in a-L3, BZ, ETX and RA groups, respectively.

The myocardial systolic function decreased approximately 80 % at the end of the reperfusion period. The treatment with a-L3, BZ, ETX and RA improved post-ischemic myocardial recovery reaching higher values than those observed in CI and S (62, 71, 62 and 55 % of the pre-ischemic values, respectively vs. 20 %). The diastolic function was also improved with all treatments. The increase in end diastolic pressure observed during reperfusion was significantly decreased in hearts treated with a-L3, BZ, ETX and RA.

The mitochondrial alterations detected in the reperfusion were significantly attenuated by the treatments. Thus, the mitochondrial depolarization ($\Delta\psi_m$ approximately -95 mV) observed in the untreated group was completely reversed, acquiring values of approximately -140 mV in hearts treated with a-L3, BZ, ETX and RA. This value was similar to that obtained in non-ischemic hearts. The mitochondrial samples from the treated hearts also showed a recovery of the Ca^{2+} retention capacity and the response to that ion associated to a less PPTM opening.

Regarding p38MAPK, its expression decreased to 41 % in hearts subjected to I/R but increased significantly in the presence of a-L3, BZ, ETX and RA, acquiring values of around 135 %. In order to determine a possible activation pathway of p38MAPK and a possible target of it, we

evaluated the expression of calcineurin (Ca^{2+} dependent phosphatase) and the heat shock protein 27 (HSP27) in all the experimental groups. Our data show that calcineurin expression increased while HSP27 decreased in untreated hearts. The blockade of NBCe1, the inhibition of AC and RA decreased the calcineurin and increased the HSP27 contents.

Our data also show that the administration of SB202190, inhibitor of p38MAPK, abolished all the beneficial effects observed in hearts treated with α -L3, BZ, ETX and RA.

Therefore, the results obtained in this thesis work show that the blockade of the extracellular loop 3 of NBCe1 with α -L3, the AC inhibition with BZ or ETX, and RA:

1- Reduce the infarct size and increase the recovery of the post-ischemic myocardial systolic and diastolic function.

2- Improve the mitochondrial state, attenuating depolarization and recovering the capacity of retention and response to Ca^{2+} .

3- Promote a decrease of calcineurin A β expression and an increase of P-p38MAPK and P-HSP27 contents.

These data indicate that a reduction of Ca^{2+} overload, consequent to a reduced activity of the alkalizing mechanisms, could be responsible for the less activation of calcineurin, activation of p38MAPK-HSP27 and improvement of mitochondrial state as the end target of cardioprotection. In addition, these results suggest that the treatments used here could serve as potential therapeutic tools to attenuate the myocardial and mitochondrial damage produced by I/R.

Abreviaturas y símbolos

IAM	Infarto agudo de miocardio	MKK	MAPK quinasa
EROs	Especies reactivas del oxígeno	ERK 1 y 2	quinasas reguladas por señales extracelulares
TnI	Troponina I	JNKs 1, 2, 3	quinasas c-Jun N-terminal
pHi	pH intracelular	VI	Ventrículo izquierdo
NHE	Intercambiador Na^+/H^+	PDF	Presión diastólica final
NBC	Co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	PVI	presión del ventrículo izquierdo
CHE	Intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	PDVI	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
SLC26a6	Intercambiador aniónico acidificante	+dP/dt_{max}	Máxima velocidad de desarrollo de la PVI
NBCe1	Isoforma 1 del Co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico	-dP/dt_{max}	Máxima velocidad de descenso de la PVI
NBCn1	Isoforma 1 Co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electroneutro	CNI	Control no isquémico
AC	Anhidrasa carbónica	CI	Control isquémico
NCX	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	S	Control isquémico con suero
PPTM	Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial	a-L3	Antisuero contra el bucle extracelular 3 del NBCe1
MME	Membrana mitocondrial externa	BZ	Benzolamida
MMI	Membrana mitocondrial interna	ETX	6-etoxizolamida
EIM	Espacio intermembrana	RA	Reperfusión ácida
Δp	Fuerza protón-motriz	TTC	Cloruro de trifeniltetrazolio
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial	TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
ANT	Adenina nucleótido translocasa	GSH	Glutación reducido
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje	DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico
PBR	Receptor periférico de benzodiazepinas	TCA	Ácido tricloroacético
Bax/Bcl2	Proteínas derivadas del protooncogen de la célula B del linfoma 2	RIPA	Buffer para radioinmunoprecipitación
HK II	Hexoquinasa II	DTT	Ditiotreitol

CK	Creatina quinasa
Cyp-D	Ciclofilina D
Akt	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa G
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MKKK	MAPK quinasa quinasa

EGTA	Etilenglicol tetraacético
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
DL	Dispersión de la luz
CRC	Capacidad de retención de Ca^{2+}
R-132	Rodamina-123 (cloruro de 3,6-diamino -9-(2-(metoxycarbonil) fenil xantina)

Índice

1. Introducción	1
1.1 Isquemia-reperfusión	2
1.2 Alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión	2
1.3 Regulación del pH intracelular	3
1.4 Cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC)	4
1.5 Regulación del NHE y del NBC por las anhidrasas carbónicas	5
1.6. Mecanismos subyacentes a la injuria por isquemia-reperfusión	7
1.7. Mitocondrias	9
1.8 Poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)	10
1.9 Mecanismos cardioprotectores: participación de quinasas	13
2. Objetivos	15
3. Materiales y métodos	17
3.1. Animales	18
3.2. Obtención del corazón aislado	18
3.3. Protocolos experimentales	19
3.4. Parámetros medidos	21
3.4.1. Función sistólica y diastólica miocárdicas	21
3.4.2. Determinación del tamaño del infarto	22
3.4.3. Determinaciones bioquímicas	22
3.5. Aislamiento de mitocondrias	24
3.5.1. Mediciones en mitocondrias aisladas	25
3.6. Determinación de proteínas	29
3.7. Análisis estadístico	29
4. Resultados	30
4.1 Efectos de la inhibición del bucle extracelular 3 de la isoforma 1 del cotransportador sodio bicarbonato electrogénico (nbce1)	31
4.2 Efectos de la inhibición de la anhidrasa carbónica con benzolamida (BZ)	44
4.3 Efectos de la inhibición de la anhidrasa carbónica con etoxizolamida (ETX)	57

4.4 Efectos de la reperfusión temprana con una solución ácida (RA)	70
4.5 Expresión de calcineurina A β	83
4.6 Expresión de P-HSP27	84
4.7 Evaluación del daño oxidativo en las distintas intervenciones	85
5. Discusión	87
6. Conclusiones	93
Publicaciones derivadas del trabajo de Tesis Doctoral	96
Bibliografía	98

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Isquemia-reperfusión

En condiciones fisiológicas, la circulación coronaria aporta el oxígeno que el corazón requiere para su normal funcionamiento. La ausencia de flujo sanguíneo causa un desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno, proceso conocido como isquemia (del griego isch-, restricción y -hema, sangre). La isquemia miocárdica produce un patrón característico de cambios metabólicos y ultraestructurales que si se prolonga conduce a una lesión irreversible. Esto cobra aún mayor relevancia teniendo en cuenta que las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en los países desarrollados. En la República Argentina, según datos del Ministerio de Salud hasta 2013, alrededor del 40% de personas por año fallecen por esta causa (Figura 1).

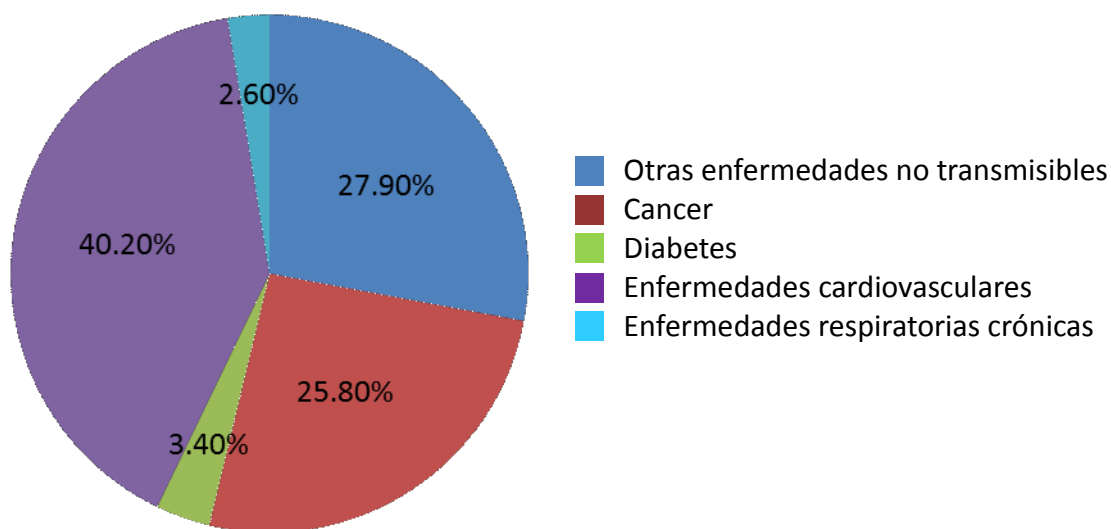


Figura 1: Porcentaje de mortalidad de enfermedades no transmisibles obtenidos por la Dirección de Estadísticas e Información en Salud, 2013. <http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/vigilancia/areas-de-vigilancia/mortalidad>

1.2 Alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión

Las alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión son el atontamiento miocárdico, las arritmias y el infarto miocárdico. La aparición del atontamiento o del infarto depende de la duración de la isquemia. Períodos de isquemia de aproximadamente 15 minutos desencadenan el atontamiento miocárdico que se describe como una alteración reversible. Esto significa que al

restablecer el aporte sanguíneo (reperfusión) la función del corazón queda disminuida y tarda horas o días en recuperarse, pero no hay muerte celular. La sobrecarga de Ca^{2+} y la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) son las dos hipótesis que permiten explicar el atontamiento miocárdico (Bolli, 1990; Kloner y col 1998). La injuria producida por el Ca^{2+} es en parte mediada por la proteólisis que ocurre como resultado de la activación de proteasas (calpaínas) dependientes de Ca^{2+} . Especialmente la calpaína cliva a la troponina I (TnI), provocando una respuesta disminuida de los miofilamentos al Ca^{2+} (Gao y col, 1997).

Si la isquemia se extiende más allá de 20 minutos las alteraciones del miocardio pasan a un estado irreversible caracterizado por la pérdida de integridad estructural del miocito (interrupciones de la membrana plasmática, inflamación celular, agregación periférica de la cromatina nuclear y alterada arquitectura mitocondrial). Es así, que en presencia de una sostenida oclusión de la arteria coronaria izquierda, usualmente diagnosticada como infarto agudo de miocardio (IAM), puede resultar en muerte temprana por paro cardíaco debido a arritmias o en una disminución significativa de la contractilidad del ventrículo izquierdo. La restauración del flujo coronario a través de la arteria ocluida es el principal tratamiento del IAM y su aplicación temprana es central para limitar la extensión de la injuria irreversible. Sin embargo, es reconocido que la perfusión está asociada a una posterior injuria (Yellon y Baxter, 2000; Downey y Cohen, 2006). Por lo tanto, es apropiado hablar del IAM como una patología por isquemia-reperfusión.

1.3 Regulación del pH intracelular

Las células cardíacas poseen diferentes transportadores iónicos de membrana encargados de regular el pH intracelular (pHi) (Figura 2). Existen dos mecanismos alcalinizantes: el intercambiador Na^+/H^+ (NHE), que cataliza el influjo de un Na^+ por cada H^+ que extrae del espacio citosólico (Orlowski y col., 2004), y el co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), que impulsa el coinflujo de un Na^+ y de una o dos moléculas de HCO_3^- (Romero y col., 2004). Como mecanismos acidificantes se reconocen el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE) y el Cl^-/OH^- (CHE). Ambos ingresan un Cl^- por cada HCO_3^- u OH^- respectivamente (Álvarez y col., 2004; Niederer y col., 2008). En miocitos cardíacos se demostró la existencia de un nuevo intercambiador aniónico acidificante denominado SLC26a6 capaz de intercambiar Cl^- por HCO_3^- , así como también sulfato (SO_4^{2-}) u oxalato ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) (Álvarez y col., 2004).

En condiciones fisiológicas, en las cuales el HCO_3^- se encuentra presente, la contribución de NHE y NBC, a pH cercanos al basal, es prácticamente la misma. Sin embargo, a medida que el pH basal disminuye el NHE adquiere mayor importancia (Vaughan-Jones y col., 2009).

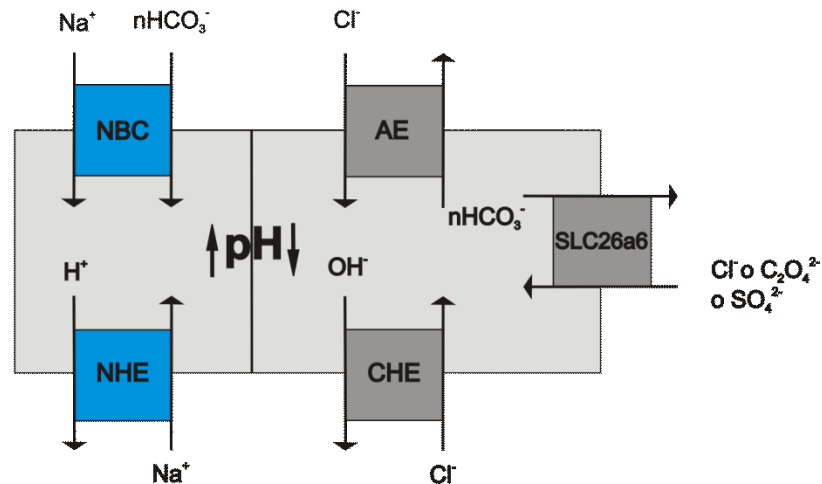


Figura 2: Esquema de los principales mecanismos reguladores del pH en cardiomiocitos. NBC y NHE como mecanismos alcalinizantes y AE, CHE o SLC26a9 como mecanismos acidificantes.

1.4 Co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC)

Boron y Boulpaep trabajando en túbulos renales de salamandra describieron un cotransporte electrogénico dependiente de Na^+ y de HCO_3^- (Boron y Boulpaep, 1983). En 1997, Romero y col., clonaron la secuencia codificante de la proteína bautizada NBCe1-A. NBC por sus siglas en inglés "Natrium/Bicarbonato Cotransporter", "e" por electrogénico, "A" por la primera variante de splicing del gen y "1" por ser el primero de dos genes que codifican para un cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico.

Posteriormente, este cotransporte se encontró en otras especies como en la rata y en el humano (Burnham y col., 1997; Romero y col., 1998). El NBCe1 posee al menos dos estequiometrías, 1 : 2 o 1 : 3 ($\text{Na}^+ : \text{HCO}_3^-$), dependiendo de la localización (Sciortino y col., 1999; Muller-Berger y col., 2001; Gross y col., 2001; Aiello y col., 1998;), siendo en músculo cardíaco la 1 : 2 (Villa-Abrille y col., 2007).

El co-transportador NBCe1 es una glicoproteína de membrana de 130 kDa. Las cadenas peptídicas atraviesan al menos en 10 oportunidades la membrana plasmática (Tatishchev y col., 2003). Basándose en la estructura del intercambiador aniónico 1 (AE1) se predicen 13 dominios transmembranas y 2 bucles reentrantes (Boron, 2006; Zhu y col., 2003). Además, entre los

dominios transmembranas 5 y 6 existe un largo bucle extracelular glicosilado (bucle 3) y uno más pequeño entre los dominios 7 y 8 (bucle 4), a los que se le han atribuido propiedades regulatorias (Boron y col., 2009) (Figura 3).

La principal función del NBCe1 es regular el pH_i , contribuyendo en un 50 % a la extrusión de protones (Lagadic-Gossman y col., 1992). A su vez, la corriente repolarizante generada por el NBCe1 contribuye a la duración y a la configuración del potencial de acción en miocitos aislados de gato y rata (Aiello y col., 1998; Villa-Abrille y col., 2007).

En un trabajo publicado en el año 2011 por el grupo de Aiello, se describió el efecto de dos anticuerpos desarrollados por el mismo grupo contra los bucles 3 y 4 del NBCe1, denominados α -L3 y α -L4, respectivamente (De Giusti y col., 2011). El tratamiento con ambos anticuerpos modulan la actividad del NBCe1 en dirección opuesta. Así el α -L3 inhibe su actividad mientras que el α -L4 aumenta la actividad del co-transportador.

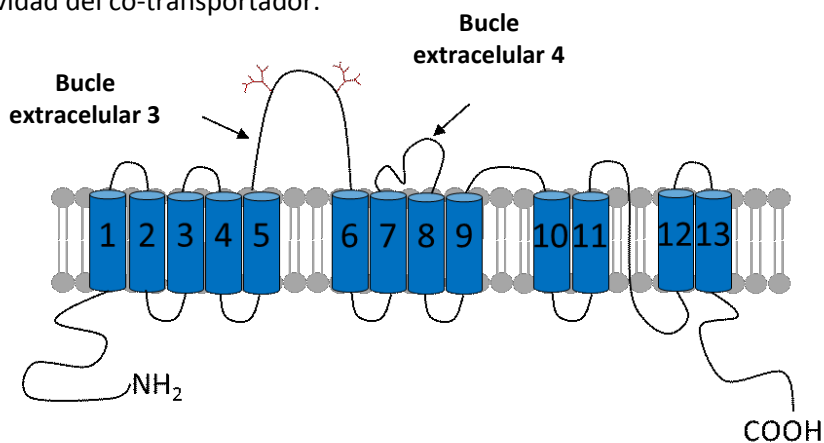


Figura 3: Modelo topológico del NBCe1. Se distinguen los dominios N-terminal y C-terminal intracelulares y los bucles extracelulares 3 y 4.

En el año 2000 fueron encontradas y caracterizadas electrofisiológicamente en la aorta de rata tres variantes más del NBC, determinándose un cotransporte electroneutro, con una estequiometría 1 : 1, que por esta razón se lo rebautizó como NBCn1 (Tatishchev y col., 2003; Choi y col., 2000).

1.5 Regulación del NHE y del NBC por las anhidrasas carbónicas

Las anhidrasas carbónicas (AC) son una familia de metaloenzimas que se encuentran prácticamente en todos los organismos (Dodgson, 1991). Poseen un ion zinc (Zn^{2+}) en su centro catalítico que se encuentra coordinado por los anillos imidazol de tres histidinas. Dicha región es

fundamental en la hidratación reversible del dióxido de carbono (CO_2) para producir un intermediario inestable, el ácido carbónico (H_2CO_3), que espontáneamente se hidroliza en HCO_3^- y H^+ (Henry, 1996).

Se han encontrado 16 AC en mamíferos (Lindskog y Nyman, 1964) que difieren en sus propiedades enzimáticas, secuencias aminoacídicas y sitios de expresión (Esbaugh y Tufts, 2006). Las isoenzimas de AC poseen diferentes propiedades cinéticas y diferente localización (Sly y Hu, 1995):

- ACI, ACII, ACIII y ACVII son citosólicas
- ACV es mitocondrial
- ACVI se encuentra en secreciones salivales
- ACIV, ACIX, ACXII y ACXIV son proteínas de membrana

El corazón expresa ACII, ACIV anclada a la membrana plasmática a través de un grupo glucosilfosfatidil inositol (Okuyama y col., 1992; Waheed y col., 1992; Fleming y col., 1993), ACIX y ACXIV, ambas con un segmento transmembrana (Purkerson y Schwartz, 2005; Scheibe y col., 2006) y AC V (Álvarez y col., 2013) (Figura 4). La ACIX y ACXIV realizan su actividad catalítica en el medio extracelular, mientras que la ACII la realiza en el citoplasma de las células.

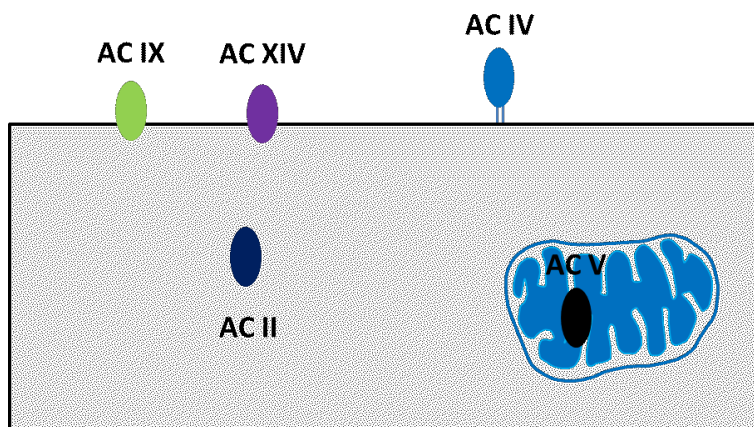


Figura 4: Esquema representativo de la distribución de las anhidrasas carbónicas (AC) en el cardiomiocito.

Estudios previos demuestran que las AC interactúan con el NBC y el NHE formando lo que se conoce como metabolón de transporte iónico. Específicamente, el NHE interactúa con la ACII, (Li y col., 2002) mientras que el NBC lo hace con la ACIX (Orlowski y col, 2012).

Un metabolón es un complejo físico de enzimas asociadas de manera secuencial (Srere, 1987). Los metabolones permiten mover metabolitos desde el sitio activo de una enzima a la siguiente de manera optimizada, proceso conocido como canalización de sustratos (Reithmeier, 2001). La canalización disminuye la pérdida de metabolitos intermedios debido a la orientación de los sitios activos de las enzimas que se mantienen relativamente cerca (Srere, 1987; Miles y col., 1999; Sterling y col., 2001). De esta manera, el flujo a través de la vía enzimática es acelerado por la colocalización enzimática (Figura 5).

Se habla de metabolón de transporte iónico cuando las enzimas interaccionan con transportadores iónicos. Las enzimas aumentando localmente la concentración de iones producto de su actividad, favorecen el gradiente y por lo tanto el flujo de iones que atraviesa la membrana a través del transportador.

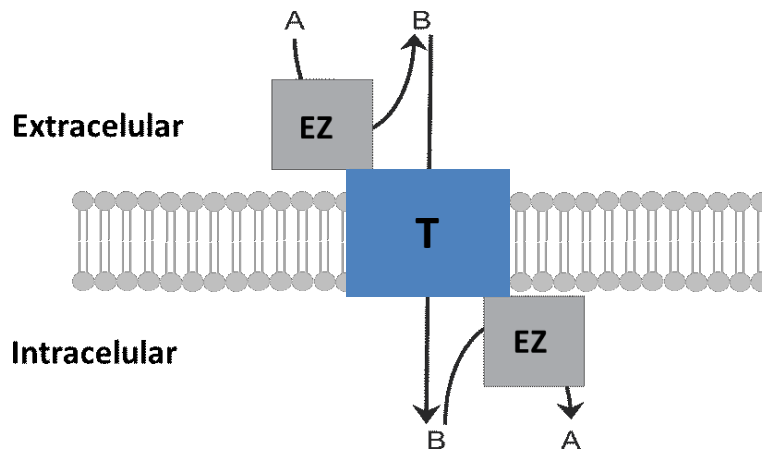


Figura 5: Mecanismo de acción del metabolón de transporte iónico. Una enzima (EZ) cataliza la conversión de A en B, aumentando su concentración muy cerca del transportador específico (T) para B. En el interior celular, EZ utiliza como sustrato a B disminuyendo su concentración y aumentando la fuerza impulsora del transportador.

1.6. Mecanismos subyacentes a la injuria por isquemia-reperfusión

La sobrecarga de Ca^{2+} y la producción abrupta de EROs son los factores más importantes responsables de las alteraciones por isquemia-reperfusión (Figura 6). El aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} ocurre por distintos mecanismos. Durante la isquemia los cardiomiocitos se vuelven dependientes de la glucólisis anaeróbica para la generación de ATP. Esto conduce a una acumulación de lactato y, por lo tanto, a un descenso del pH_i. Estudios de

resonancia magnética nuclear demostraron que el pH_i puede llegar a valores de aproximadamente 6,4 después de 20 min de isquemia en corazones aislados de rata (Inserte y col, 2008). La disminución del pH_i conduce a la activación de NHE y NBC y a la consecuente acumulación de Na^+ . Estos iones son extruidos de la célula intercambiados por Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX). La dirección del funcionamiento de NCX depende de la diferencia entre el potencial transmembrana y el potencial de reversión de NCX y, por lo tanto, está determinado por las concentraciones intra y extracelulares de Na^+ y Ca^{2+} (Blaustein y Lederer WJ, 1999). En condiciones fisiológicas, el NCX opera principalmente extruyendo Ca^{2+} del citosol (Grantham y Cannell, 1996). Sin embargo, durante la isquemia la acumulación intracelular de Na^+ produce la activación del modo reverso del NCX determinando una entrada neta de Ca^{2+} . Este aumento del Ca^{2+} citosólico se agrava durante la reperfusión, donde el lavado del medio extracelular y la consecuente eliminación de H^+ restablece o aumenta el gradiente de pH a través de la membrana del cardiomiocito, acelerando así la función de los mecanismos alcalinizantes antes descritos (Vandenberg y col., 1993). Otro mecanismo responsable de la sobrecarga de Na^+ intracelular es la disminución en la extrusión de Na^+ dependiente de energía. Las bajas concentraciones de ATP afectan la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa del sarcolema, participando así en la sobrecarga citosólica de Na^+ .

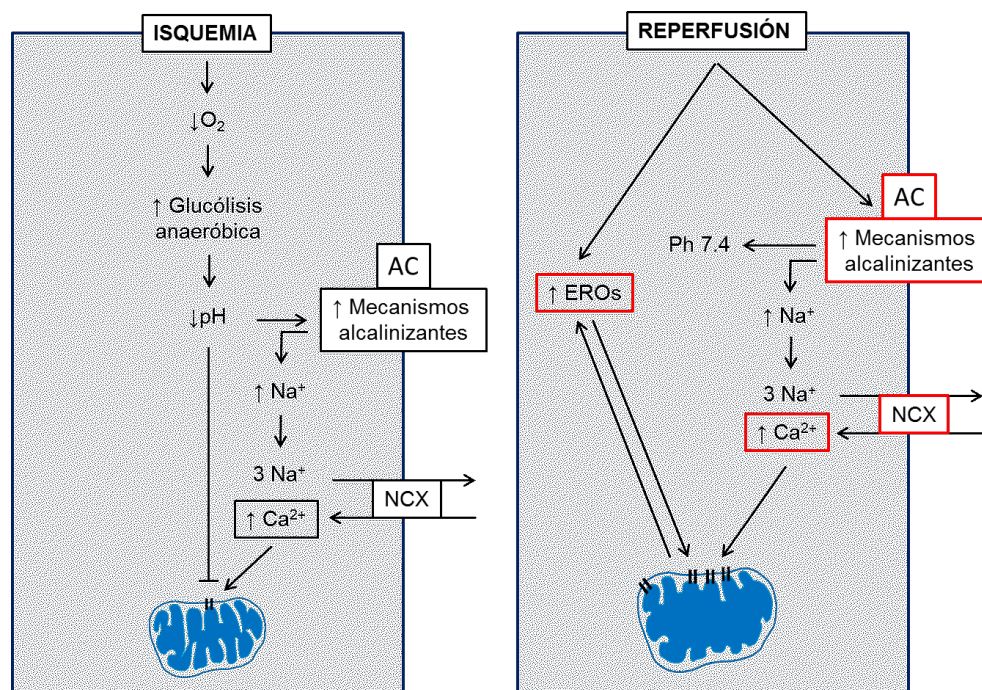


Figura 6: Eventos que suceden en la isquemia y reperfusión miocárdica. EROs: especies reactivas del oxígeno, NCX: intercambiador Na^+/Ca^{2+}

El hecho de que la prevención de la sobrecarga de Na^+ solo atenúa el aumento de Ca^{2+} citosólico durante la isquemia (Murphy y col., 1991) sugiere aumentos de Ca^{2+} independientes de Na^+ . Estos ocurren, por ejemplo, a través del canal Ca^{2+} de tipo L (Sun y col., 2006) o por la inhibición de la bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplasmático (Murphy y Steenbergen, 2008).

Con respecto a la producción de EROs, esta ocurre principalmente al comienzo de la reperusión. Dentro de las EROs se encuentran especies radicales como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el anión hidroxilo ($\text{OH}^{\cdot}$) y especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Un radical libre es por definición toda especie química capaz de una existencia independiente, que contenga en su capa electrónica externa uno o más electrones no apareados. Un radical libre puede donar su electrón no apareado a un compuesto no-radical o apropiarse de un electrón de otra molécula para formar su par electrónico. En estos casos el radical deja de serlo y la otra molécula se transforma en un radical. Así se puede iniciar y perpetuar una cadena de reacciones como ocurre por ejemplo en la peroxidación de ácidos grasos insaturados. Cuando la producción de EROs no excede la capacidad antioxidante del tejido estas especies, actuando como segundos mensajeros, ejercen efectos beneficiosos para la supervivencia de la célula (Herrlich y Bohmer, 2000). Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre la producción de EROs y el contenido y/o actividad de los sistemas antioxidantes, se produce el llamado “estrés oxidativo”. En estas condiciones el exceso de EROs puede oxidar a casi todas las biomoléculas provocando la lesión celular/tisular (Sies, 1985) y específicamente en la mitocondria contribuyen a la formación del poro de permeabilidad transitoria (PPTM) (Halestrap y col, 2004). Estos efectos nocivos de EROs contribuyen al daño miocárdico que ocurre durante la isquemia-reperusión (Granger, 1999; Kvietys y Granger, 2012; Raedschelders y col, 2012). Por lo tanto, intervenciones que disminuyen la producción de EROs o aumentan los sistemas antioxidantes, atenúan las alteraciones producidas por la isquemia-reperusión (Kevin y col, 2003).

1.7. Mitocondrias

Las mitocondrias son organelas definidas por dos membranas estructural y funcionalmente diferentes: la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). El espacio comprendido entre ellas se denomina espacio intermembrana (EIM) y el determinado por la MMI es la matriz mitocondrial. La MMI se caracteriza por formar las crestas mitocondriales, que son pliegues que se originan de pequeñas estructuras puntuales de la

membrana llamadas uniones de cresta y que determinan compartimentos. Estas uniones limitan la difusión de moléculas desde la matriz hacia el EIM, creando así un microambiente donde los complejos de la cadena respiratoria y diferentes proteínas son alojados y protegidos de la difusión aleatoria (Mannella, 2006) (Figura 7).

En estas organelas, el flujo de electrones a lo largo de los complejos respiratorios provee la energía para el bombeo de H^+ de la matriz al EIM. La fuerza protón-motriz (Δp) resultante acciona el mecanismo de la ATP-sintasa que conduce a la síntesis de ATP. El componente principal del Δp es el potencial de membrana ($\Delta\psi_{mit}$) (Nicholls y Ward, 2000).

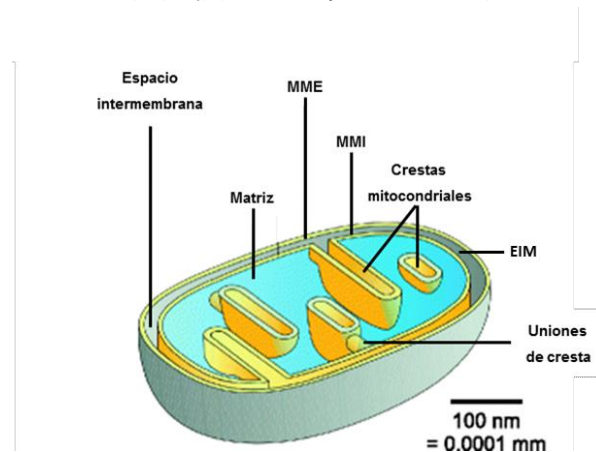


Figura 7: Compartimentos mitocondriales. MMI: membrana mitocondrial interna, MME: membrana mitocondrial externa, EIM: espacio intermembrana

Una característica importante de las mitocondrias es la capacidad para acumular Ca^{2+} . Se ha establecido un modelo para el manejo de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas basado en tres procesos: captación de Ca^{2+} , almacenamiento de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y liberación de Ca^{2+} (György y Duchon, 2008).

El Ca^{2+} ingresa a la mitocondria principalmente a través una proteína transportadora conocida como *uniporter* de Ca^{2+} , siendo el $\Delta\psi_m$ el componente principal de la fuerza impulsora (Santo-Domingo y Demaurex, 2010). En cuanto a las vías de eflujo, la principal es el intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial, aunque también participan el intercambiador Ca^{2+}/H^+ mitocondrial y el PPTM (Dedkova y Blatter, 2013).

1.8 Poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)

Frente al estrés, las mitocondrias responden con la formación y/o apertura del PPTM. Este poro es de naturaleza no específica, multimérico, de alta conductancia y dependiente de voltaje. Si bien la concepción del PPTM ha cambiado a lo largo de los años, actualmente su existencia es ampliamente aceptada aunque su naturaleza molecular sigue sin conocerse plenamente.

En un principio, el PPTM fue considerado un complejo multiproteico abarcando ambas membranas mitocondriales y constituido por la adenina nucleótido translocasa (ANT), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDA) y el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR). Posteriormente, se sugirió la participación de miembros de la familia Bax/Bcl-2 (proteínas derivadas del protooncogen de la célula B del linfoma 2) y de proteínas como la hexoquinasa II (HK II), creatina quinasa mitocondrial (CK) y la peptidil-prolil isomerasa ciclofilina D (Cyp-D) (Zamzami y Kroemer, 2001) en el PPTM. Estudios posteriores demuestran que se puede inducir la apertura del PPTM en ausencia de ANT (Kokoszka y col., 2004), VDAC (Baines y col., 2007) o PBR (Šileikyte y col., 2014). Además, estudios en ratones muestran que CyP-D, aunque no es un componente estructural esencial del poro, es un modulador importante de la respuesta del PPTM al Ca^{2+} (Baines y col., 2005).

Al estudiar las interacciones de proteínas mitocondriales, se encontró que la CyP-D se asocia con la ATP-sintasa (Giorgio y col., 2009). Esta enzima está formada por dos complejos principales: uno llamado FO que atraviesa la MMI y otro, denominado F1 que sobresale de la membrana. En este sentido, estudios previos, realizados en mitocondrias de corazón bovino (Giorgio y col., 2013), levaduras (Carraro y col., 2014), *Drosophila* (von Stockum y col., 2015) y mitocondrias humanas (Leung y Halestrap, 2008), muestran que dímeros de ATP-sintasa forman canales de alta conductancia activados por Ca^{2+} cuyas características electrofisiológicas coinciden con las del PPTM (Alavian y col., 2014). Sin embargo, el mecanismo por el cual la ATP-sintasa formaría el PPTM es una pregunta abierta. Dos hipótesis tratan de responder esta pregunta: una de ellas sugiere que el PPTM se forma dentro de la subunidad Fo (Alavian y col., 2014) y otra que el poro se forma en la dimerización de la ATP-sintasa, en la interface entre monómeros (Carraro y col., 2014). En la Figura 8 se esquematizan los dos modelos antes descritos.

La apertura de PPTM está ligada a la disfunción mitocondrial porque su aparición conduce a la despolarización mitocondrial, al cese de la síntesis de ATP, a la liberación de Ca^{2+} , a la disminución de nucleótidos de piridina, a la inhibición de la respiración y, al menos *in vitro*, a la hinchazón de la matriz. Esta hinchazón causa la rotura de la membrana mitocondrial externa y finalmente la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c, la endonucleasa G y el

factor inductor de apoptosis (Bernardi y col., 2006; Rasola y Bernardi, 2011). Estos efectos perjudiciales sólo se observan en las aperturas irreversibles del PPTM (Petronilli y col., 2001) mientras que las aperturas transitorias, observadas en mitocondrias aisladas como *in situ* (Hüser y col., 1999; Petronilli y col., 1999) parecen estar involucradas en la regulación fisiológica de la homeostasis del Ca^{2+} y las EROs (Zorov y col., 2014).

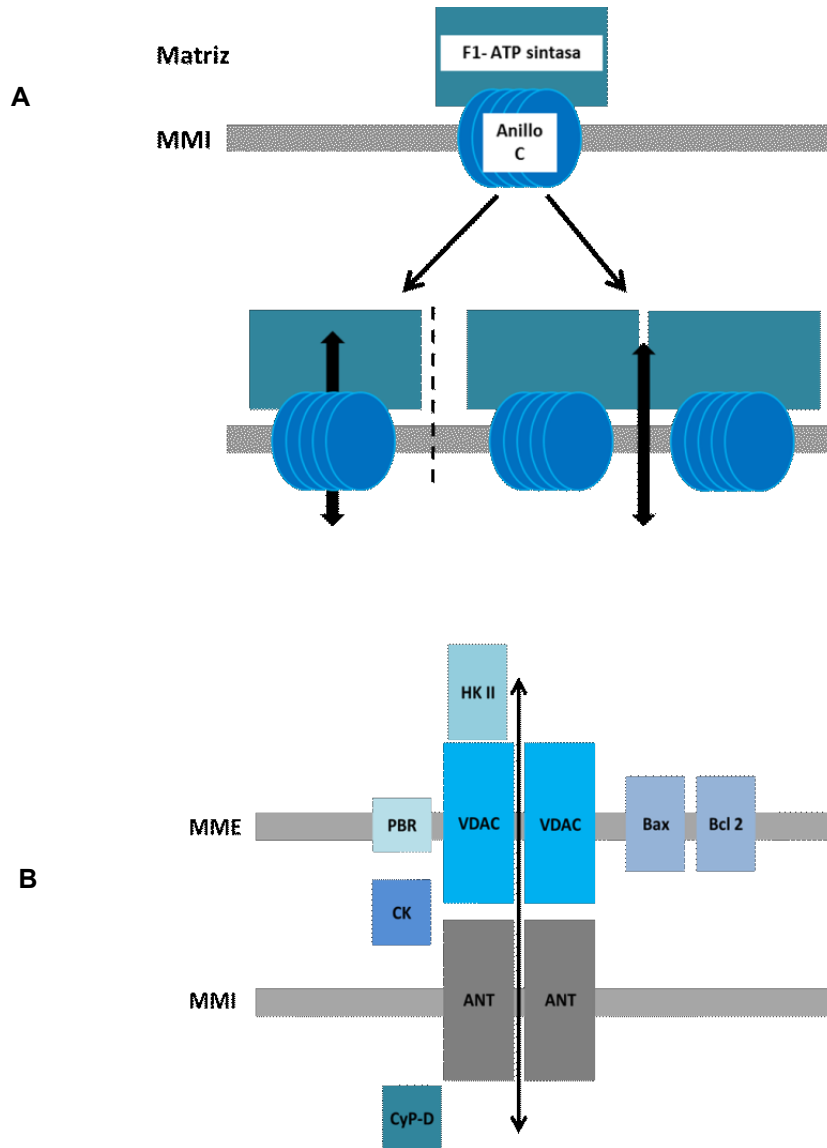


Figura 8: Esquemmatización de las dos teorías sobre la naturaleza molecular del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM). A. La participación de la ATP-sintasa en la formación del PPTM. B. Conformación multiproteica del PPTM. VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje, HK: hexoquinasa, PBR: receptor periférico de benzodiazepinas, Cyp-D: ciclofilina D; CK: creatina quinasa, ANT: adenina nucleótido translocasa; Bax: proteína 4 similar a bcl-2, Bcl2: proteína derivada del protooncogen de la célula B del linfoma 2, MME: membrana mitocondrial externa y MMI: membrana mitocondrial interna.

Además de las EROs y la sobrecarga de Ca^{2+} , otros factores están involucrados en la apertura del PPTM. Entre ellos: (i) Despolarización marcada de la membrana mitocondrial interna (Bernardi, 1992); (ii) Aumento de la concentración de fosfato inorgánico (Lea y col., 2012); (iii) Protonación reversible de residuos de histidilo (Nicolli y col., 1996); (iv) Disminución de nucleótidos de adenina (Halestrap y col., 1998); (v) Presencia de metabolitos como la glucosa y la creatina que inhiben la apertura del PPTM posiblemente a través de su acción sobre la HK y CK, respectivamente (Azoulay y col., 2004, Datler y col., 2014); (vii) Miembros anti-apoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Karch y col., 2015, Chen y col., 2015).

1.9 Mecanismos cardioprotectores: participación de quinasas

El papel de las mitocondrias y específicamente del PPTM en la injuria producida por la isquemia-reperfusión se formuló a fines de los años 80 (Crompton y col., 1987). La combinación de enfoques farmacológicos y bioquímicos indica que la apertura del PPTM se produce principalmente al comienzo de la perfusión. Las condiciones asociadas con la perfusión, como la acumulación de EROs, la normalización del pH y el aumento de Ca^{2+} crean un escenario ideal para la apertura del PPTM. Por lo tanto, el mayor desafío es encontrar herramientas capaces de disminuir estas alteraciones ocasionadas por la perfusión. En este sentido, la descripción del post-acondicionamiento isquémico (Zhao et al. 2003) movió el interés de la comunidad científica a la búsqueda de estrategias de protección aplicables en el momento de la perfusión miocárdica. Así, se demostró que una amplia gama de agentes farmacológicos (adenosina, ciclosporina A, eritropoyetina, morfina, péptido similar a glucagón), aplicados al inicio de la perfusión, eran capaces de disminuir la muerte celular (Bell y Yellon 2011; Sharma y col., 2012; Hausenloy y Yellon, 2009). Estos mediadores impactan sobre la membrana de los cardiomiocitos produciendo la activación de cascadas intracelulares que principalmente involucran proteínas quinasas llamadas de pro-supervivencia (Yellon y Hausenloy, 2007; Hausenloy y Yellon, 2007). Entre ellas están la proteína quinasa B (Akt), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa G (PKG) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Michel y col., 2001; Vassalli y col., 2012).

Los MAPK son parte de cascadas de señalización que constan de tres niveles, una MAPK quinasa quinasa (MKKK) que activa una MAPK quinasa (MKK) que finalmente activa a una MAPK. Estas cascadas de tres quinasas están organizadas en módulos que se han conservado desde las levaduras hasta los humanos lo que refleja su importancia fisiológica a lo largo de la filogenia. Las

12 MAPK identificadas se pueden agrupar en 5 subfamilias que incluyen a las ERK 1 y 2 (quinasas reguladas por señales extracelulares), JNKs 1, 2 y 3 (quinasas c-Jun N-terminal), p38 y las quinasas ERK 5 y ERK 3/4 (Widmann et al., 1999).

Con respecto a la p38 MAPK, se han identificado cuatro isoformas, α , β , γ y δ , siendo las dos primeras las más abundantes en el corazón. Estas proteínas quinasa median una amplia variedad de respuestas celulares frente a estímulos extracelulares tales como el estiramiento, el estrés oxidativo u osmótico, citoquinas proinflamatorias, acidosis y también están implicadas en la diferenciación celular, la apoptosis y la autofagia (Kim SO y col., 2000; Zheng y col., 2005; Roux y col., 2004)

Existen evidencias de que varias MAPK, y específicamente la p38 MAPK, se activan durante la isquemia miocárdica. Bogoyevitch y col (1996), utilizando un modelo de corazón de rata aislado y perfundido, demostraron que la p38 MAPK se activa a los 10 minutos de la isquemia. Posteriormente fue descrito que vuelve a valores basales luego de 15 minutos (Shimizu y col., 1998) ó 45 minutos de isquemia (Yin y col., 1997).

Distintos trabajos estudiaron el rol de la p38 MAPK en la injuria asociada a la isquemia-reperusión. Algunos estudios muestran que la activación de p38MAPK protege al miocardio (Nakano y col., 2000; Martin y col., 2001; Maulik y col., 2001; Mocanu y col., 2000), mientras que otros demuestran que es necesaria la inhibición de dicha quinasa para lograr tal efecto (Mackay y col., 2000; Gysembergh y col., 2001; Marais y col., 2001; Schneider y col., 2001).

En una revisión reciente (Pagliaro y col., 2018) se establece que las vías de señalización que incluyen las quinasas mencionadas convergen finalmente en las mitocondrias, reducen la probabilidad de apertura del PPTM y preservan la función mitocondrial.

Otra intervención cardioprotectora, descrita por Insette y col (2008) es la "reperusión ácida". En esta intervención se produce un retraso en la normalización del pH_i tras el periodo isquémico, llevando a una menor actividad de los mecanismos alcalinizantes (Orchard y Kentish, 1990) y por lo tanto, a una menor sobrecarga de Ca^{2+} . Este último efecto es generado no sólo por una menor entrada de Ca^{2+} a través del NCX (Philipson, 1982) sino también por la inhibición de la corriente de entrada de Ca^{2+} (Irisawa y Sato, 1986) y por una inhibición de la liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (Fabiato y Fabiato, 1978). Por otro lado, ha sido demostrado que la reperusión ácida inhibe la actividad de calpaína (Zhao y col., 1998) y la apertura del PPTM (Cohen y col., 2008)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo general de esta investigación fue examinar la contribución del co-transportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ (NBC) y de la anhidrasa carbónica (AC) a las alteraciones miocárdicas y mitocondriales producidas por la isquemia-reperfusión, analizando las vías de señalización involucradas.

2.2 Específicos

1) Examinar los efectos del bloqueo del bucle extracelular 3 de la isoforma 1 del co-transportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ electrogénico (NBCe1) mediante el tratamiento con un antisuero sobre el tamaño del infarto, la función miocárdica post-isquémica, el daño oxidativo, la sensibilidad del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM) al Ca^{2+} , la capacidad de retención de Ca^{2+} y el potencial de la membrana mitocondrial.

2) Evaluar los efectos de la inhibición de la anhidrasa carbónica (AC) mediante el uso de benzolamida (impermeable) o de 6-etoxizolamida (permeable) sobre las variables antes mencionadas.

3) Estudiar los efectos producidos por la perfusión ácida (RA) sobre las variables antes mencionadas

4) Estudiar las vías de señalización, especialmente aquellas en las que participa la p38MAPK, en los efectos observados en las distintas intervenciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Se utilizaron ratas machos Wistar de 4 a 5 meses de edad, con un peso de 300 a 400 g, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el Instituto Nacional de la Salud (NIH, Publicación No.85-23, revisada en 2011) y aprobada por el Comité de ética de la Facultad de Medicina de La Plata (CICUAL # P01-05-15).

3.2. Obtención del corazón aislado

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con uretano al 25% (0.6 ml/100 g). Se abrió rápidamente el tórax, se aisló la aorta y se cortaron las conexiones cardíacas liberando al corazón de grasa y tejido conectivo, sacándolo del animal. La aorta se ligó con hilo de lino a una cánula colocada en un sistema de perfusión de Langendorff. Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor de 50 segundos para evitar el deterioro del preparado. El corazón fue perfundido con una solución de Ringer compuesta por: ClNa 120 mM, Cl₂Ca 1.35 mM, ClK 4.7 mM, SO₄Mg 1.2 mM, CO₃HNa 20 mM y glucosa 11.1 mM, la cual fue termostatzada a 37°C y equilibrada con una mezcla gaseosa de 95% O₂ - 5% CO₂, para obtener un valor de pH de aproximadamente 7.40.

Luego de un breve período de estabilización, se produjo el bloqueo aurículo-ventricular dañando con una fina aguja el tejido conductivo del septum auricular. La estimulación eléctrica se realizó a través de dos electrodos que fueron suturados a la pared ventricular derecha para mantener la frecuencia cardíaca constante en un valor de 280 ± 10 latidos/minuto.

Para evaluar la actividad mecánica se colocó un balón de látex atado a un tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo (VI) a través de la válvula mitral. El extremo opuesto del tubo fue conectado a un transductor de presión (AD Instruments) que permitió medir la presión del ventrículo izquierdo (PVI) (Figura 1). El globo de látex y el tubo de polietileno se llenaron con un volumen de agua suficiente para lograr una presión diastólica final (PDF) de entre 8-12 mmHg. Dicho volumen se mantuvo constante durante todo el experimento.

La presión de perfusión coronaria fue monitoreada en el punto de canulación de la aorta y ajustada a valores entre 60 y 75 mmHg. El flujo coronario, controlado por una bomba peristáltica fue de aproximadamente 10-12 ml/minuto en todos los grupos experimentales. La PVI fue

adquirida usando un conversor analógico-digital y el programa de adquisición Chart V4.2.3 (AD Instruments). A través de esta señal se obtuvieron los parámetros mecánicos necesarios para evaluar la función miocárdica.

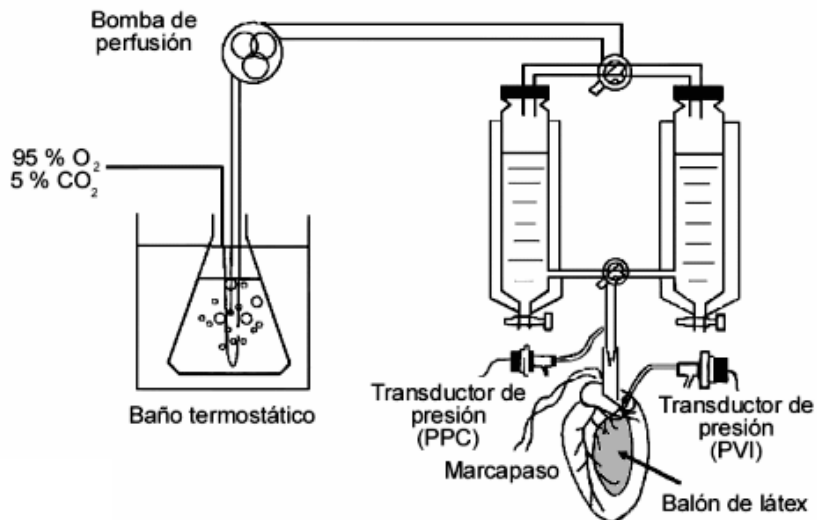
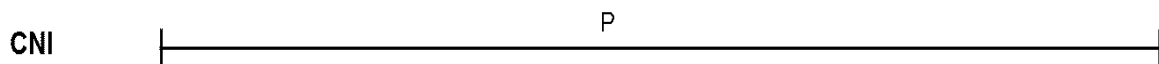


Figura 1: Representación esquemática del modelo experimental

3.3. Protocolos experimentales

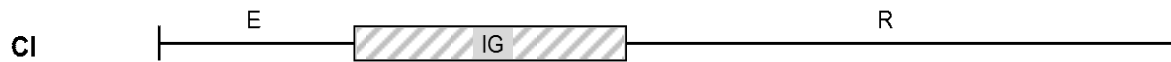
Después de un período de estabilización (E) de 20 minutos, se realizarán los siguientes protocolos experimentales:

Control no isquémico (CNI): Se realizó la perfusión (P) de los corazones hasta completar 110 minutos.

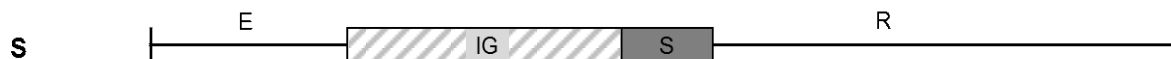


Control isquémico (CI): Se realizó una isquemia global (IG) normotérmica de 30 minutos. La isquemia se indujo deteniendo la perfusión, y el corazón se sumergió en una cámara conteniendo Ringer a 37 °C y luego se reperfundió (R) durante 1 hora. El tiempo de isquemia (30 min) fue

seleccionado basado en un estudio previo que muestra que la recuperación de la contractilidad durante la reperfusión alcanza valores suficientemente bajos para detectar un aumento frente a cualquier intervención o tratamiento (Negroni y col., 1982).



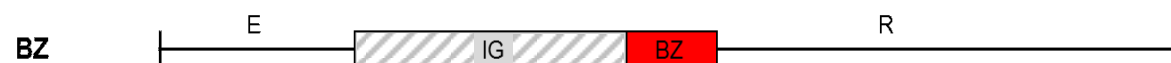
Control isquémico con suero (S): Se realizó una IG normotérmica de 30 minutos y durante los primeros 10 minutos de la R se administró una dilución 1:500 de suero normal de conejo.



Bloqueo del NBC (a-L3): Se realizó una IG normotérmica de 30 minutos y se administró durante los primeros 10 minutos de la R una dilución 1:500 del anti suero contra el dominio extracelular 3 del NBCe1.



Bloqueo de la AC: Se realizó una IG normotérmica de 30 minutos y se administró durante los primeros 10 minutos de la R el inhibidor **benzalamida (BZ, 5 μ M)** la cual no puede atravesar la membrana plasmática y por lo tanto sólo va a inhibir las isoformas de la AC IV, IX y XIV, o se administró durante los 10 minutos finales de la E y los primeros 10 minutos de la R el inhibidor **6-etoxizolamida (ETX, 100-150 μ M)**, la cual inhibe todas las isoformas de la AC.



Reperusión ácida (RA): Se realizó una IG normotérmica de 30 minutos y durante los primeros 3 minutos de la R los corazones fueron perfundidos con una solución de pH = 6.4. El pH de la solución ácida se ajustó disminuyendo la concentración de HCO_3^- . La reperusión se completó hasta alcanzar los 60 min con la solución de pH basal (7.4).



Para cumplir con el objetivo 4 y examinar la participación de la p38MAPK en los efectos observados, los protocolos anteriormente descritos fueron realizados en presencia de SB202190 10 μM , bloqueante de la p38MAPK. Esta droga fue agregada al corazón aislado en el líquido de perfusión durante los 10 o 3 primeros minutos de la reperusión, según corresponda.

Estos grupos experimentales fueron repetidos 3 veces, una de ellas se usó para evaluar el tamaño del infarto, otra el daño oxidativo y el contenido de quinasas y la otra para aislar las mitocondrias.

3.4. Parámetros medidos

3.4.1. Función sistólica y diastólica miocárdicas

La función sistólica fue evaluada a través de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (**PDVI**), que se calculó restando a la presión ventricular izquierda pico (PVIP) la presión diastólica final (PDF) y la máxima velocidad de desarrollo de la PVI (**+dP/dt_{max}**). La función diastólica se evaluó a través de la máxima velocidad de descenso de la PVI (**-dP/dt_{max}**) y de la PDF (Figura 2).

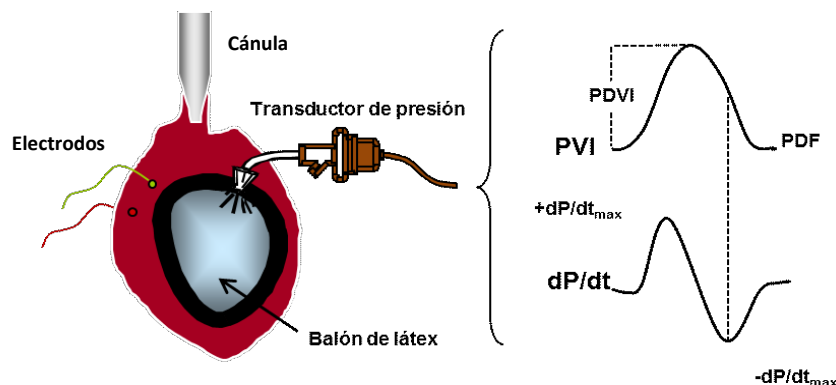


Figura 2: Representación esquemática de los parámetros usados para evaluar la función miocárdica

3.4.2. Determinación del tamaño del infarto

Al término del período de reperfusión el corazón fue retirado del sistema de perfusión de Langendorff y el VI, una vez pesado, se congeló a -20 °C por una hora. Al cabo de este tiempo el VI fue cortado en trozos de 2 mm de espesor de forma perpendicular al eje mayor desde la punta a la base, los cuales fueron pesados y sumergidos en una solución al 1 % de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) durante 15 min (Fishbein y col, 1981). El colorante ingresa a las células y al ser reducido queda atrapado en su interior tiñéndolas de color rojo. Sólo las células que conservan actividad deshidrogenasa, pueden retener este colorante. En consecuencia, las células que posean actividad de deshidrogenasa, quedarán teñidas de color rojo, mientras que las células muertas no se teñirán, permitiendo así la diferenciación del tejido infartado (Figura 3).

Los trozos de corazón fueron guardados en formalina al 10% por 20 minutos horas luego de lo cual se escanearon y, usando un programa de análisis de imágenes (Scion Image 1.62), se determinaron los pesos de las áreas de infarto y de las áreas de riesgo. El peso total del infarto se calculó como $(A1 \times P1) + (A2 \times P2) + (A3 \times P3) + (A4 \times P4) + (A5 \times P5) + (A6 \times P6)$, donde A es el área de infarto de cada trozo y P el peso respectivo. Como en esta preparación el corazón entero constituye el área de riesgo (AR), el peso total del área de riesgo fue calculado de la misma forma que el peso del infarto pero teniendo en cuenta el peso y el área total de cada trozo. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje de AR (Suzuki y col., 2001).



Figura 3: Trozos de ventrículo izquierdo teñidos con TTC. A: CNI, B: CI

3.4.3. Determinaciones bioquímicas

3.4.3.1. Preparación del tejido

Al finalizar cada uno de los protocolos experimentales, los corazones se retiraron del sistema de perfusión de Langendorff. Una porción del VI fue homogeneizada en la proporción de 1 g de tejido en 5 ml de buffer, compuesto por KPO_4H_2 25 mM y ClK 140 mM a $\text{pH} = 7,4$, durante 1 min a una temperatura entre 0-2 °C con un homogenizador (Polytron). Una alícuota del homogenato fue centrifugada 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Otra alícuota fue usada para medir el contenido de glutatión reducido (GSH).

3.4.3.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la estimación de la peroxidación lipídica se utilizó la determinación de TBARS (Buege y Aust, 1978). El ensayo consistió en lo siguiente: a 0,5 ml del sobrenadante se le agregó 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,67 % y 0.5 ml de agua bidestilada. La preparación se agitó 10 seg y se incubó a 100 °C durante 15 min. Al término de este período se observó la formación de un aducto de color rosa. Las muestras fueron enfriadas y centrifugadas 10 minutos a 2500 rpm. En el sobrenadante obtenido se leyó la absorbancia a 535 nm contra un blanco con mezcla de reacción y sin muestra. Los resultados fueron expresados como nmoles por mg de proteína (nmoles/mg de prot), utilizando el coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.3.3. Glutatión reducido (GSH)

Para la determinación del contenido de GSH se midieron los grupos sulfidrilos no unidos a proteínas. El fundamento de la reacción consiste en que el 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) es reducido por los grupos sulfidrilos a 2-nitro-5 mercaptobenzoico, que es de color amarillo intenso. El ensayo consistió en lo siguiente: a una alícuota (820 μl) del homogenato se agregó 180 μl de TCA al 28 %. Las muestras se agitaron y luego se centrifugaron 10 minutos a 7.000 rpm. A 250 μl del sobrenadante se le agregaron 250 μl de TCA al 5 %, 1 ml de Tris HCl a una concentración de 0,4 M ($\text{pH} = 8,9$) y 25 μl del colorante DTNB preparado en metanol a una concentración final de 10 mM. Se midió la absorbancia a 414 nm dentro de los 5 minutos de agregado el DTNB contra un blanco con la mezcla de reacción sin muestra. Se realizó una curva de

calibración usando distintas concentraciones de GSH. Los resultados obtenidos se expresaron como μg por mg de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$) (Sedlak y Lindsay, 1958).

3.4.3.4. Western Blot

Otra porción del VI fue homogeneizada en frío en un buffer para el ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) compuesto por 300 mM sacarosa, 1 mM dithiothreitol (DTT), 4 mM etilenglicol tetraacético (EGTA), 20 mM TRIS pH 7,4, 1 % Triton X, 10 % cóctel de proteasa, 25 μM fluoruro de sodio (FNa), 1 μM ortovanadato. Luego, la muestra fue centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C para remover núcleos y restos celulares. 60 μg del sobrenadante fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para la corrida electroforética (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) durante 2 horas. El teñido con Ponceau S confirmó el uso de la misma cantidad de proteína en todas las muestras sembradas en el gel. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con 5 % de leche descremada en solución salina conteniendo TRIS (pH 7,5) y 0,1 % Tween 20 (TBS-T) e incubadas toda la noche a 4 °C con anticuerpos anti-fosfo Tirosina 180 p38MAPK (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-total p38MAPK (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), A β calcineurina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) y anti-fosfo Serina 82 HSP27 (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Luego las membranas fueron lavadas 4 veces por 10 minutos en una solución salina con buffer TRIS y Tween 20 (TBS-T) antes del agregado del anticuerpo secundario policlonal de conejo (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). Las bandas fueron analizadas por un sistema de quimioluminiscencia (ECL Plus; Amersham Biosciences). La señal de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) usando el anticuerpo específico (anti-GAPDH) fue usada como control.

3.5. Aislamiento de mitocondrias

Al término de la reperusión el VI fue utilizado para el aislamiento de las mitocondrias por centrifugación diferencial (Mela y Seitz, 1979). El VI fue inicialmente lavado en una solución fría de aislamiento (SA) compuesta por 75 mM sacarosa, 225 mM manitol y 0,01 mM EGTA neutralizada con el buffer TRIS a pH 7,4. Luego se lo trozó, se descartó la solución de lavado y se reemplazó por SA nueva (5 ml), transfiriendo esta suspensión a un homogeneizador de mano. Antes de comenzar el proceso de homogeneización se agregó 0,8 mg de una proteinasa (bacterial, tipo XXIV, Sigma,

llamada primeramente Nagarse). El proceso de homogeneización total no llevó más de 14 minutos realizado en 2 etapas de 7 minutos cada una (con el agregado de 5 ml de SA fresca cada vez). El homogenato fue cuidadosamente transferido después de cada etapa a un tubo de centrifuga de polycarbonato. Después de una centrifugación de 5 minutos a 480 x g para descartar núcleos y restos celulares el sobrenadante fue centrifugado a 7700 x g por 10 min para sedimentar a las mitocondrias. Este sedimento fue lavado 2 veces con SA y un último enjuague con SA sin EGTA centrifugando cada vez a 7700 x g por 5 minutos.

3.5.1. Determinaciones en mitocondrias aisladas

Todas las determinaciones en mitocondrias aisladas fueron realizadas en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Series 2 con control de temperatura y agitación continua. Para esto las mitocondrias fueron resuspendidas en una solución que contiene ClK 120 mM, (3-[N-Morfolino]-ácido propanesulfónico) (MOPS) 20 mM, TRIS-ClH 10 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5 mM ajustada a pH = 7,4. El volumen final de reacción fue de 2 ml (Baines y col, 2003).

3.5.1.1. Sensibilidad del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM) al Ca^{2+}

El PPTM se abre en presencia de Ca^{2+} . Debido a su masa, las proteínas no difunden a través del poro y ejercen una presión coloidosmótica que hace que las mitocondrias se hinchen. Este cambio es observado como una disminución de la dispersión de la luz (DL) que fue calculado para cada muestra como la diferencia entre la DL observada antes y después del agregado de Cl_2Ca (Figura 4). Aproximadamente 0,3 mg de la suspensión mitocondrial energizada con 5 mM de succinato, fueron incubados durante 5 minutos y luego tratados con 200 μM de Cl_2Ca . Todos los experimentos fueron realizados a 37 °C, con agitación continua y seguidos espectrofotométricamente a 520 nm como longitud de onda de excitación y emisión (Facundo y col., 2007).

3.5.1.2. Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC)

La capacidad de la mitocondria de retener el Ca^{2+} exógeno antes de que se produzca la apertura irreversible del PPTM fue monitoreada siguiendo los cambios de fluorescencia del

indicador sensible al Ca^{2+} Calcium Green 5N (Obame y col., 2008). La reacción comienza con el agregado de pulsos sucesivos de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Después de cada agregado la fluorescencia en el medio aumenta hasta que las mitocondrias toman el Ca^{2+} y la misma disminuye. Los diferentes pulsos de Ca^{2+} describen una serie de picos. Cuando las mitocondrias están suficientemente cargadas de Ca^{2+} ocurre la apertura del PPTM y la liberación del mencionado ion en el medio aumentando nuevamente la fluorescencia (figura 5).

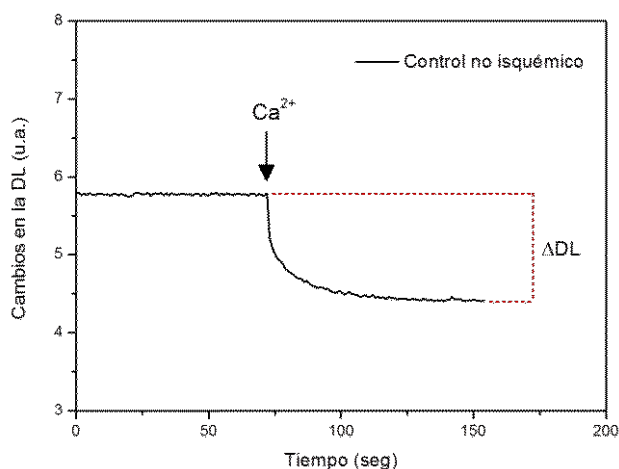


Figura 4: Trazado típico de los cambios en la dispersión de la luz de una suspensión mitocondrial por el agregado de Ca^{2+}

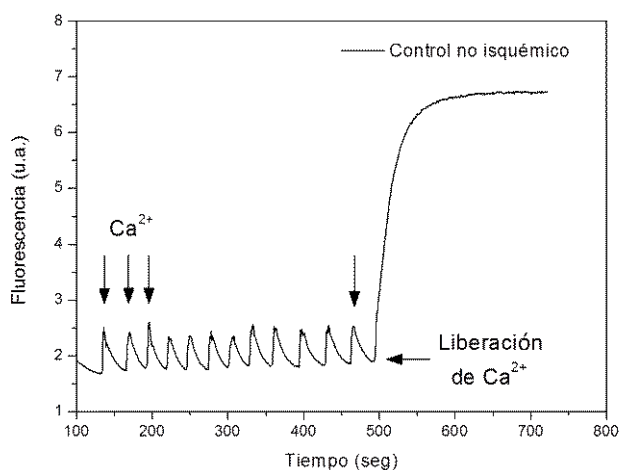


Figura 5: Trazado típico de los cambios de fluorescencia del indicador Calcium green 5N tras el agregado de sucesivos pulsos de Ca^{2+} .

Para esto, 0,3 mg de la suspensión mitocondrial energizada con 5 mM de succinato fueron resuspendidos en el buffer antes descrito incluyendo 1 μM de Calcium Green 5N. Para obtener la concentración de Ca^{2+} necesaria para inducir la apertura del PPTM finalmente se normalizó por mg de proteína de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{CRC: nmol Ca}^{2+} / \text{mg proteína}$$

Se utilizó 506 y 532 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron a 37 °C y con agitación continua.

3.5.1.3. Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{\text{mit}}$) fue determinado utilizando el indicador catiónico fluorescente Rodamina-123 (cloruro de 3,6-diamino-9-(2-(metoxi-carbonil) fenil) xantina) (R-123). La determinación comienza con la lectura de la fluorescencia de la R-123 en el medio de reacción (F1). Posteriormente se agregan las mitocondrias (0,1 mg) junto con el succinato (5 mM). Debido a que la R-123 posee carga positiva y la matriz mitocondrial negativa, se produce una concentración del indicador en este compartimento disminuyendo la fluorescencia en el medio. Por último se realiza una centrifugación a 15000 x g 1 minuto y se lee la fluorescencia del sobrenadante (F2) (Figura 6).

A partir de una curva de calibración y del valor de fluorescencia del medio, F1, se calcula la $[\text{R-123}]_{\text{total}}$ (nmol/l). Luego, la cantidad de nmoles de $\text{R-123}_{\text{totales}}$ en el volumen de reacción se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles R-123}_{\text{totales}} = \frac{\text{Vol. Cubeta (2 ml)} \times [\text{R-123}]_{\text{total}} \text{ (nmol/L)}}{1000 \text{ ml/l}}$$

A partir de la curva de calibración y del valor de fluorescencia del sobrenadante F2 se calcula la $[\text{R-123}]_{\text{medio}}$ (nmol/l). Luego, la cantidad de nmoles de $\text{R-123}_{\text{medio}}$ en el volumen de reacción se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles R-123}_{\text{medio}} = \frac{\text{Vol. Cubeta (2 ml)} \times [\text{R-123}]_{\text{medio}} \text{ (nmol/L)}}{1000 \text{ ml/l}}$$

En un paso posterior se calcula la cantidad de nmoles de R-123 internalizados en la mitocondria:

$$\text{nmoles R-123}_{\text{mito}} = \text{nmoles de R-123}_{\text{total}} - \text{nmoles de R-123}_{\text{medio}}$$

La concentración de $\text{R-123}_{\text{mito}}$ expresada en nmol/mg proteína se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{R-123}]_{\text{mito}} = \frac{1 \text{ mg} \times \text{nmoles R-123 (mito)} \times 1 \text{ ml}}{\text{Vol muestra} \times [\text{proteinas}] \text{ mg/ml}}$$

Dado que la distribución de R-123 depende del grado de partición de la misma en las membranas lipídicas, la concentración de R-123 libre en la matriz $[\text{R-123}]_{\text{matriz}}$ (nmol/ μl) se calcula corrigiendo por el coeficiente de permeabilidad de la R-213 en las membranas lipídicas (siendo $K_i = 26 \mu\text{l/mg}$ y $K_o = 120 \mu\text{l/mg}$ los coeficientes de la membrana interna y externa respectivamente:

$$[\text{R-123}]_{\text{mito}} = K_i [\text{R-123}]_{\text{matriz}} + K_o [\text{R-123}]_{\text{medio}}$$

$$K_i = 26 \mu\text{l/mg} \text{ y } K_o = 120 \mu\text{l/mg}$$

Finamente, el $\Delta\psi_m$ se calcula con la ecuación de Nernst-Guggenheim, expresando los valores en mV.

$$\Delta\psi_m = 59 \log \frac{[\text{R-123}]_{\text{matriz}}}{[\text{R-123}]_{\text{medio}}}$$

Estas determinaciones fueron realizadas a 30 °C y seguidas espectrofluorométricamente utilizando 503 y 527 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente (Baracca y col., 2003; Scaduto y Grottyohann, 1999).

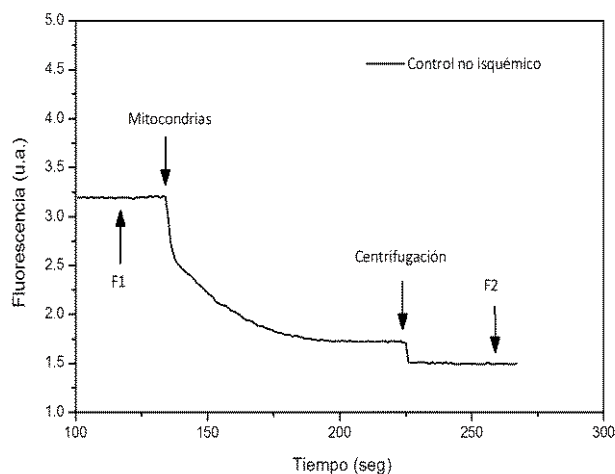


Figura 6: Trazo típico de una determinación de potencial de membrana mitocondrial con la técnica de R-123.

3.6. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue evaluada por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando la albúmina de suero bovino como estándar.

3.7. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ error estándar. Para la comparación de más de dos grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. En todos los casos el valor de 0,05 se consideró como el límite de significación estadística.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL BUCLE EXTRACELULAR 3 DE LA ISOFORMA 1 DEL CO-TRANSPORTADOR SODIO BICARBONATO ELECTROGÉNICO (NBCe1)

1. Tamaño de infarto

En la Figura 1 se muestran los valores promedios del tamaño del infarto medido al final del período de reperfusión y trozos representativos, de corazones pertenecientes a los grupos control no isquémico (CNI), control isquémico (CI), tratado con suero (S) o tratado con el anticuerpo contra el bucle extracelular 3 del NBCe1 (a-L3). Los valores fueron $2 \pm 0,4 \%$ ($n = 8$) en el grupo CNI, $32 \pm 2 \%$ ($n = 8$) en el grupo CI, $31 \pm 2 \%$ ($n = 6$) en el grupo S y $11 \pm 2 \%$ ($n = 8$) en el grupo a-L3.

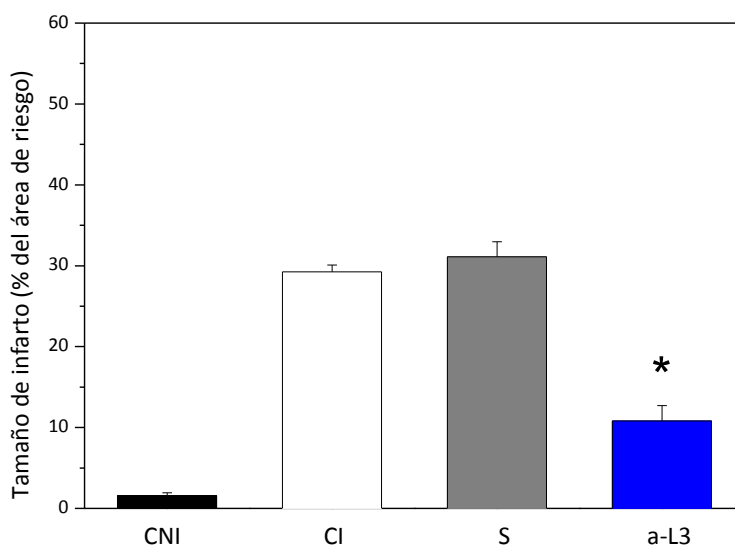


Figura 1: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos control no isquémico (CNI), control isquémico (CI) y en los grupos tratados con suero (S) o con el anticuerpo contra el bucle extracelular 3 del NBCe1 (a-L3). * $p < 0,05$ con respecto a S.

2. Función miocárdica

-Función Sistólica

Para evaluar la función sistólica se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y la máxima velocidad de desarrollo de la presión ventricular ($+dP/dt_{max}$). En el grupo CNI, al final de los 110 minutos de perfusión, la PDVI (expresada como porcentaje del valor obtenido durante la

estabilización) fue de 80 ± 2 %. En el grupo CI, S y a-L3 la PDVI disminuyó durante la isquemia hasta valores cercanos a 0 y en la reperfusion se fue recuperando llegando al final de la misma a valores de 18 ± 3 %, 20 ± 3 % y 62 ± 4 % respectivamente. En todos los puntos analizados de la reperfusion, los valores de PDVI del grupo a-L3 fueron significativamente mayores que los observados en el grupo CI (Figura 2).

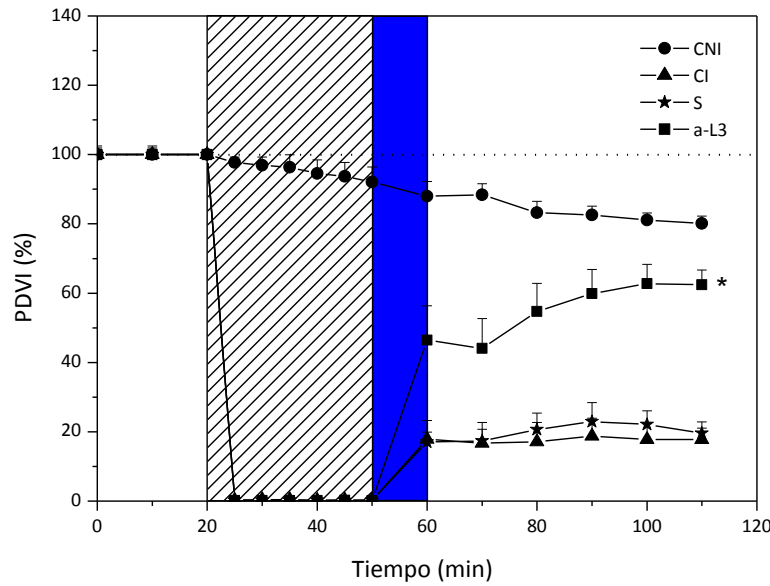


Figura 2: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, S y a-L3. * $p < 0,05$ con respecto a S.

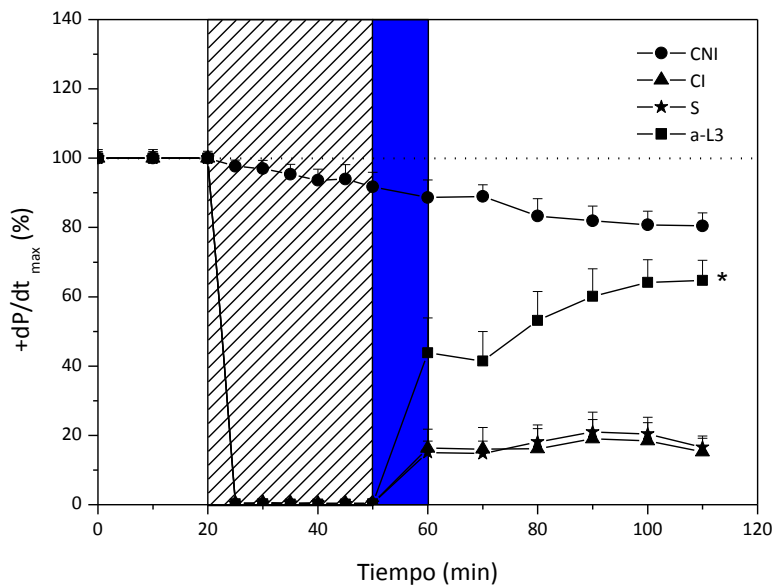


Figura 3: Máxima velocidad de desarrollo de la presión ventricular izquierda ($+dP/dt_{max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, S y a-L3. * $p < 0,05$ con respecto a S.

La $+dP/dt_{\max}$ se comportó de manera similar que la PDVI y alcanzó valores de $15 \pm 4 \%$, $17 \pm 3 \%$ y $65 \pm 6 \%$ en los grupos CI, S y a-L3, respectivamente (Figura 3). Los valores de $+dP/dt_{\max}$ en el grupo a-L3 fueron significativamente mayores que los obtenidos en el grupo CI.

-Función Diastólica

En la Figura 4 se muestran los cambios de la presión diastólica final (PDF), expresados en mmHg, en función del tiempo en los grupos CNI, CI, S y a-L3. La PDF al final de la reperfusión llegó a valores 52 ± 7 mmHg en el grupo CI y 56 ± 10 mmHg en el grupo tratado con S. El tratamiento con a-L3 disminuyó significativamente la PDF durante toda la reperfusión, alcanzando a los 60 minutos el valor de 22 ± 3 mmHg.

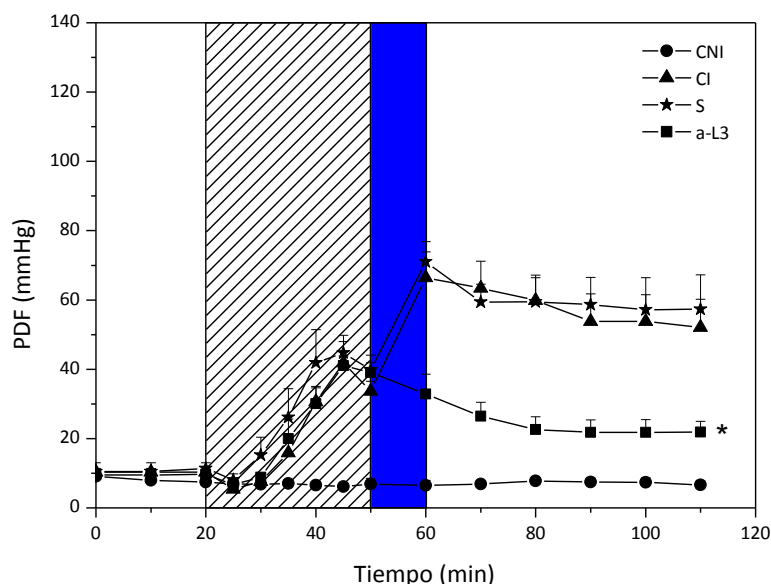


Figura 4: Presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI, S y a-L3. * $p < 0,05$ con respecto a S.

Los cambios en la máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{\max}$) se muestran en la Figura 5. Los valores promedio al final del periodo de reperfusión fueron $14 \pm 4 \%$, $17 \pm 3 \%$ y $59 \pm 6 \%$ para los grupos CI, S y a-L3 respectivamente. Es decir, que el tratamiento con a-L3 aumentó significativamente la recuperación de la función diastólica, mostrando la $-dP/dt_{\max}$ valores mayores que los observados en el grupo CI.

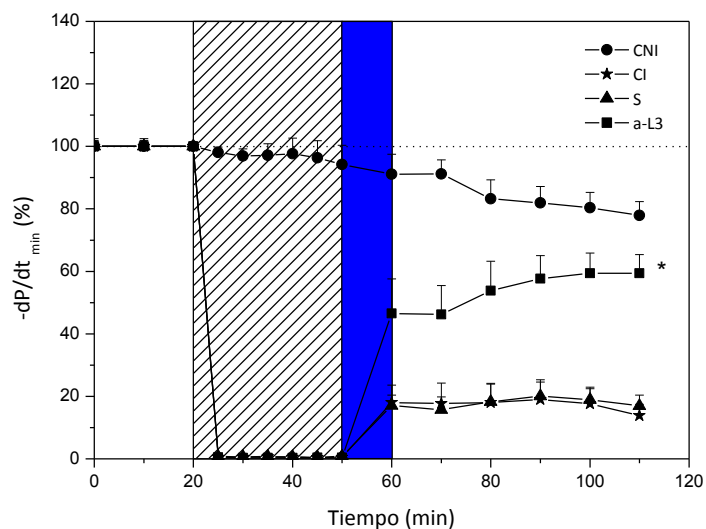


Figura 5: Máxima velocidad de descenso de la presión ventricular izquierda ($-dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, S y a-L3. * $p < 0,05$ con respecto a S.

3. Estado mitocondrial

El estado mitocondrial fue evaluado a través de las determinaciones del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), la capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) y la sensibilidad al agregado de Ca^{2+} medido a través de los cambios en la dispersión de la luz (ΔDL).

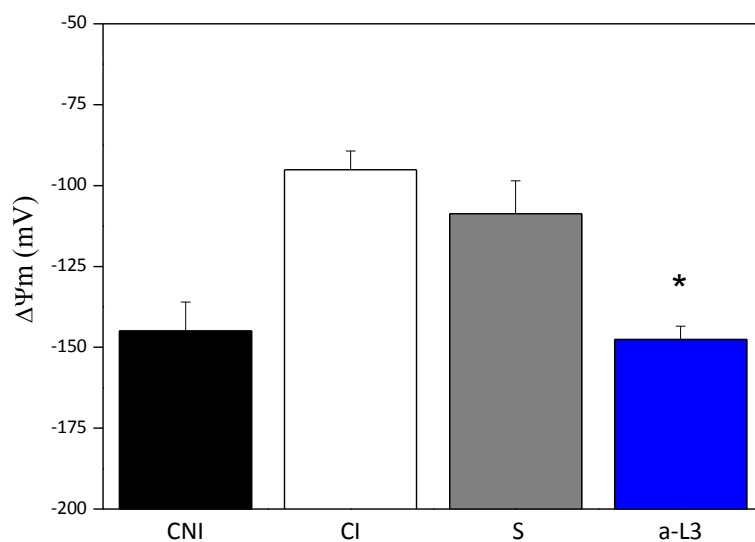


Figura 6: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI ($n = 8$), CI ($n = 8$) S ($n = 6$) y a-L3 ($n = 8$). * $p < 0,05$ con respecto a S.

En la Figura 6 se muestran los datos promedio del $\Delta\psi_m$. El valor obtenido para el grupo CNI fue de -145 ± 9 mV. En los grupos CI y S disminuyó significativamente alcanzando valores de -95 ± 6 y -109

± 10 mV, respectivamente. En el grupo a-L3 se registraron valores de potencial similar a los del grupo CNI siendo el promedio de -148 ± 4 mV.

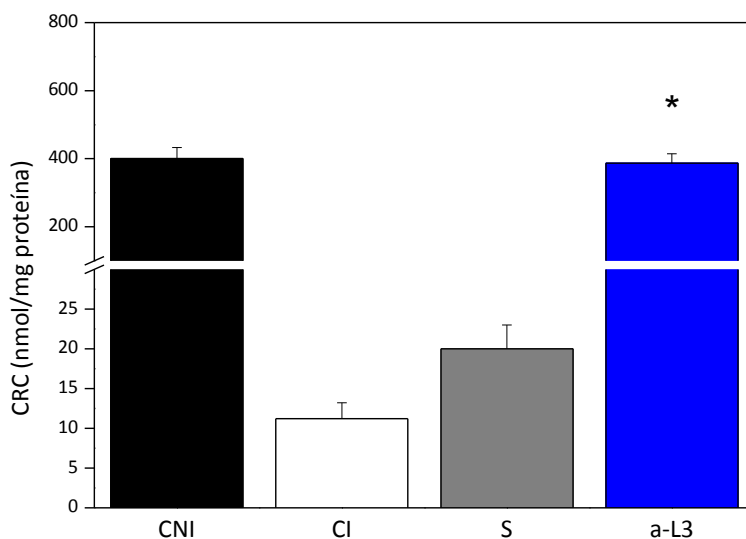


Figura 7: Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), expresado en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 8), CI (n = 8) S (n = 6) y a-L3 (n = 8). * $p < 0,05$ con respecto a S.

La CRC (Figura 7) fue de 400 ± 33 nmoles/mg proteína en el grupo CNI. En los grupos CI y S disminuyó significativamente alcanzando valores de 11 ± 2 y 20 ± 3 nmoles/mg proteína, respectivamente. El tratamiento con a-L3 recuperó la CRC y el valor promedio fue similar al obtenido en el grupo CNI (387 ± 28 nmoles/mg proteína).

Los valores de ΔDL fueron $1,43 \pm 0,10$ u.a. en el grupo CNI. En los grupos CI y S disminuyó significativamente ($0,27 \pm 0,08$ y $0,56 \pm 0,20$ u.a., respectivamente) y en el grupo a-L3 fue de $1,27 \pm 0,14$ u.a., valor no diferente estadísticamente del obtenido en el grupo CNI (Figura 8).

4. Expresión de P-p38MAPK

La expresión de la forma fosforilada en tirosina 180-182 de la p38MAPK (P-p38 MAPK) con respecto a la p38MAPK total disminuyó significativamente en el grupo CI y S, obteniéndose los valores de 41 ± 3 % y 39 ± 4 % respectivamente, mientras que el tratamiento con a-L3 aumentó su contenido hasta 145 ± 6 % (Figura 9).

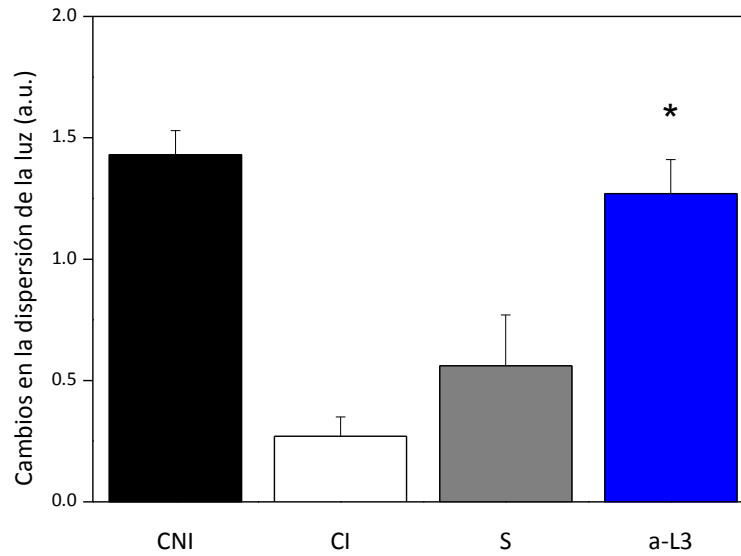


Figura 8: Cambios en la dispersión de la luz (ΔDL) de una suspensión mitocondrial, expresados en unidades arbitrarias (u.a.) por el agregado de 200 μM de Ca^{2+} , en los grupos CNI (n = 8), CI (n = 8) S (n = 6) y a-L3 (n = 8). * p < 0,05 con respecto a S.

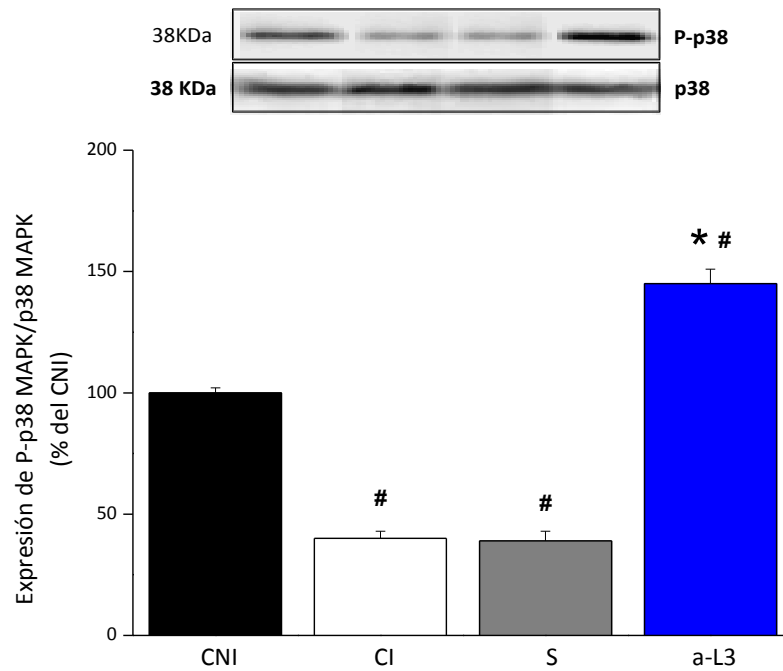


Figura 9: Expresión de P-p38MAPK/p38 MAPK, expresada como porcentaje del valor obtenido en el grupo CNI (n = 7), en los grupos CNI, CI (n = 8), S (n = 6) y a-L3 (n = 8). # p < 0,05 con respecto a CNI. * p < 0,05 con respecto a S.

Los resultados hasta aquí presentados demuestran que el tratamiento con un anticuerpo contra el bucle extracelular 3 de la isoforma 1 del co-transportador sodio bicarbonato electrogénico (NBCe1) durante los primeros 10 minutos de la reperfusión produjo:

- Disminución del tamaño del infarto
- Aumento de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas
- Reducción de la despolarización mitocondrial
- Aumento de la capacidad de retención de Ca^{2+}
- Recuperación de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}
- Aumento de la fosforilación de p38MAPK

Efectos de la inhibición de la p38MAPK con SB202190

1. Tamaño del infarto

En la Figura 10 se muestran los valores promedio del tamaño del infarto medido al final del período de reperfusión en corazones pertenecientes a los grupos CNI+SB202190, CI+SB202190, S+SB202190 y a-L3+SB202190, siendo los valores de $2 \pm 0,3 \%$, $28 \pm 3 \%$, $26 \pm 1 \%$ y $29 \pm 3 \%$, respectivamente

2. Función miocárdica

-Función Sistólica

Al final de los 110 minutos de perfusión, la PDVI, expresada como porcentaje del valor obtenido durante la estabilización, fue de $77 \pm 2 \%$ en el grupo CNI+SB202190. Durante la isquemia la PDVI de todos los grupos disminuyó hasta valores cercanos a 0. Al final de la reperfusión, los valores de PDVI en los grupos CI, S y a-L3, fueron $24 \pm 3 \%$, $18 \pm 5 \%$ y $20 \pm 5 \%$, respectivamente (Figura 11).

Los cambios de la $+dP/dt_{\max}$ fueron similares a los observados en la PDVI. Al final de la reperusión la $+dP/dt_{\max}$ en el grupo CNI + SB202190 fue de $77 \pm 4 \%$ y alcanzó valores de $23 \pm 6 \%$, $19 \pm 5 \%$ y $15 \pm 7 \%$ en los grupos CI, S y a-L3 en presencia de SB202190, respectivamente (Figura 12).

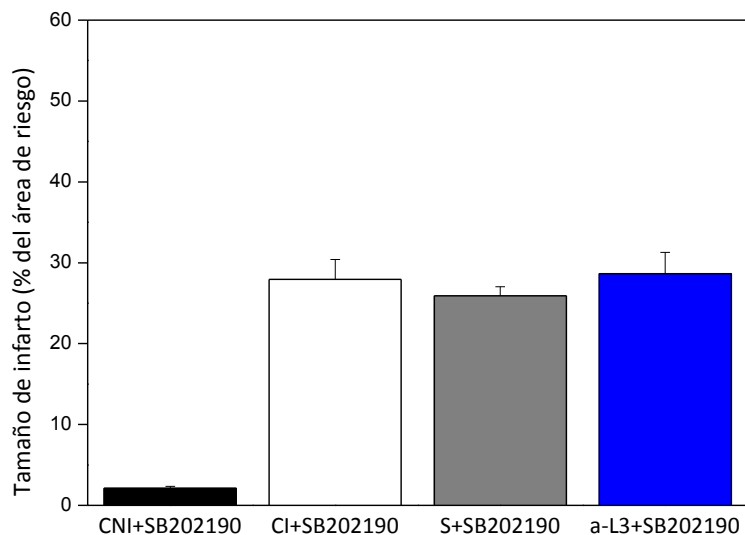


Figura 10: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI + SB202190 (n = 5), CI + SB202190 (n = 7), S + SB202190 (n = 6) y a-L3 + SB202190 (n = 7).

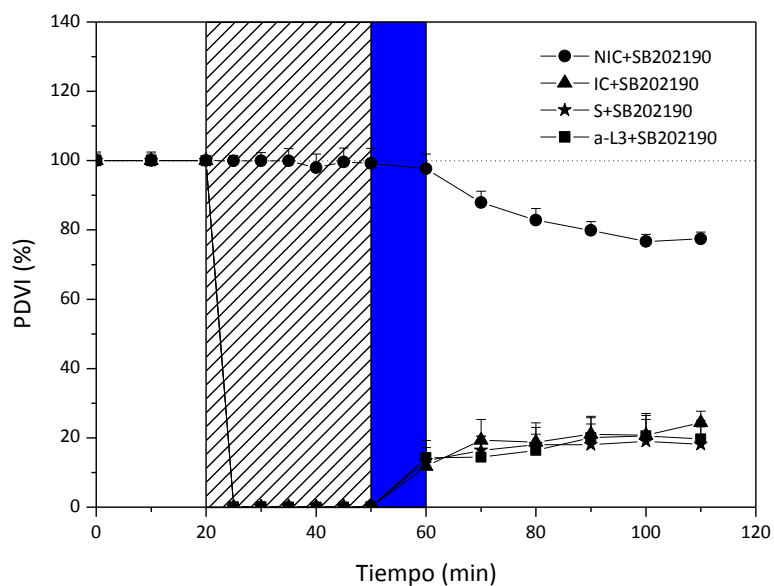


Figura 11 : Presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, S y a-L3 en presencia de SB202190.

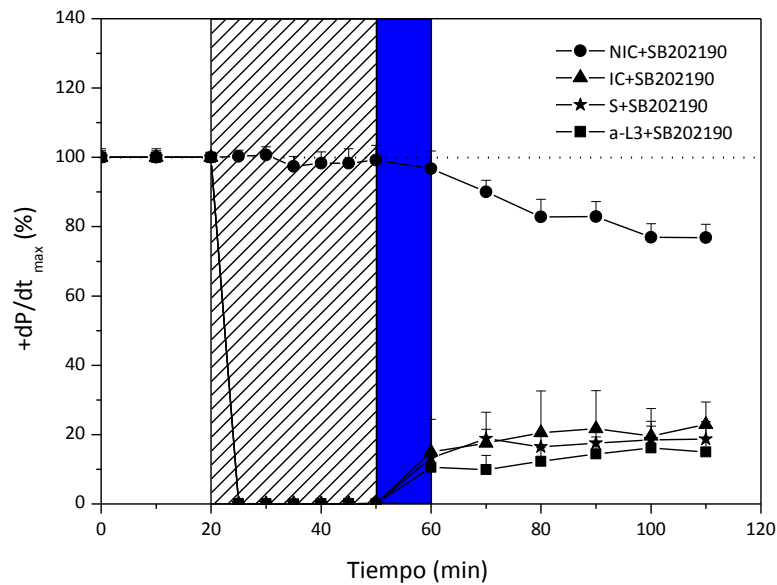


Figura 12: Máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, S y a-L3 en presencia de SB202190.

-Función Diastólica

Durante la isquemia-reperfusión la presión diastólica final en los grupos CI, S y a-L3 aumentó, alcanzando al final de la perfusión valores de 59 ± 8 , 70 ± 10 y 74 ± 7 mmHg, respectivamente. En todos los puntos analizados no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CI y a-L3 más SB202190 (Figura 13).

Los cambios en el $-dP/dt_{\max}$ de los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190, S + SB202190 y a-L3 + SB202190 se muestran en la Figura 14.

Los valores promedio al final del periodo de perfusión fueron 77 ± 4 %, 23 ± 6 %, 19 ± 5 % y 15 ± 7 %, respectivamente. Al igual que para los parámetros anteriormente analizados, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CI + SB202190 y a-L3 + SB202190.

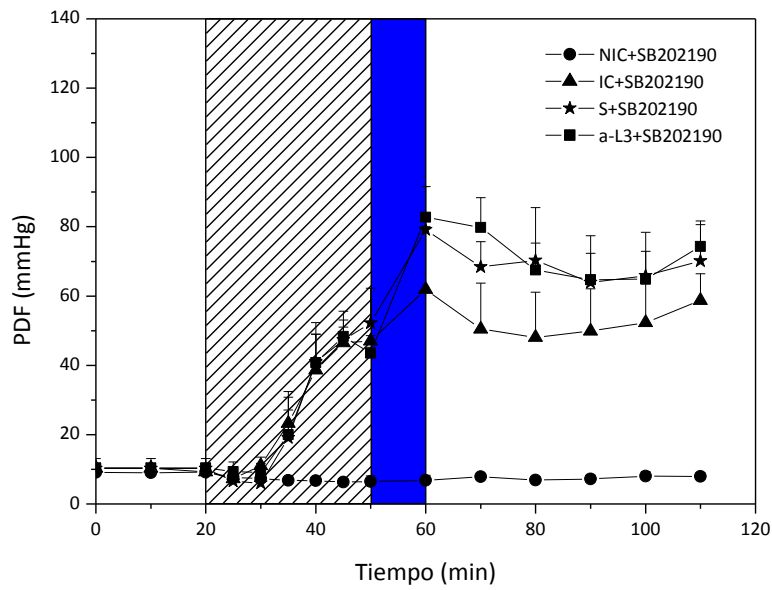


Figura 13: Cambios de la presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI, S y a-L3 en presencia de SB202190.

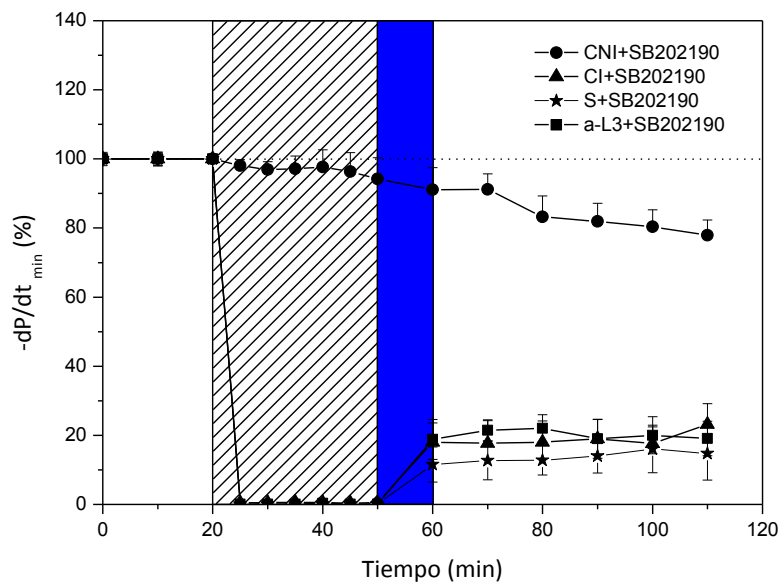


Figura 14: Máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, S y a-L3 en presencia de SB202190.

3. Estado mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) para el grupo CNI + SB202190 fue -143 ± 11 mV. Una marcada disminución se encontró para los grupos CI + SB202190 y S + SB202190, siendo los valores -92 ± 7 y -110 ± 8 mV, respectivamente. En el grupo a-L3 + SB202190 se registró un valor promedio de -115 ± 5 mV (Figura 15).

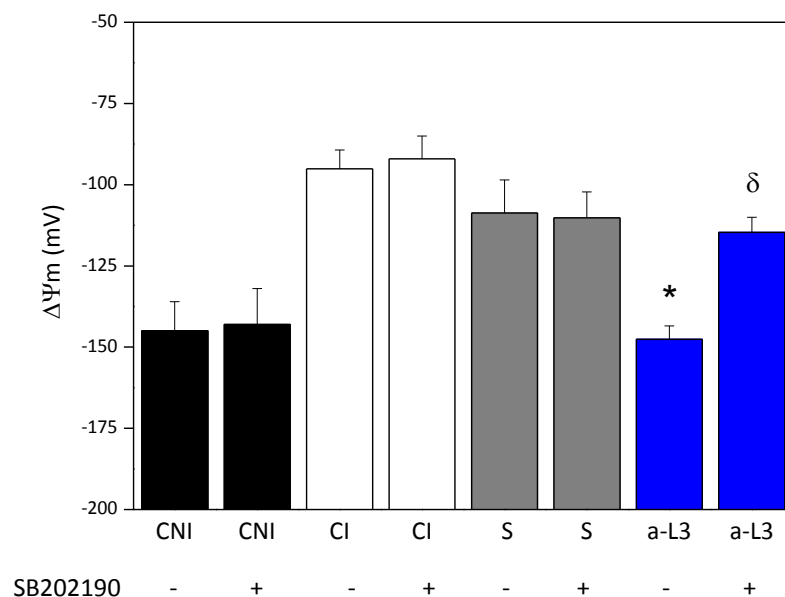


Figura 15: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 7) S (n = 6) y a-L3 (n = 7) en presencia y en ausencia de SB202190. * p < 0,05 vs. S; δ p < 0,05 vs. a-L3

Los valores de CRC para los grupos CNI, CI, S y a-L3 en presencia de SB202190 fueron de 465 ± 5 , 10 ± 3 , 18 ± 2 y 22 ± 4 nmol Ca^{2+} /mg proteína, respectivamente. Sólo se observó una disminución significativa de CRC entre los grupos a-L3 y a-L3 + SB202190 (Figura 16).

Los cambios de la dispersión de la luz (ΔDL) producidos por el agregado de $200 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} para los grupos CNI, CI, S y a-L3 en presencia de SB202190 se muestran en la Figura 17. Los valores obtenidos fueron $1,40 \pm 0,20$; $0,25 \pm 0,09$; $0,50 \pm 0,09$ y $0,33 \pm 0,04$ u.a. Sólo el grupo a-L3 + SB202190 mostró una disminución significativa con respecto a lo observado en el grupo a-L3 (Figura 17).

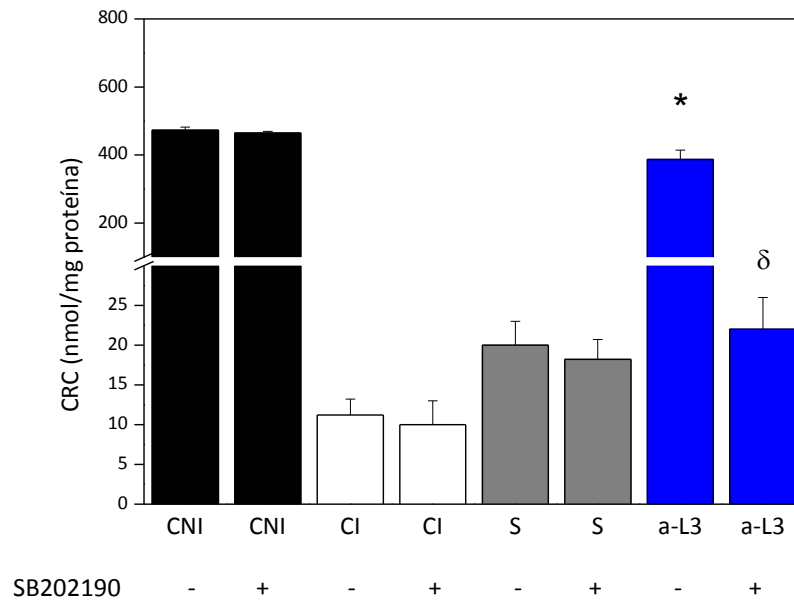


Figura 16: Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), expresado en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 7) S (n = 6) y a-L3 (n = 7), en presencia y en ausencia de SB202190. * p < 0,05 vs. S; δ p < 0,05 vs. a-L3

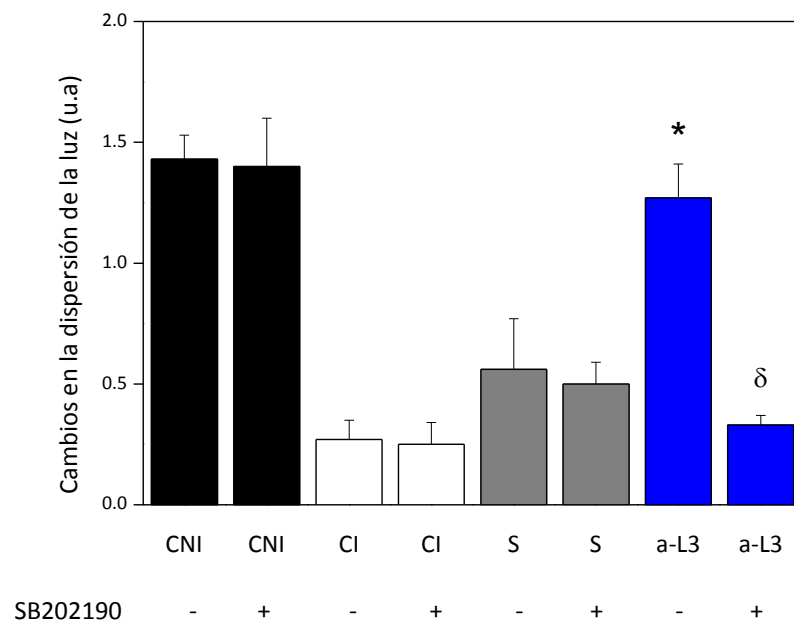


Figura 17: Cambios en la dispersión de la luz, expresados en unidades arbitrarias (a.u.), en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 7) S (n = 6) y a-L3 (n = 7), en presencia y en ausencia de SB202190. * p < 0,05 vs. S; δ p < 0,05 vs. a-L3

4. Expresión de P-p38 MAPK

La inhibición de la p38MAPK con SB202190 sólo afectó al grupo a-L3, observándose una disminución de la expresión de dicha proteína que alcanzó niveles comparables a los obtenidos en los grupos CI y S.

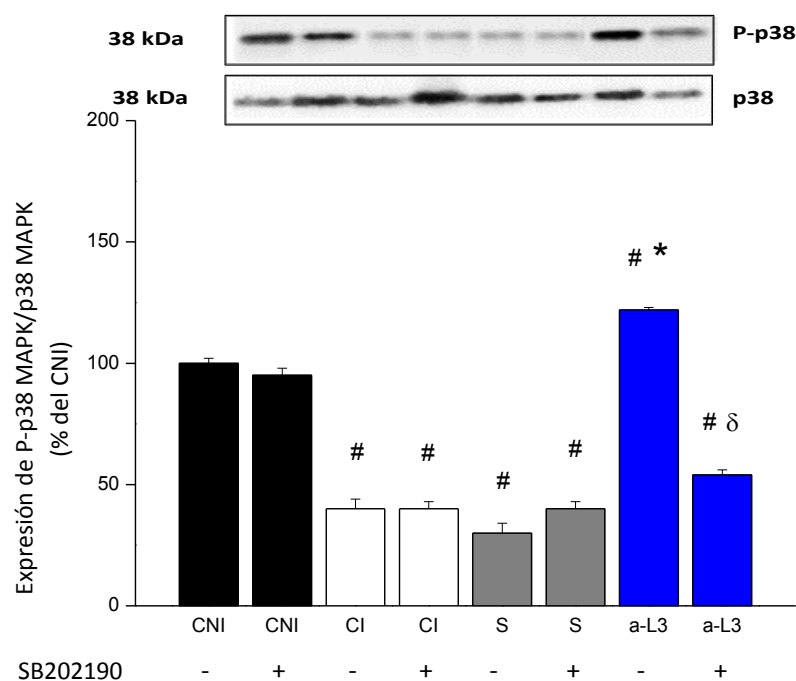


Figura 18: Expresión de fosfo-p38MAPK con respecto a la p38MAPK total (P-p38MAPK/p38 MAPK), expresada como porcentaje del valor obtenido en el grupo CNI, en los grupos CNI (n=6), CI (n = 7), S (n = 6) y a-L3 (n = 7) en presencia y ausencia de SB2021910. # p < 0,05 con respecto a CNI. * p < 0,05 con respecto a S; δ p < 0,05 con respecto a a-L3.

Por lo tanto, la inhibición de p38MAPK en el grupo tratado con a-L3 produjo:

- **Aumento del tamaño del infarto**
- **Disminución de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas**
- **Despolarización mitocondrial**
- **Disminución de la capacidad de retención de Ca^{2+}**
- **Reducción de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}**

Estos resultados indican que los efectos miocárdicos y mitocondriales beneficiosos producidos por el bloqueo del bucle extracelular 3 de la isoforma 1 del co-transportador sodio bicarbonato electrogénico (NBCe1) durante los primeros 10 minutos de la reperfusión son dependientes de la fosforilación/activación de p38MAPK.

4.2 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA CON BENZOLAMIDA (BZ)

1. Tamaño de infarto

El tratamiento con benzolamida (BZ) 5 μ M durante los primeros 10 minutos de la reperfusión redujo significativamente el tamaño del infarto comparado con el obtenido en el grupo CI. En la Figura 19, se muestran los datos promedio de este parámetro al final de la reperfusión y trozos representativos en los grupos CNI, CI y BZ, siendo los valores $2 \pm 0,5$ %, 32 ± 2 % y 6 ± 1 %, respectivamente.

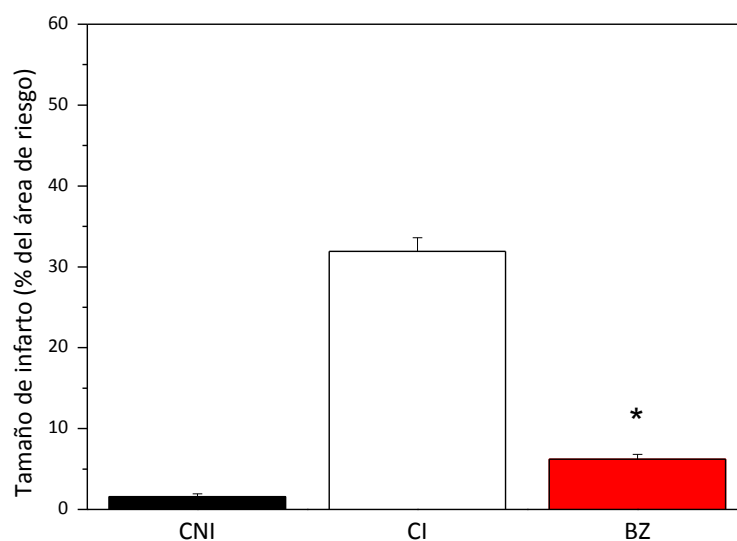


Figura 19: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI (n = 5), CI (n = 7) y tratados con benzolamida (BZ, n = 8). * p < 0,05 con respecto a CI.

2. Función miocárdica

-Función Sistólica

La administración de BZ durante los primeros minutos de la reperfusión mejoró significativamente la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) comparada con el CI en todos los puntos analizados en la reperfusión. A los 60 minutos de reperfusión los valores fueron $8 \pm 3 \%$ y $71 \pm 4 \%$ para los grupos CI y BZ, respectivamente (Figura 20).

Al igual que la PDVI, los valores de la $+dP/dt_{\max}$ en el grupo tratado con BZ fueron significativamente mayores que los observados en el grupo CI. Al final de la reperfusión los valores fueron de $15 \pm 4 \%$ para el grupo CI y $76 \pm 4 \%$ para el grupo BZ (Figura 21).

-Función diastólica

El tratamiento con BZ disminuyó el aumento de la presión diastólica final (PDF) durante la reperfusión observado en el grupo CI. Los valores al final de este período fueron 52 ± 7 mmHg para el grupo CI y 23 ± 3 mmHg para el grupo tratado con BZ (Figura 22).

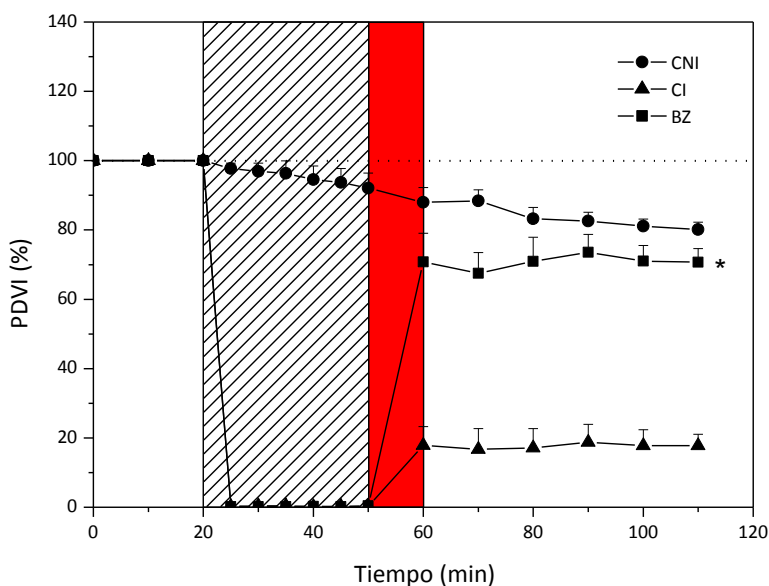


Figura 20: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje del valor observado en la estabilización, en los grupos CNI, CI y BZ. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

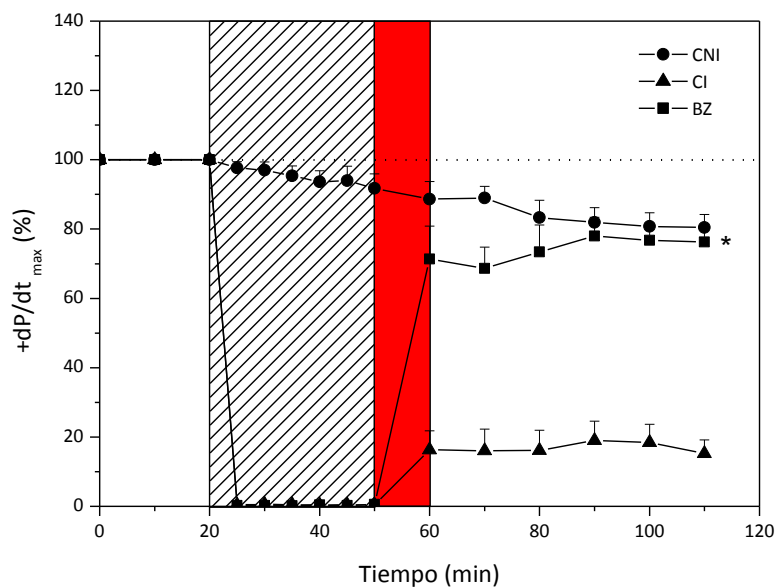


Figura 21: Máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y BZ. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

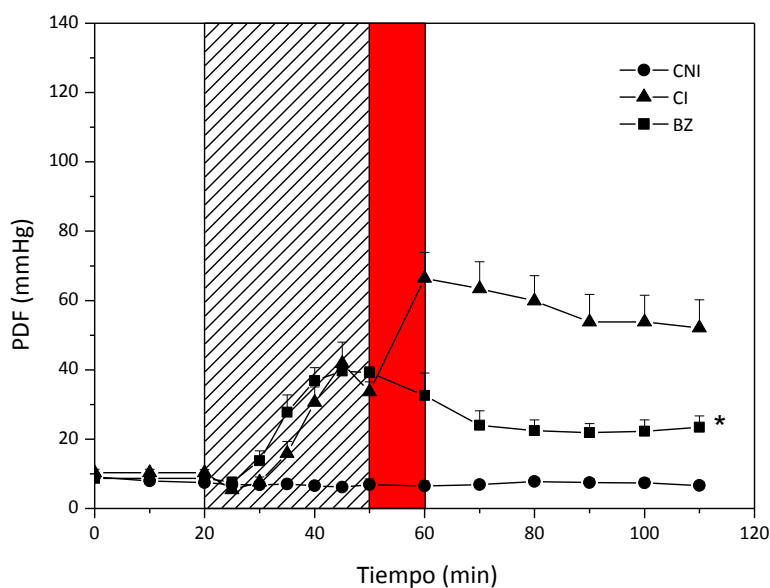


Figura 22: Cambios de la presión diastólica final (PDF) durante la isquemia y reperfusión, expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI y BZ. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

El tratamiento con BZ también aumentó la recuperación de la máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{\max}$) observada en el grupo CI. Al final de la reperfusión los valores fueron $14 \pm 4 \%$ y $59 \pm 6 \%$ para los grupos CI y BZ, respectivamente (Figura 23).

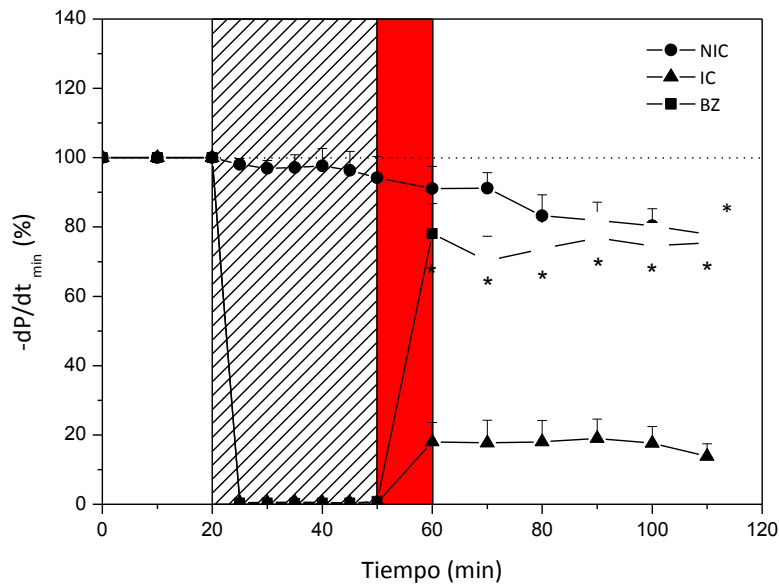


Figura 23: Valores de la máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{\max}$), expresados como porcentaje de la estabilización, en los grupos CNI, CI y BZ. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

3. Estado mitocondrial

En la Figura 24 se graficó el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). El tratamiento con BZ evitó la despolarización mitocondrial observada en el grupo CI. Los valores fueron -95 ± 6 mV para el grupo CI y -150 ± 4 mV para el grupo BZ.

En la Figura 25 se muestran los datos de CRC. Los valores promedio fueron 400 ± 33 , 11 ± 2 y 450 ± 20 nmol/mg proteína para los grupos CNI, CI y BZ, respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre estos dos últimos grupos.

Los valores promedio de ΔDL se graficaron en la Figura 26. El tratamiento con BZ restauró la sensibilidad al Ca^{2+} de las mitocondrias mostrando un ΔDL de $1,45 \pm 0,07$ u.a., valor significativamente diferente del observado en el grupo CI ($0,27 \pm 0,08$ u.a.).

4. Expresión de P-p38 MAPK

La expresión de la forma fosforilada de la p38MAPK (P-p38MAPK) en homogenato total disminuyó en el grupo CI (41 ± 3 %), mientras que el tratamiento con BZ aumentó significativamente su contenido hasta 133 ± 3 % (Figura 27).

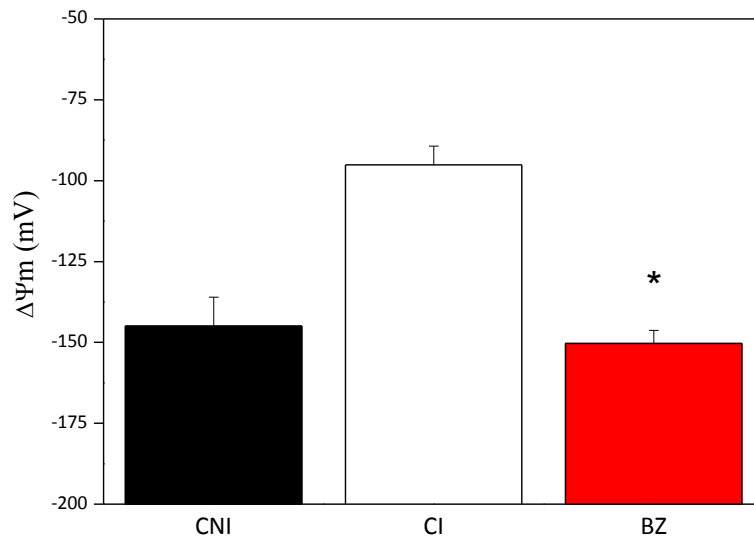


Figura 24: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y BZ (n = 8). * p < 0,05 con respecto a CI.

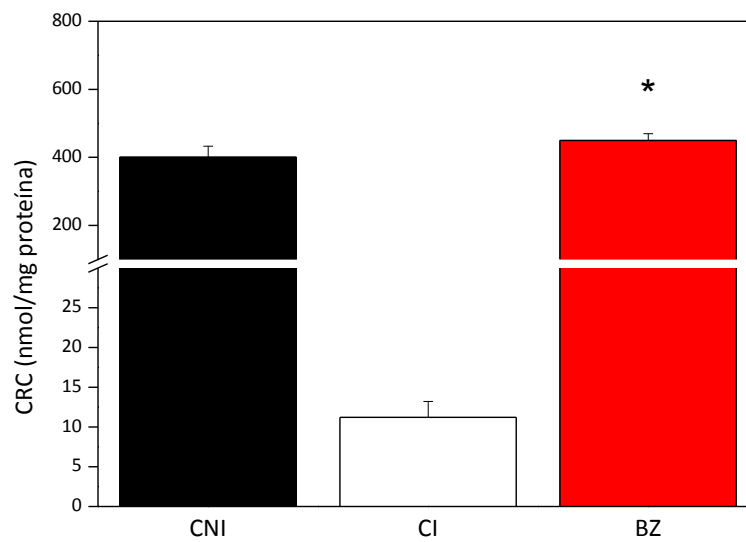


Figura 25: Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), expresada en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y BZ (n = 8). * p < 0,05 con respecto a CI.

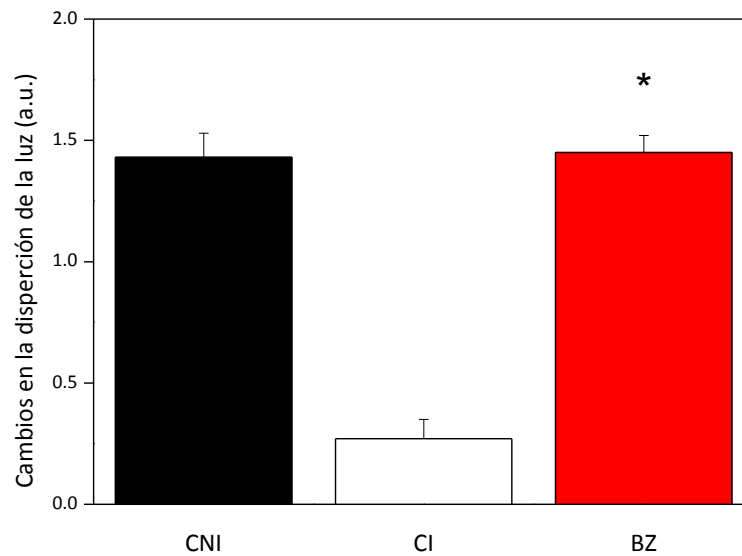


Figura 26: Cambios en la dispersión de la luz producidos por el agregado de 200 μM de Ca^{2+} , expresados en unidades arbitrarias (u.a.) en suspensiones mitocondriales de los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y BZ (n = 8). * p < 0,05 con respecto a CI.

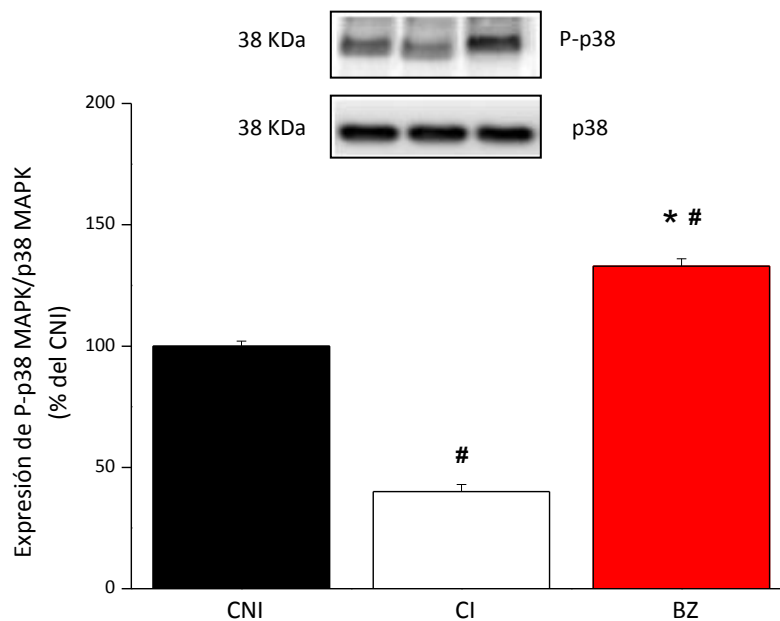


Figura 27: Expresión de P-p38MAPK/p38MAPK, expresada como porcentaje del valor obtenido en el grupo CNI, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y BZ (n = 8). # p < 0,05 con respecto a CNI. * p < 0,05 con respecto a CI.

Estos resultados muestran que la inhibición de la anhidrasa carbónica con benzolamida (BZ) produjo:

- Disminución del tamaño del infarto
- Aumento de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas
- Restauración del potencial mitocondrial
- Aumento de la capacidad de retención de Ca^{2+}
- Recuperación de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}
- Aumento de la fosforilación de p38MAPK

Efectos de la inhibición de la p38MAPK con SB202190

1. Tamaño de infarto

En la Figura 28 se muestran los valores promedio de los tamaños de infarto, medidos al final del período de reperfusión, de corazones pertenecientes a los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y BZ + SB202190.

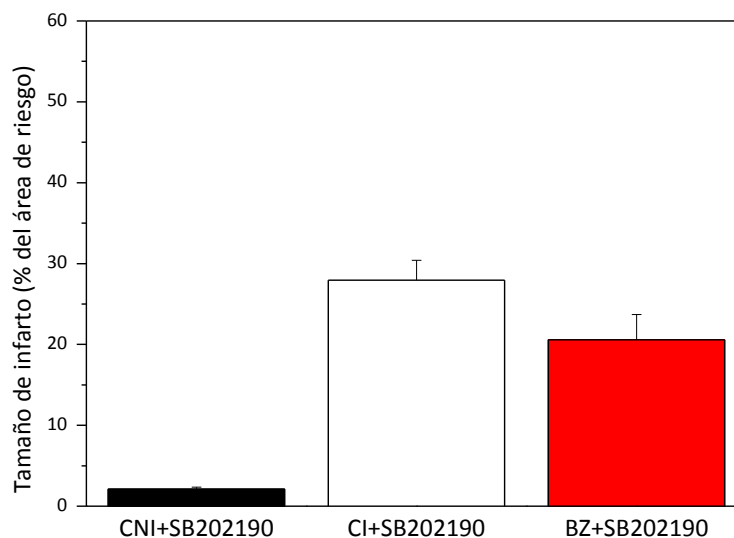


Figura 28: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI+SB (n = 6), CI + SB202190 (n = 7) y BZ + SB202190 (n = 7).

Los valores fueron de $2,1 \pm 0,3 \%$, $28 \pm 2 \%$ y $21 \pm 3 \%$, respectivamente. Por lo tanto, la disminución del infarto observada con BZ fue abolida en presencia de SB202190, observándose valores de infarto similares a los obtenidos en el grupo CI.

2. Función miocárdica

-Función Sistólica

El tratamiento con SB202190 no modificó la presión desarrollada del VI (PDVI) en los grupos CNI y CI, pero disminuyó significativamente el aumento de dicho parámetro observado en el grupo BZ, alcanzando el valor de $24 \pm 6 \%$ al final de la reperfusión (Figura 29).

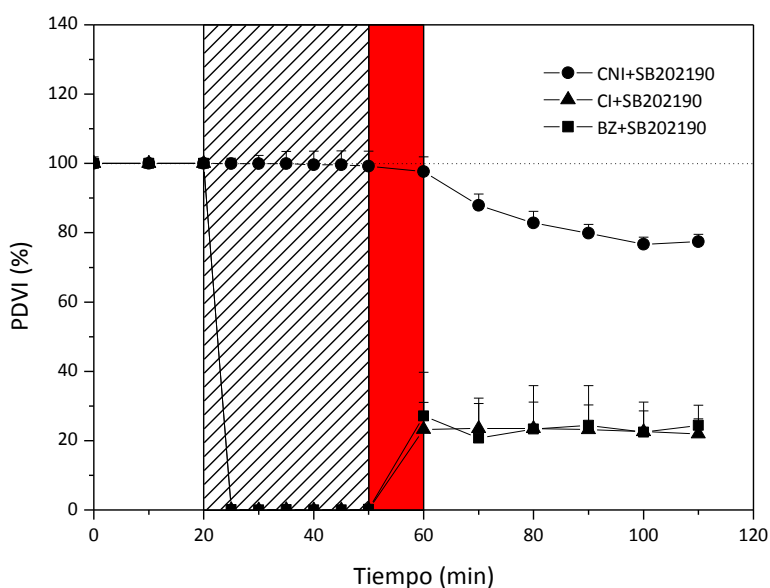


Figura 29: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje de la estabilización, en los grupos CNI, CI y BZ en presencia de SB202190.

Los cambios de la máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{max}$) fueron similares a los de la presión desarrollada. Por lo tanto, la inhibición de p38MAPK con SB202190 no modificó este parámetro en los grupos CNI y CI pero anuló la mejora

observada en corazones tratados con BZ. Al término de la reperfusión el valor de $+dP/dt_{\max}$ en el grupo BZ + SB202190 fue de $15 \pm 7 \%$, valor similar al tenido en el grupo CI + SB202190 (Figura 30).

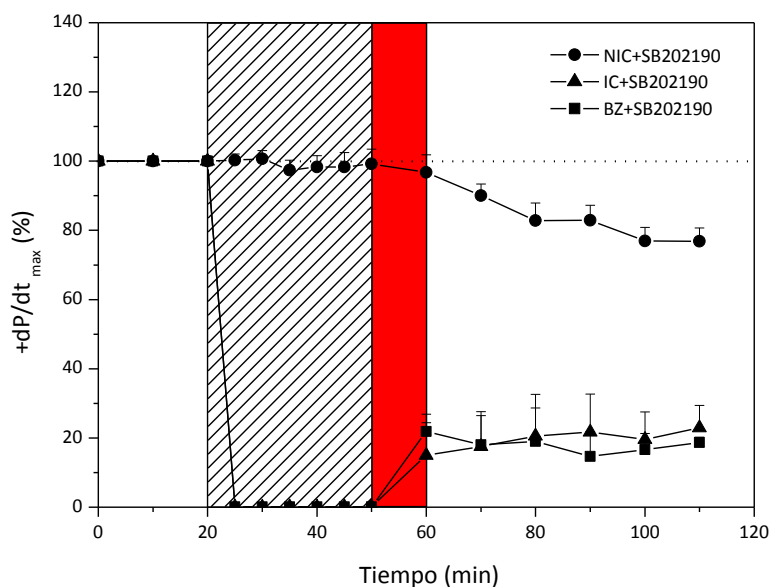


Figura 30: Máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y BZ en presencia de SB202190.

-Función Diastólica

La inhibición de p38MAPK con SB202190 no modificó los valores de la presión diastólica final (PDF) de los grupos CNI y CI, pero disminuyó significativamente el aumento de dicho parámetro observado en el grupo BZ. En este grupo, la PDF al final de la reperfusión llegó al valor promedio de 77 ± 8 mmHg (Figura 31).

Los cambios en el $-dP/dt_{\max}$ de los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y BZ + SB202190 se muestran en la Figura 32. El tratamiento con SB202190 no modificó los valores de este parámetro en los grupos CNI y CI, pero atenuó el aumento observado en el grupo BZ, adquiriendo el valor de $22 \pm 4 \%$ al final de la reperfusión. Este valor no fue estadísticamente diferente del obtenido en el grupo CI.

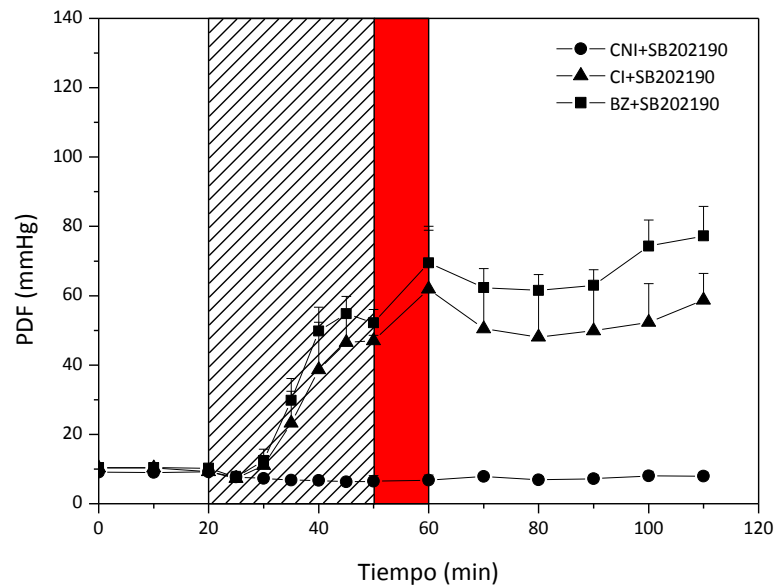


Figura 31: Presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI y BZ en presencia de SB202190.

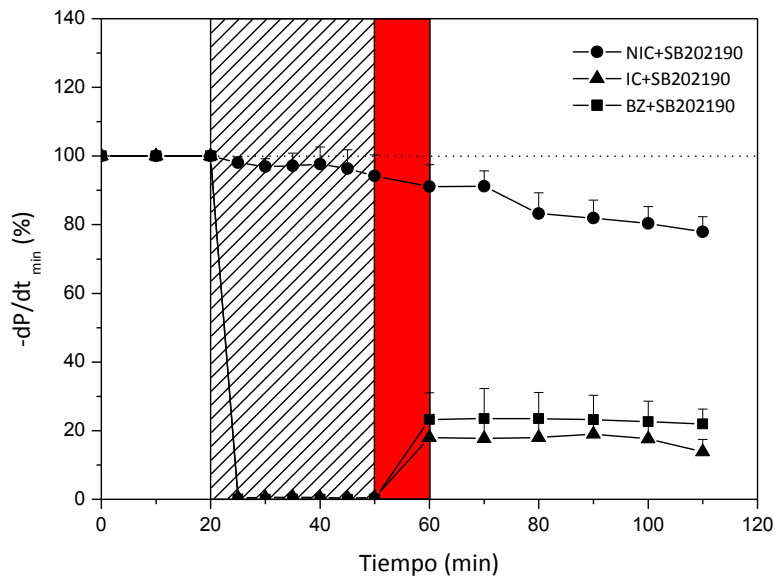


Figura 32: Máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{max}$), en los grupos CNI, CI y BZ, en presencia de SB202190.

3. Estado mitocondrial

En la Figura 33 se graficaron los valores del $\Delta\Psi_m$ de los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y BZ + SB202190. La administración de SB202190 no modificó el $\Delta\Psi_m$ observado en los grupos CNI y CI, pero anuló el efecto producido por BZ, hallándose un valor cercano al obtenido en los corazones isquémicos no tratados (100 ± 3 mV).

Los valores de CRC para los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y BZ + SB202190 se muestran en la Figura 34. El valor obtenido para BZ + SB202190 fue 7 ± 1 nmol Ca^{2+} /mg proteína.

Los cambios de dispersión de la luz por el agregado de $200 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} mostraron el mismo patrón. Es decir, el agregado de SB202190 no alteró la respuesta al Ca^{2+} detectada en suspensiones mitocondriales de los grupos CNI y CI. Sin embargo, atenuó significativamente el aumento de la respuesta al Ca^{2+} observada en el grupo BZ, observándose un valor similar al obtenido en el grupo CI ($0,30 \pm 0,08$ u.a.) (Figura 35).

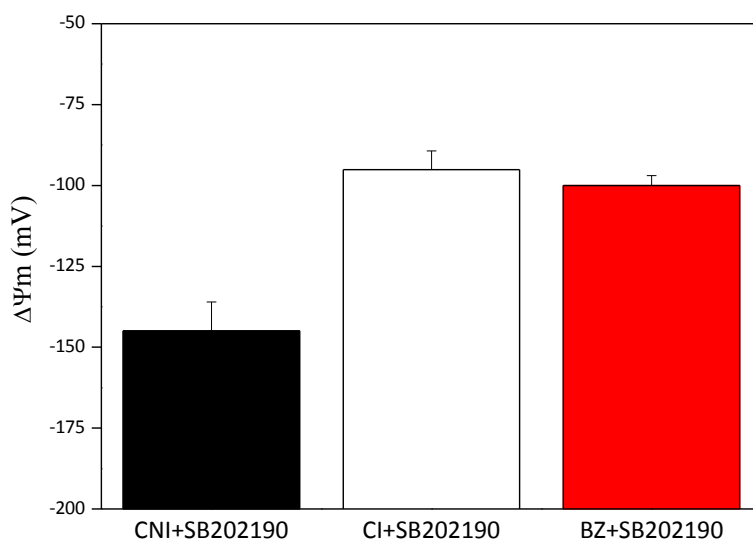


Figura 33: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI ($n = 6$), CI ($n = 8$) y BZ ($n = 8$), en presencia de SB202190.

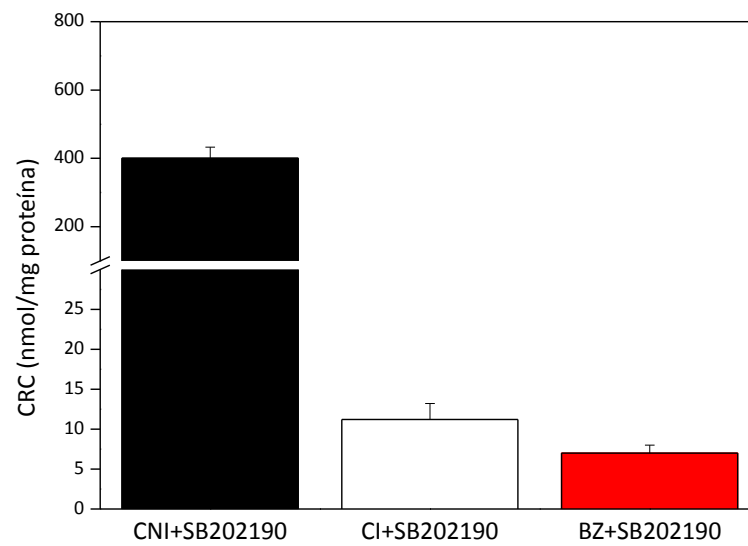


Figura 34: Capacidad de retención de Ca^{2+} , expresada en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y BZ (n = 8), en presencia de SB202190.

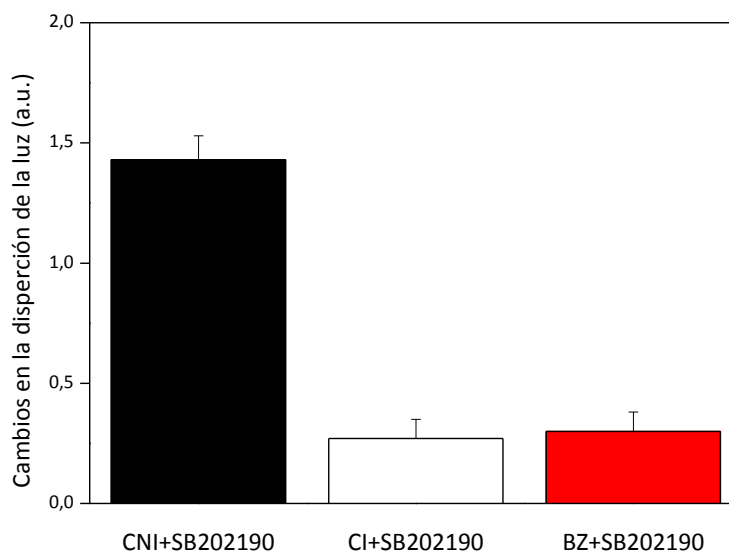


Figura 35: Cambios en la dispersión de la luz de suspensiones mitocondriales obtenidas de los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y BZ (n = 8) en presencia de SB202190.

4. Expresión de P- p38MAPK

La expresión de la forma fosforilada de la p38MAPK con respecto a la p38MAPK total (P-p38MAPK/p38MAPK) en los grupos tratados con SB202190 sólo se modificó en aquellos corazones tratados con BZ. Por lo tanto, en el grupo BZ + SB202190 el contenido de P-p38MAPK disminuyó más de un 50 %, adquiriendo un valor de 52 ± 5 % (Figura 36).

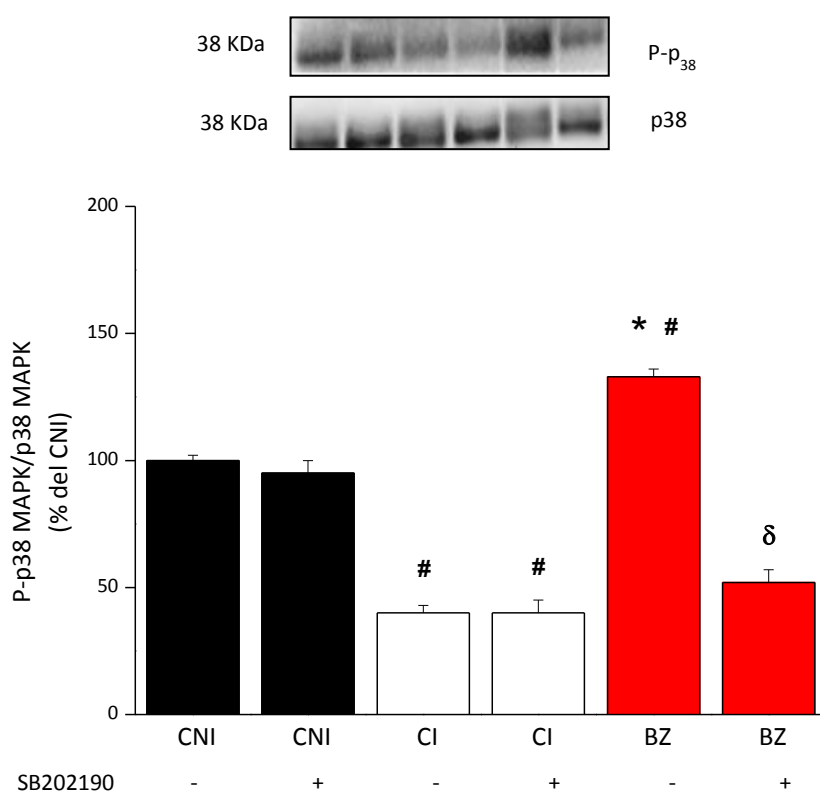


Figura 36: Expresión de P-p38MAPK/p38MAPK, expresada como porcentaje del valor obtenido en el grupo CNI, en los grupos CNI (n=6), CI (n=8) y BZ (n=8), en presencia y ausencia de SB202190. # $p < 0.05$ con respecto a CN. * $p < 0,05$ con respecto a CI; $\delta < 0,05$ con respecto a BZ.

Por lo tanto, la inhibición de p38MAPK en el grupo tratado con Benzolamida produjo:

- **Aumento del tamaño del infarto**
- **Disminución de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas**
- **Despolarización mitocondrial**
- **Disminución de la capacidad de retención de Ca^{2+}**

Estos resultados indican que los efectos miocárdicos y mitocondriales beneficiosos producidos por la inhibición de la anhidrasa carbónica con benzolamida durante los primeros 10 minutos de la perfusión son dependientes de la fosforilación/activación de p38MAPK.

4.3 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA CON ETOXIZOLAMIDA (ETX)

1. Tamaño de infarto

En la Figura 37 se muestran los valores promedio del tamaño del infarto al final del período de perfusión y trozos representativos, de corazones pertenecientes a los grupos CNI (n=8), CI (n=6) y ETX (n = 8). El valor promedio para este último grupo fue $11,5 \pm 0,4 \%$, siendo significativamente menor que el observado en el grupo C I.

2. Función miocárdica

-Función Sistólica

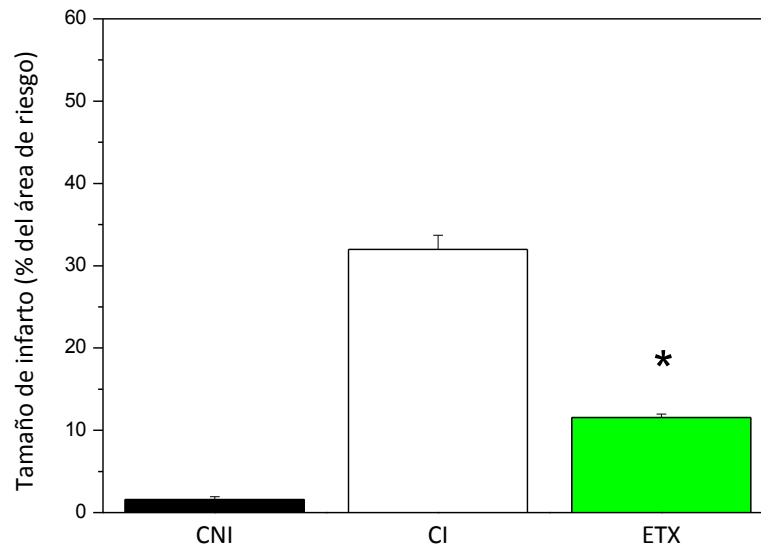


Figura 37: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI, CI y tratado con etoxizolamida (ETX). * $p < 0,05$ con respecto a CI.

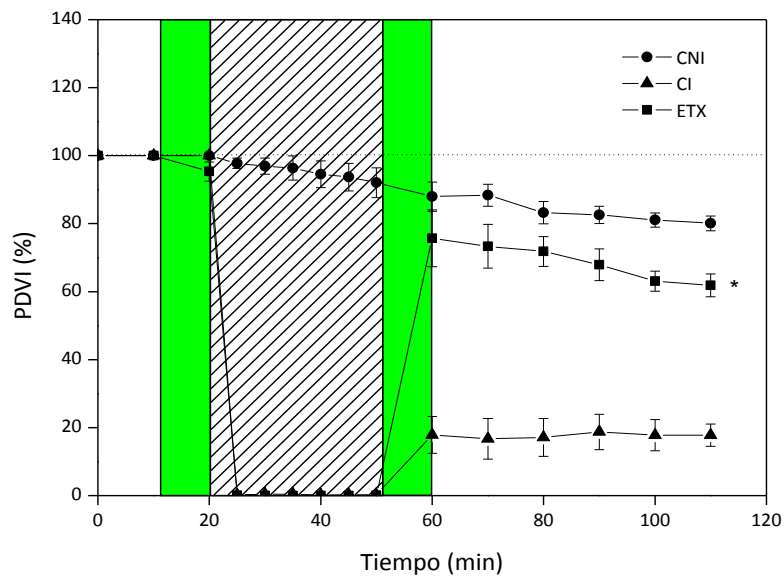


Figura 38: Valores de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje de la estabilización, en los grupos CNI, CI y ETX. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

En el grupo tratado con ETX la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) alcanzó al final de la reperfusión un valor promedio de 62 ± 3 %, siendo significativamente mayor que el valor observado en el grupo CI.

La $+dP/dt_{\max}$ se comportó de manera similar que la PDVI, llegando a valores cercanos a cero durante el periodo isquémico y alcanzando valores de 62 ± 4 % al final de la reperfusión. En todos los puntos analizados de la reperfusión se observaron diferencias significativas entre los grupos ETX y CI (Figura 39).

-Función Diastólica:

En la Figura 40 se muestran los cambios de la presión diastólica final (PDF) en función del tiempo en los grupos CNI, CI y ETX. A todos los tiempos de la reperfusión hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos en los grupos CI y ETX. Al final de la reperfusión el valor de la PDF para el grupo ETX fue de 36 ± 5 mmHg. Los valores del $-dP/dt_{\max}$ en el grupo ETX fueron significativamente mayores a los observados en el grupo CI. Al final de la reperfusión, el valor de este parámetro fue de 60 ± 5 % para el grupo ETX (Figura 41).

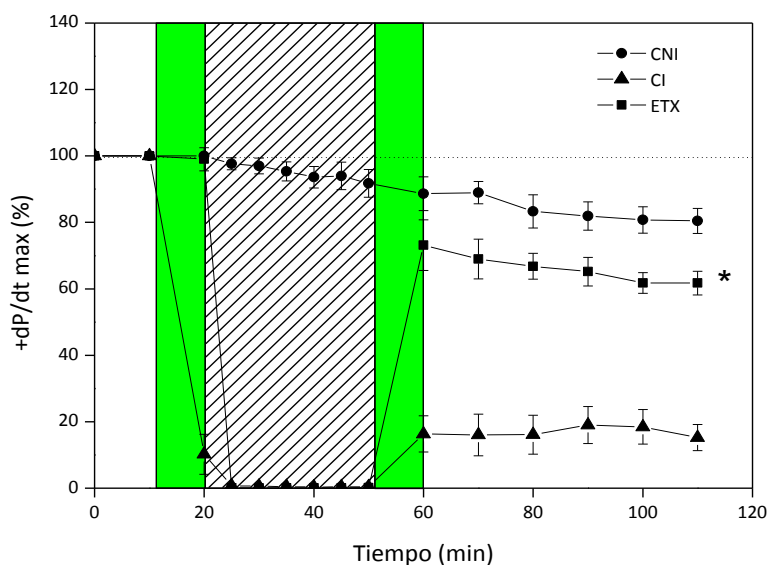


Figura 39: Máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{\max}$) expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y ETX. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

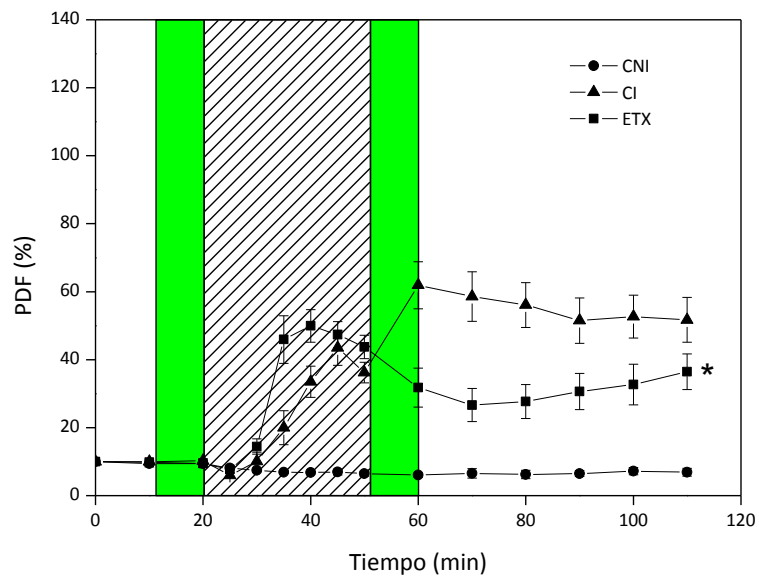


Figura 40: Presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI y ETX. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

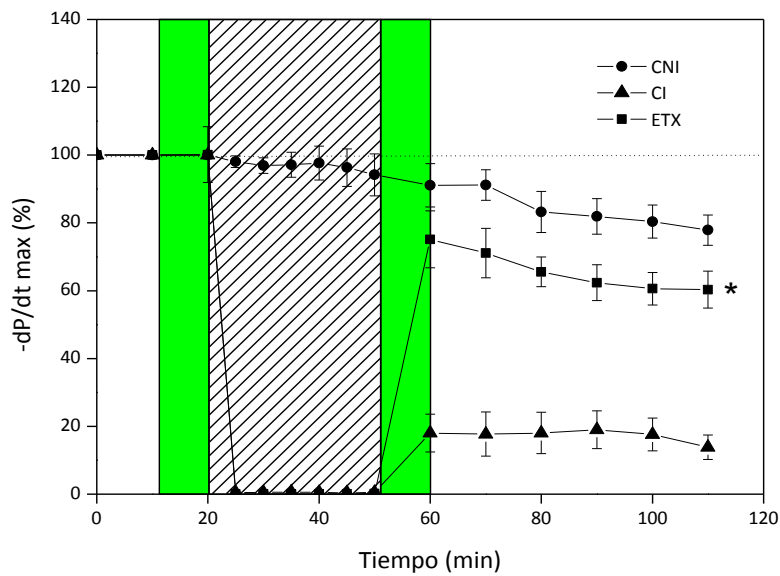


Figura 41: Máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{max}$) expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y ETX. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

3. Estado mitocondrial

En la Figura 42 se muestran los datos del $\Delta\psi_m$. El valor obtenido para el grupo de ETX fue de -130 ± 7 mV, siendo este valor significativamente diferente del observado en el grupo CI.

La CRC, cuyos valores medios con sus errores están graficados en la Figura 43, fue de 266 ± 10 nmol/mg proteína para el grupo ETX, siendo estadísticamente diferente del obtenido en el grupo CI.

Los valores de los cambios de la dispersión de la luz se muestran en la Figura 44. El valor promedio obtenido para los corazones tratados con ETX fue $1,25 \pm 0,17$ u.a. Este valor fue significativamente mayor que el observado en CI.

3. Expresión de P-p38MAPK

La expresión de la forma fosforilada de p38MAPK disminuyó en el grupo CI, y aumentó significativamente con el tratamiento con ETX, obteniéndose un valor de 153 ± 2 %, con respecto al CNI (Figura 45).

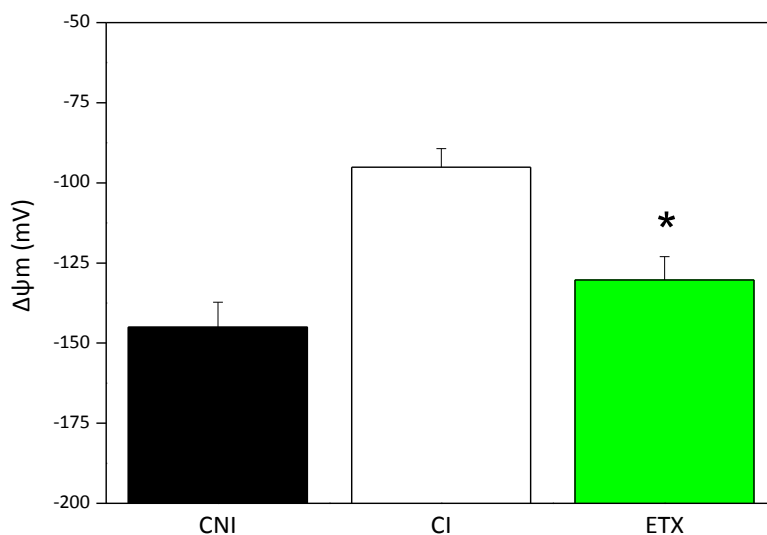


Figura 42: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y ETX (n = 8). * $p < 0,05$ con respecto a CI

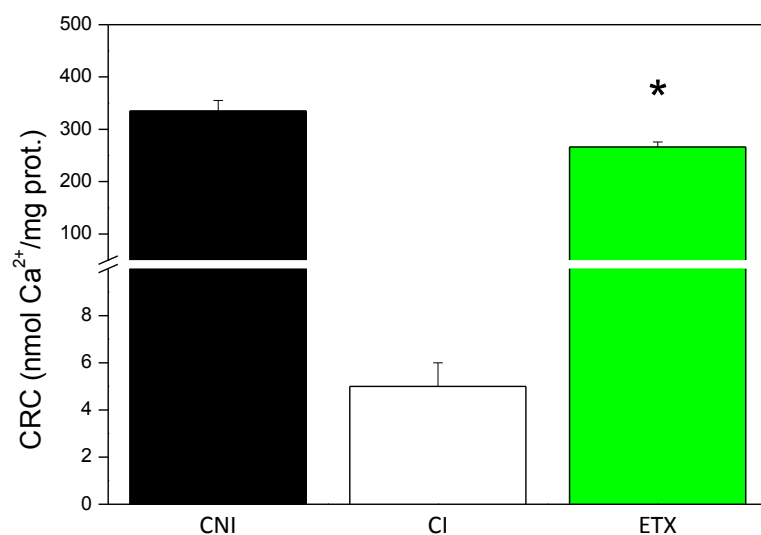


Figura 43: Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) expresado en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y ETX (n = 8). * $p < 0,05$ con respecto a CI.

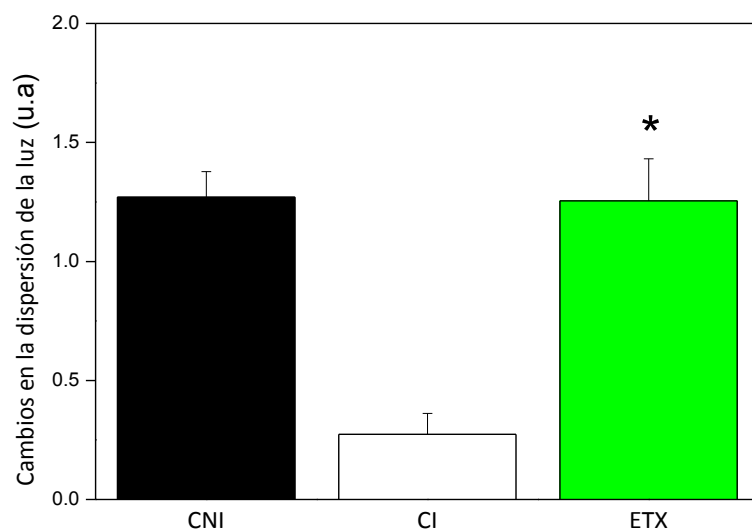


Figura 44: Cambios en la dispersión de la luz de una suspensión mitocondrial expresados en unidades arbitrarias (u.a.) tras el agregado de $200\mu\text{M}$ de Ca^{2+} en los grupos CNI (n = 6), CI (n = 8) y ETX (n = 8). * $p < 0,05$ con respecto a CI.

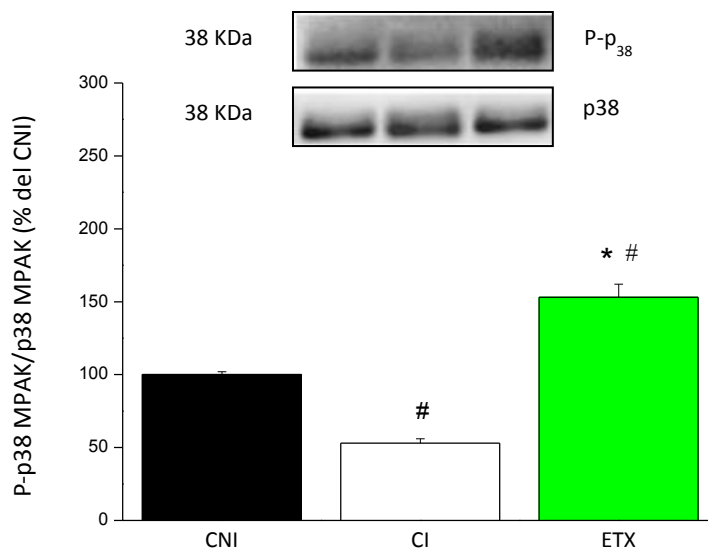


Figura 45: Expresión de P-p38MAPK/p38MAPK expresados como porcentaje del valor obtenido en el grupo CNI (n=6), en los grupos CNI, CI (n=8) y ETX (n=8). # p < 0,05 con respecto a CNI. * p < 0,05 con respecto a CI.

Efectos de la inhibición de la p38MAPK con SB202190

1. Tamaño de infarto

En la Figura 46 se muestran los valores promedio de los tamaños del infarto, medidos al final del período de reperfusión, de corazones pertenecientes a los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y ETX + B202190

Los valores fueron de $2,1 \pm 0,3$ %; 28 ± 2 % y 20 ± 2 %, respectivamente. Por lo tanto, la disminución del infarto observada con ETX fue abolida en presencia de SB202190, observándose valores de infarto similares a los obtenidos en el grupo CI.

4. Función miocárdica

Función Sistólica

El tratamiento con SB202190 no modificó la presión desarrollada del VI (PDVI) en los grupos CNI y CI, pero disminuyó significativamente el aumento de dicho parámetro observado en el grupo ETX, alcanzando el valor de 37 ± 7 % al final de la reperfusión (Figura 47)

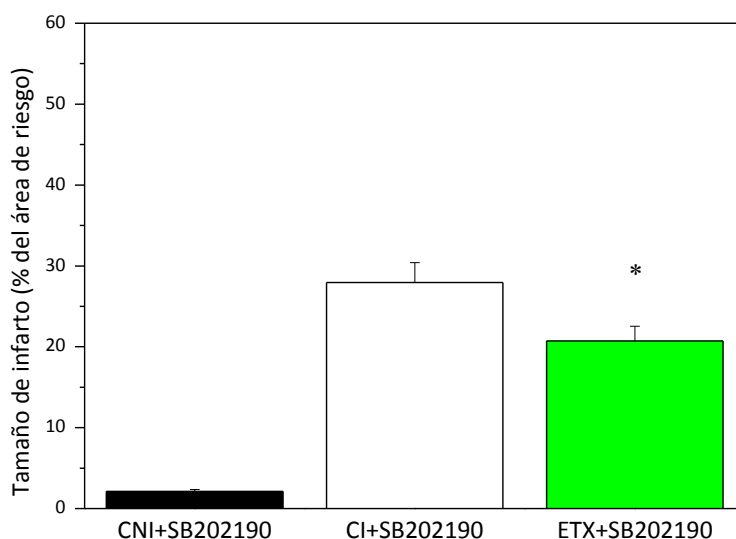


Figura 46: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI+SB (n = 6), CI + SB202190 (n = 7) y ETX + SB202190 (n = 7). * p < 0,05 con respecto a CI.

Los cambios de la máxima velocidad de ascenso de la PDVI ($+dP/dt_{max}$) fueron similares a los de la PDVI.

Por lo tanto, la inhibición de p38MAPK con SB202190 no modificó este parámetro en los grupos CNI y CI pero anuló la mejora observada en corazones tratados con ETX. Al término de la reperfusión, el valor de $+dP/dt_{max}$ en el grupo ETX + SB201190 fue de 15 ± 7 %, valor similar al obtenido en el grupo CI + SB202190 (Figura 48).

Función Diastólica

La inhibición de p38MAPK con SB202190 no modificó los valores de la presión diastólica final (PDF) de los grupos CNI y CI, pero anuló la disminución de dicho parámetro observada en el grupo ETX. En este grupo, la PDF al final de la reperfusión llegó al valor promedio de 52 ± 8 mmHg (Figura 49).

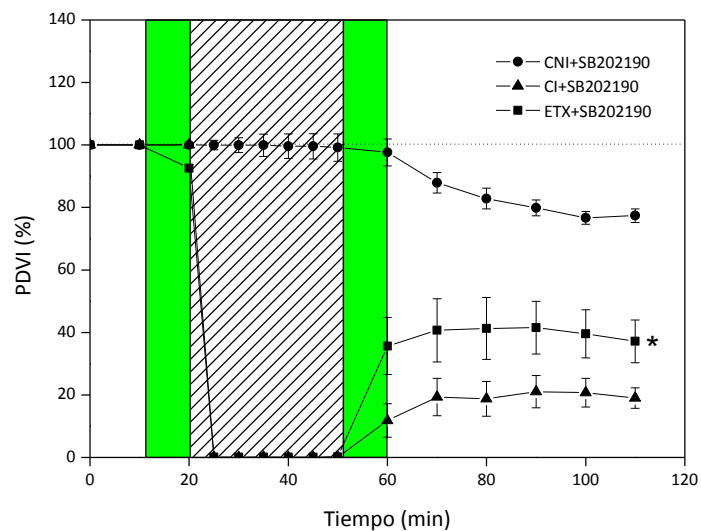


Figura 47: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje del valor observado en la estabilización, en los grupos CNI, CI y ETX en presencia de SB202190. * $p < 0.05$ con respecto a CI.

Los cambios en el $-dP/dt_{\max}$ de los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y ETX + SB202190 se muestran en la Figura 50. El tratamiento con SB202190 no modificó los valores de este parámetro en los grupos CNI y CI, pero atenuó el aumento observado en el grupo ETX, adquiriendo el valor de CI.

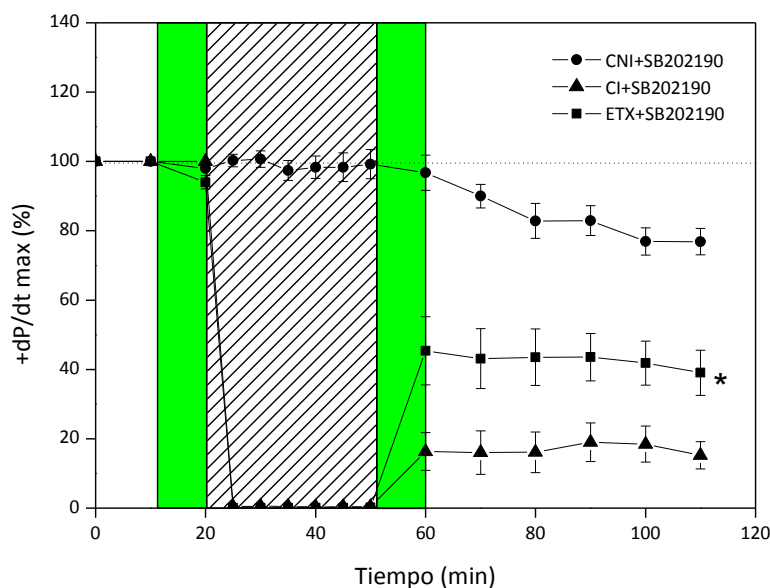


Figura 48: Máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{\max}$) expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y ETX en presencia de SB202190. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

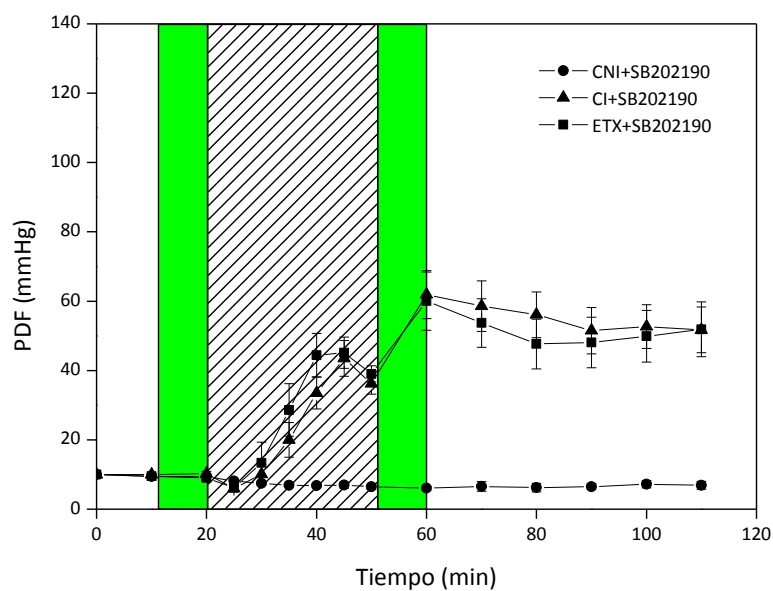


Figura 49: Presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI y ETX en presencia de SB202190.

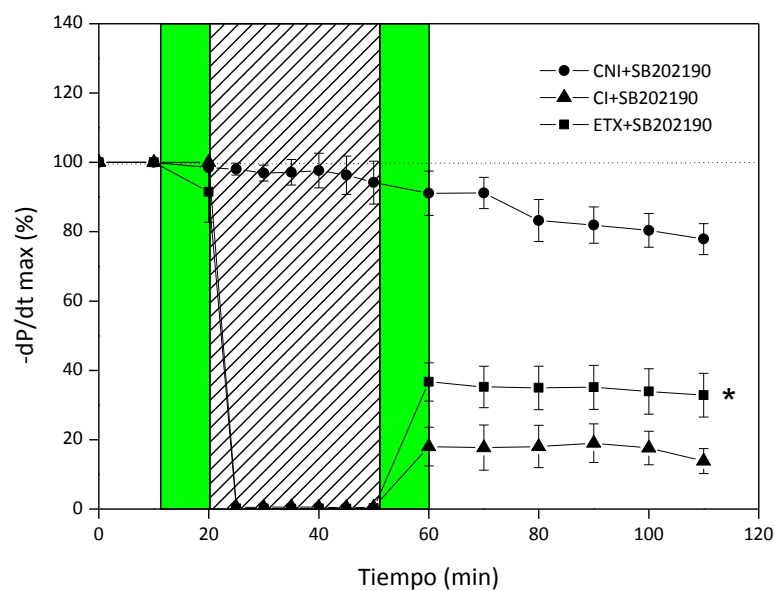


Figura 50: Máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y ETX, en presencia de SB202190. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

3. Estado mitocondrial

En la Figura 51 se graficaron los valores del $\Delta\Psi_m$ de los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y ETX + SB202190. La administración de SB202190 no modificó el $\Delta\Psi_m$ observado en los grupos CNI y CI, pero redujo el efecto producido por ETX, hallándose un valor de -116 ± 4 mV. Los valores de

CRC para los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y ETX + SB202190 se muestran en la Figura 51. El valor obtenido para ETX + SB202190 fue 160 ± 20 nmol Ca^{2+} /mg proteína.

Los cambios de dispersión de la luz (ΔDL) por el agregado de $200 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} mostraron el mismo patrón. Es decir, el agregado de SB202190 no alteró la respuesta al Ca^{2+} detectada en suspensiones mitocondriales de los grupos CNI y CI. Sin embargo, atenuó significativamente el aumento de la respuesta al Ca^{2+} observada en el grupo ETX ($0,50 \pm 0,07$ u.a.) (Figura 53).

5. Expresión de P- p38MAPK

La expresión de la forma fosforilada de la p38MAPK con respecto a la p38MAPK total (P-p38MAPK/p38MAPK) en los grupos tratados con SB202190 sólo se modificó en aquellos corazones tratados con ETX. Por lo tanto, en el grupo ETX + SB202190 el contenido de P-p38MAPK disminuyó más de un 50 %, adquiriendo un valor de 68 ± 6 % (Figura 54).

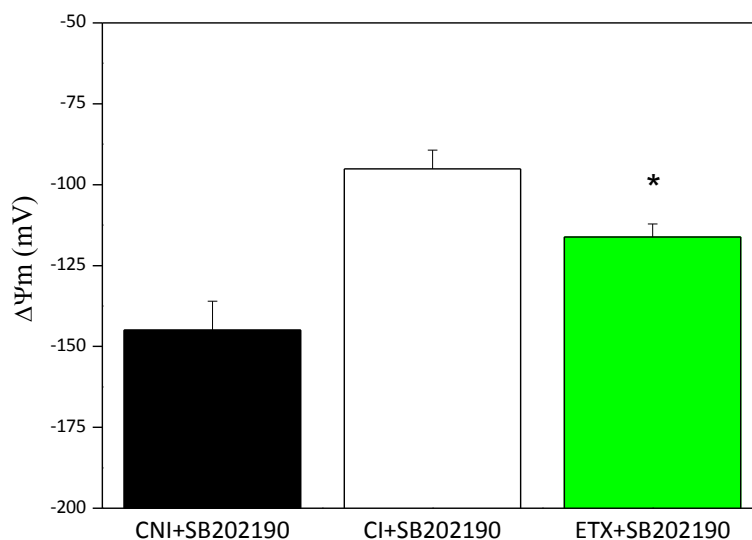


Figura 51: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI (n=6), CI (n=7) y ETX (n=7), en presencia de SB202190. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

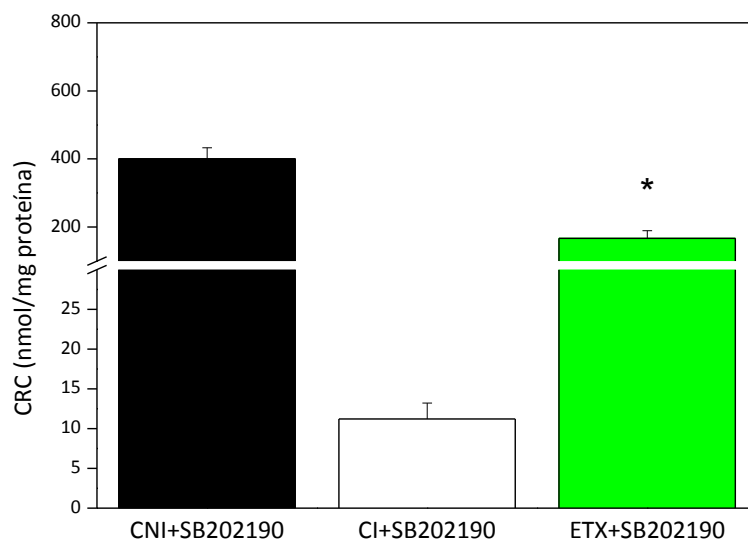


Figura 52: Capacidad de retención de Ca^{2+} expresado en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n=6), CI (n=7) y ETX (n=7), en presencia de SB202190. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

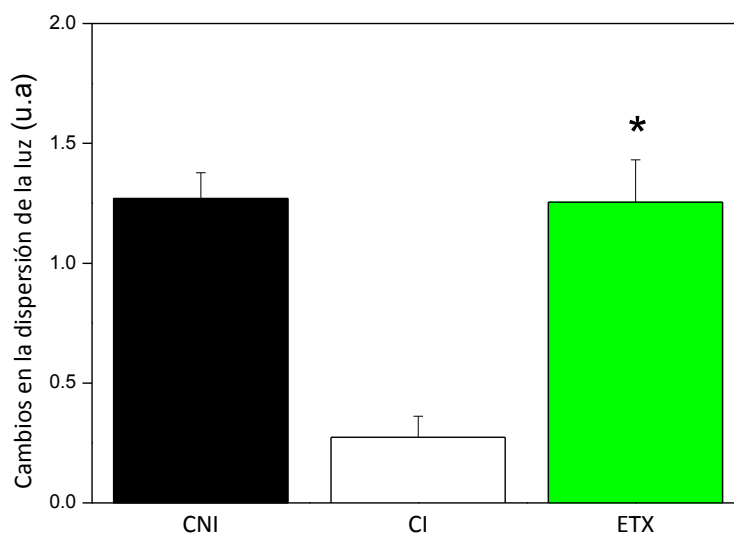


Figura 53: Cambios en la dispersión de la luz de suspensiones mitocondriales obtenidas de los grupos CNI (n=6), CI (n=7) y ETX (n=7) en presencia de SB202190. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

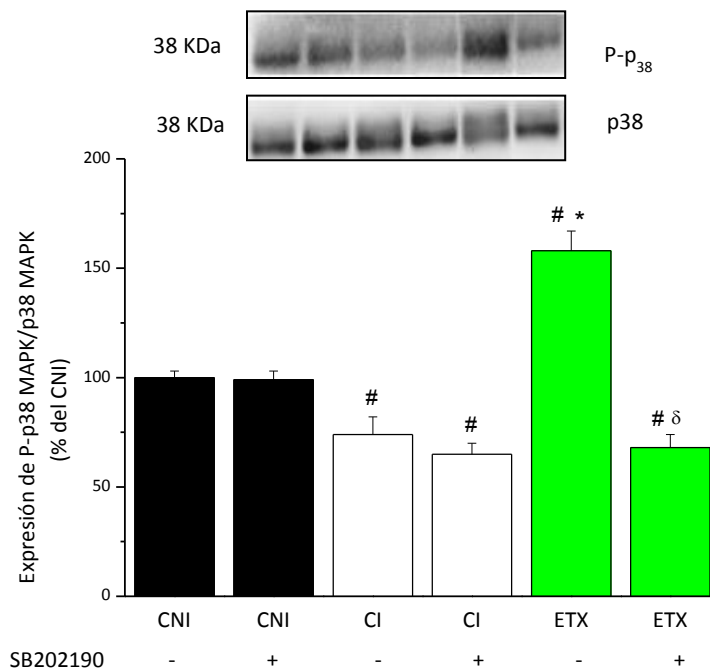


Figura 54: Expresión de P-p38MAPK/p38MAPK como porcentaje del valor obtenido en CNI, en los grupos CNI (n=6), CI (n=7) y ETX (n=7), en presencia y ausencia de SB202190. # $p < 0,05$ con respecto a CNI. * $p < 0,05$ con respecto a CI; $\delta < 0,05$ con respecto a ETX.

Por lo tanto, la inhibición de p38MAPK en el grupo tratado con 6-etoxizolamida produjo:

- **Aumento del tamaño del infarto**
- **Disminución de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas**
- **Despolarización mitocondrial**
- **Disminución de la capacidad de retención de Ca^{2+}**
- **Reducción de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}**

Estos resultados indican que los efectos miocárdicos y mitocondriales beneficiosos producidos por la inhibición de la anhidrasa carbónica con 6-etoxizolamida durante los últimos 10 minutos de la estabilización y los primeros 10 minutos de la reperfusión son dependientes de la fosforilación/activación de p38 MAPK.

4.4 EFECTOS DE LA REPERFUSION TEMPRANA CON UNA SOLUCIÓN ÁCIDA (RA)

1. Tamaño de infarto

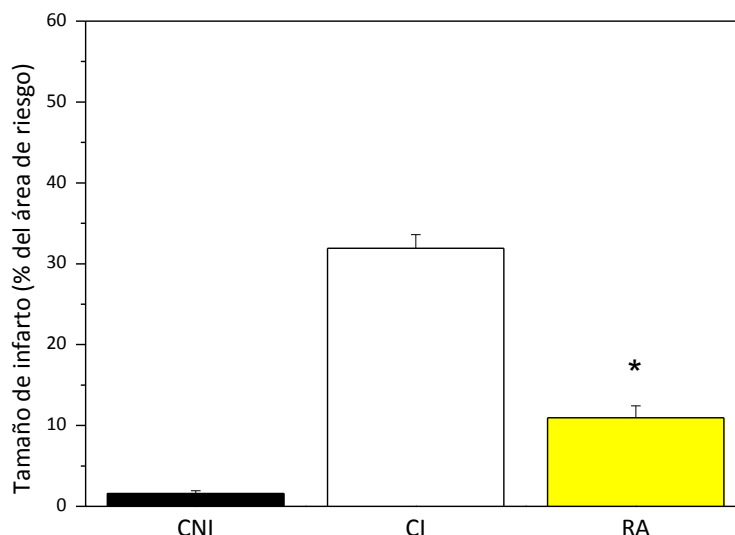


Figura 55: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI, CI y RA. * $P < 0,05$ con respecto a CI.

En la Figura 54 se muestran los valores promedios de los tamaños del infarto medidos y trozos representativos al final del período de reperfusión, de corazones pertenecientes a los grupos CNI, CI y RA. Los valores fueron $2 \pm 0,4 \%$ ($n = 8$) en el grupo CNI, $32 \pm 2 \%$ ($n = 8$) en el grupo CI y $9 \pm 2 \%$ ($n = 6$) en el grupo RA.

2. Función miocárdica

Función Sistólica

La administración de una solución de Ringer con pH ácido (6.4) durante los primeros 3 minutos de la reperfusión mejoró significativamente la PDVI comparada con el CI en todos los puntos analizados de la reperfusión. A los 60 minutos de reperfusión los valores fueron $18 \pm 3 \%$ y $54 \pm 3 \%$ para los grupos CI y RA, respectivamente (Figura 56).

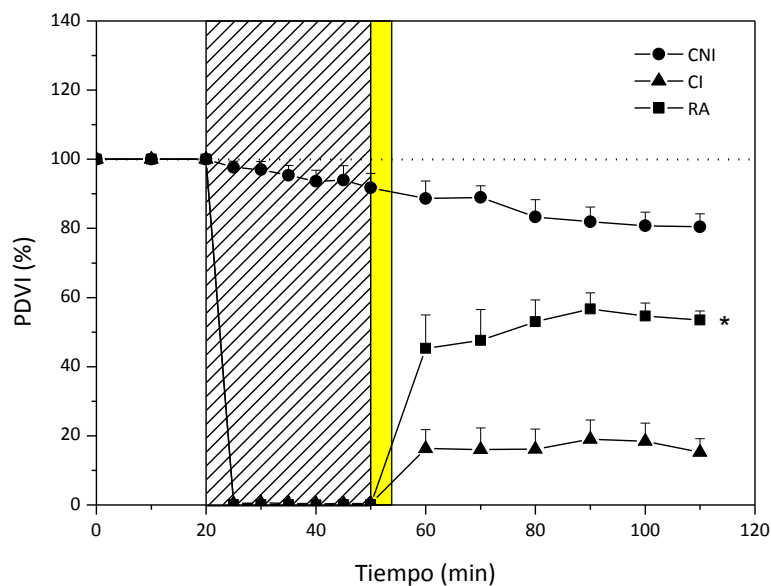


Figura 56: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y RA. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

La $+dP/dt_{\max}$ se comportó de manera similar que la PDVI y alcanzó valores de $15 \pm 4 \%$ y $54 \pm 2 \%$ en los grupos CI y RA, respectivamente (Figura 57).

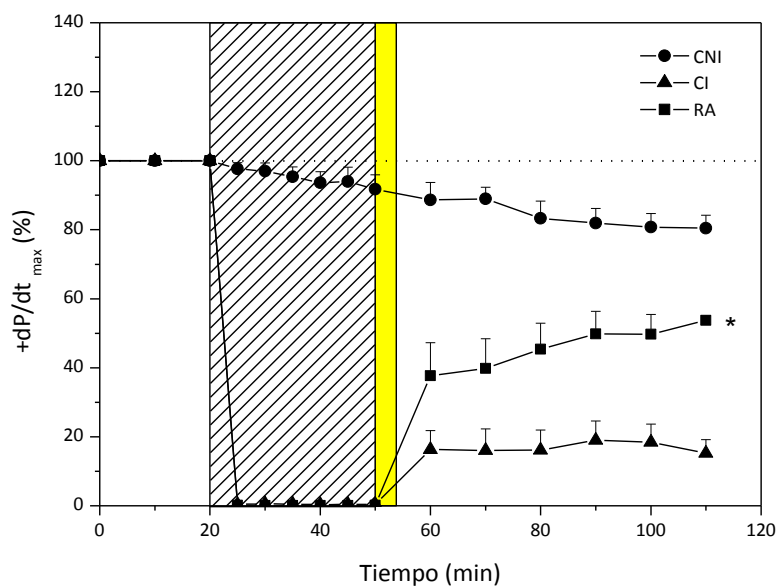


Figura 57: Máxima velocidad de desarrollo de la presión ventricular izquierda ($+dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y RA. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

-Función Diastólica.

En la Figura 58 se muestran los cambios de la PDF, expresados en mmHg, en función del tiempo en los grupos CNI, CI y RA.

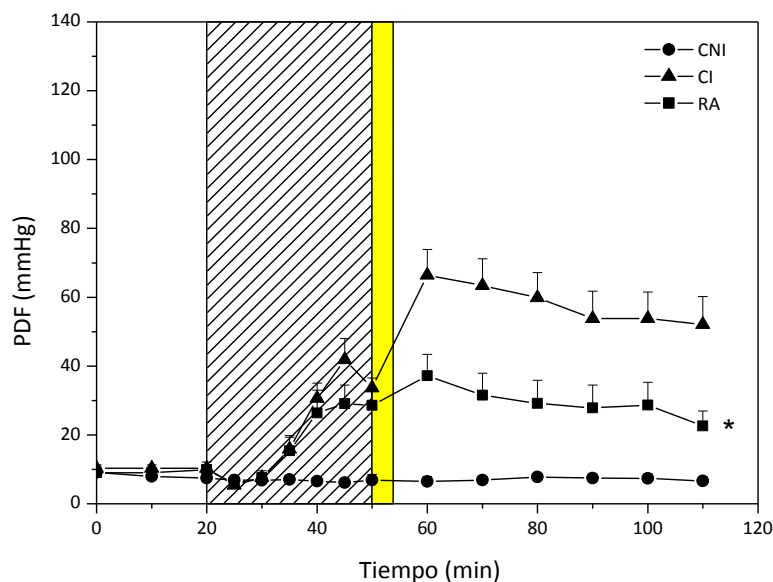


Figura 58: Presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI y RA. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

La PDF al final de la reperfusión llegó a valores 52 ± 7 mmHg en el grupo CI. La RA disminuyó significativamente la PDF durante toda la reperfusión, alcanzando a los 60 minutos el valor de 23 ± 4 mmHg.

Los cambios en el $-dP/dt_{max}$ se muestran en la Figura 59. Los valores promedio al final del periodo de reperfusión fueron $14 \pm 4\%$ y $54 \pm 4\%$ para los grupos CI y RA respectivamente. Como se puede observar, la RA aumentó significativamente la recuperación de la función diastólica, mostrando la $-dP/dt_{max}$ valores mayores que los observados en el grupo CI.

3. Estado mitocondrial

La Figura 60 muestra los valores del $\Delta\Psi_m$ de los grupos CNI, CI y RA. RA evitó la despolarización mitocondrial observada en el grupo CI. Los valores fueron -94 ± 6 mV para el grupo CI y -150 ± 7

mV para el grupo RA.

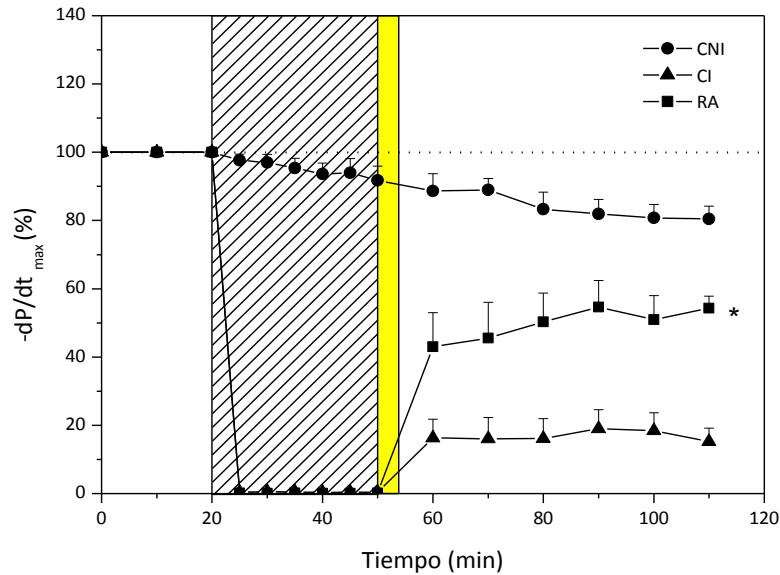


Figura 59: Máxima velocidad de descenso de la presión ventricular izquierda ($-dP/dt_{\max}$), expresada como porcentaje del valor observado en la estabilización, en los grupos CNI, CI y RA. * $p < 0,05$ con respecto a CI.

La CRC (Figura 61) fue de 400 ± 33 nmoles/mg proteína en el grupo CNI, disminuyó en el grupo CI alcanzando valores de 11 ± 2 nmoles/mg proteína y la RA recuperó la CRC y el valor promedio fue similar al obtenido en el grupo CNI (412 ± 35 nmoles/mg proteína).

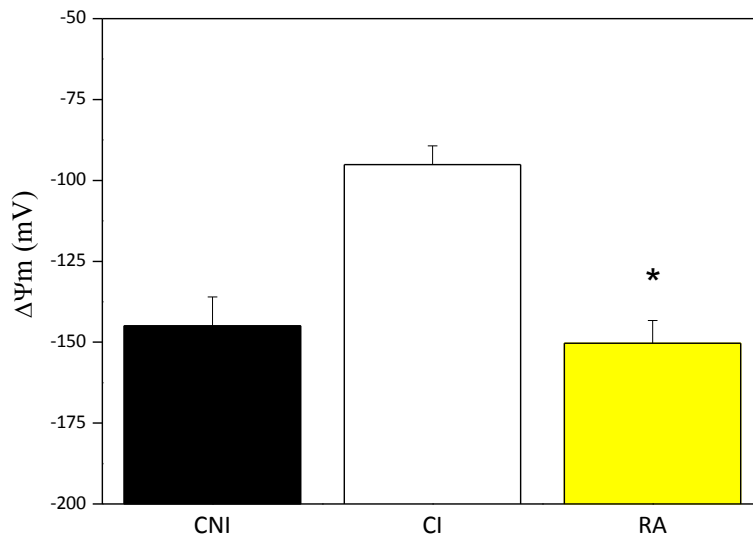


Figura 60: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI ($n = 8$), CI ($n = 8$) y RA ($n = 8$). * $p < 0,05$ con respecto a CI.

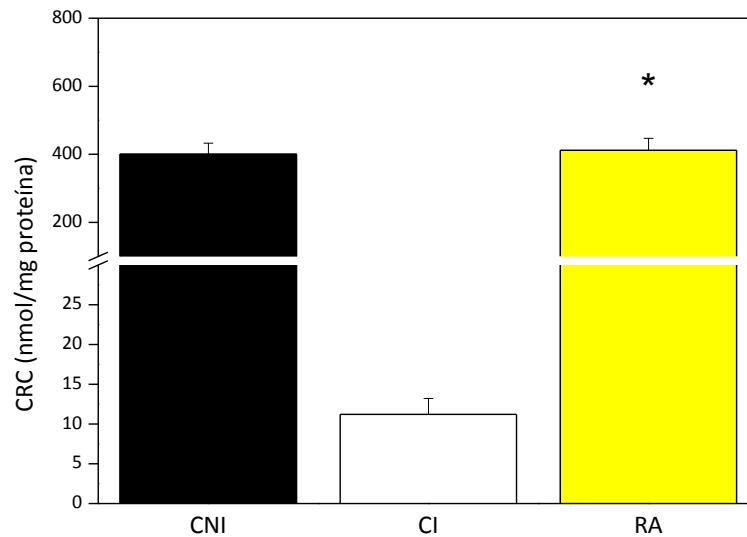


Figura 61: Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), expresada en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 8), CI (n = 8) y RA (n = 8). * p < 0,05 con respecto a CI.

En la Figura 62 se grafican los valores promedio de los cambios de dispersión de la luz. Estos fueron $0,27 \pm 0,08$ y $1,28 \pm 0,15$ u.a. en los grupos CI y RA, respectivamente.

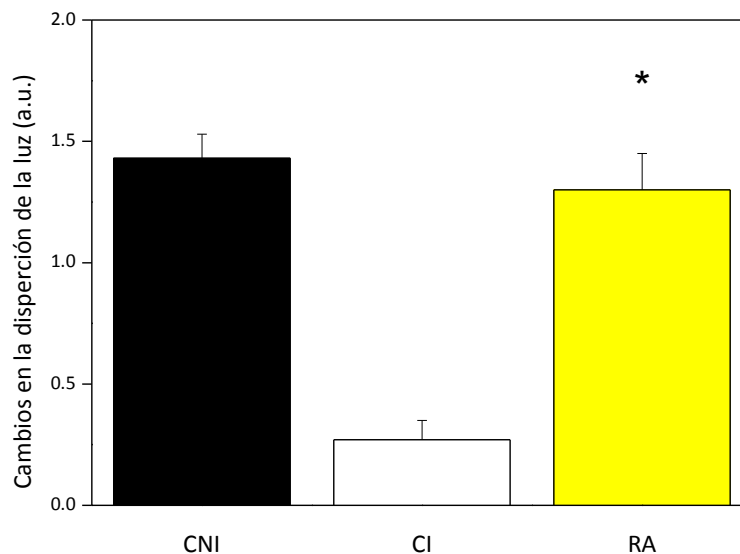


Figura 62: Cambios en la dispersión de la luz de una suspensión mitocondrial producidos por el agregado de $200 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} y expresados en unidades arbitrarias (a.u.) en los grupos CNI (n = 8), CI (n = 8) y RA (n = 8). * p < 0,05 con respecto a CI.

4. Expresión de P-p38MAPK

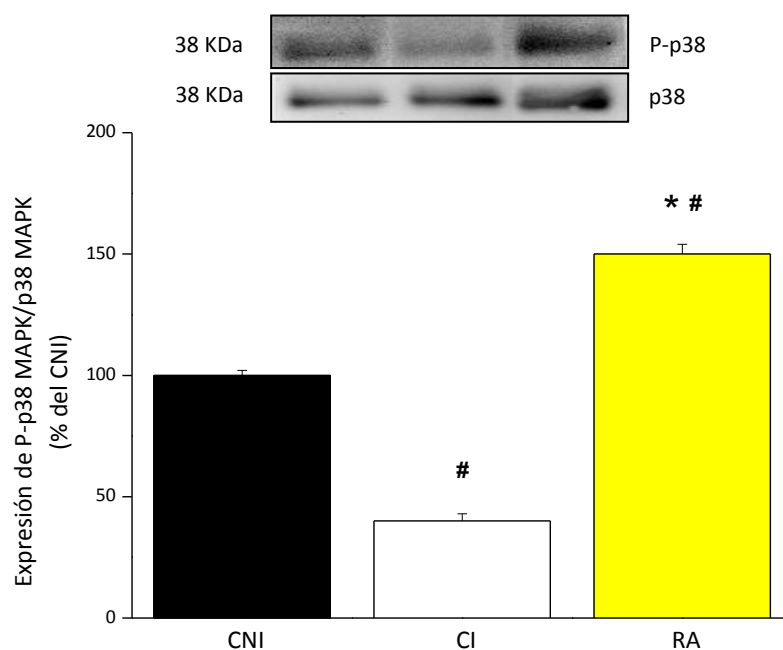


Figura 63: Expresión de P-p38MAPK/p38MAPK, expresados como porcentaje del valor obtenido en el grupo CNI (n = 7), en los grupos CI (n = 8) y RA (n = 8). # p < 0,05 con respecto a CNI. * p < 0,05 con respecto a CI.

La expresión de la forma fosforilada de la p38 MAPK con respecto a la p38MAPK (P-p38MAPK/p38MAPK) en homogenato total disminuyó en el grupo CI (41 ± 3 %), mientras que el tratamiento con RA aumentó significativamente su contenido hasta 150 ± 4 % (Figura 63).

Estos resultados demuestran que la reperfusión con una solución ácida durante los primeros 3 minutos de la reperfusión produjo:

- Disminución del tamaño del infarto
- Aumento de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas
- Reducción de la despolarización mitocondrial
- Aumento de la capacidad de retención de Ca^{2+}
- Recuperación de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}
- Aumento de la fosforilación de p38MAPK

Efectos de la inhibición de la p38MAPK con SB202190

1. Tamaño de infarto

En la Figura 64 se muestran los valores promedio de los tamaños del infarto, medidos al final del período de reperfusión, de corazones pertenecientes a los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190 y RA + B202190. Los valores fueron de $2 \pm 0,3 \%$, $32 \pm 3 \%$ y $30 \pm 2 \%$, respectivamente. Por lo tanto, la disminución del infarto observada con RA fue abolida en presencia de SB202190, observándose valores de infarto similares a los obtenidos en el grupo CI.

2. Función miocárdica

-Función Sistólica

Al final de los 110 minutos de perfusión, la PDVI, expresada como porcentaje de los valores obtenidos durante la estabilización, fueron $24 \pm 3 \%$ y $20 \pm 5 \%$ en los grupos CI y RA, respectivamente (Figura 65).

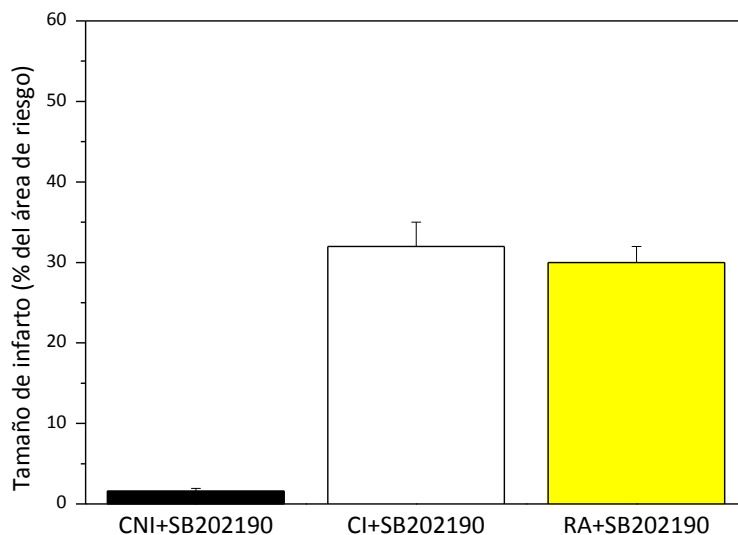


Figura 64: Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los grupos CNI+SB (n = 7), CI + SB202190 (n = 8) y RA + SB202190 (n = 8).

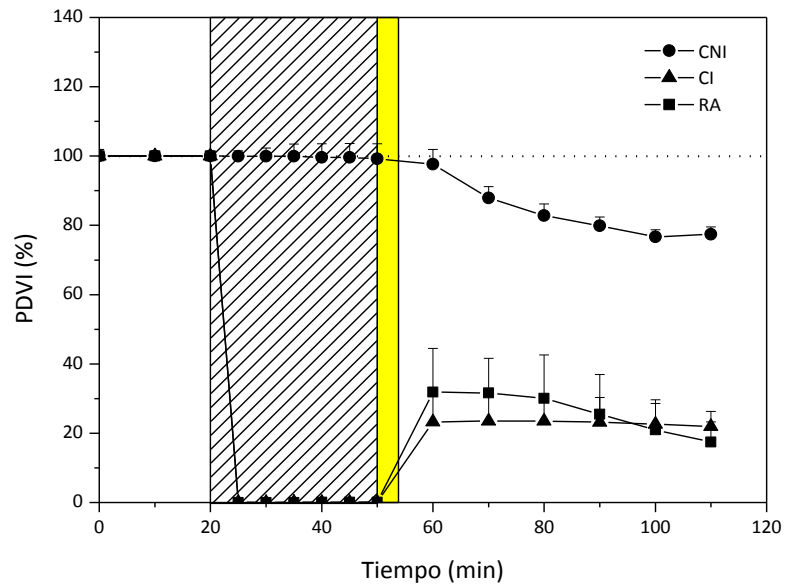


Figura 65: Presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y RA en presencia de SB202190.

En la Figura 66 se muestran los cambios de la máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{\max}$). En el grupo CNI, al final de la reperfusión el valor de $+dP/dt_{\max}$ fue de 77 ± 4 %.

En los grupos CI y RA, en presencia de SB202190, la $+dP/dt_{\max}$ alcanzó a los 60 minutos de reperfusión valores de 23 ± 6 % y 17 ± 2 %, respectivamente (Figura 65).

-Función Diastólica

Durante la isquemia-reperfusión la presión diastólica final en los grupos CI y RA aumentó, alcanzando al final de la reperfusión valores de 59 ± 8 y 53 ± 4 mmHg, respectivamente. En todos los puntos analizados no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CI y RA más SB202190 (Figura 67).

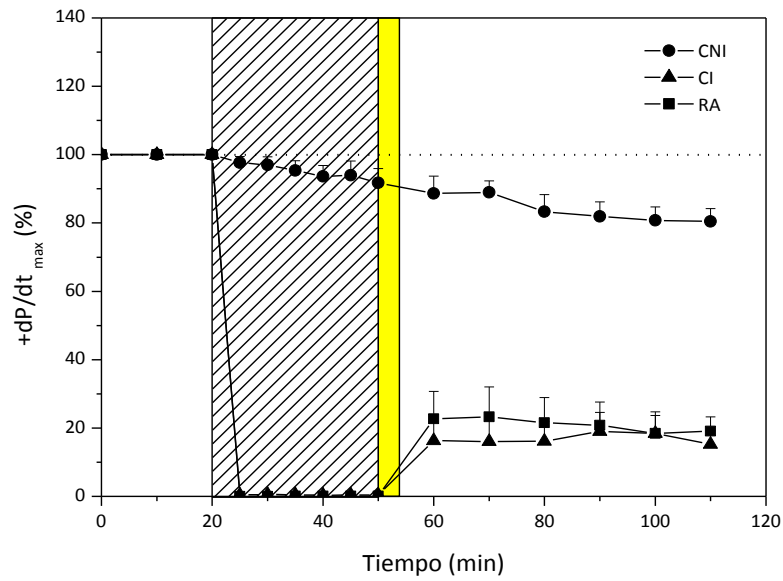


Figura 66: Máxima velocidad de ascenso de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo ($+dP/dt_{max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI y RA en presencia de SB202190.

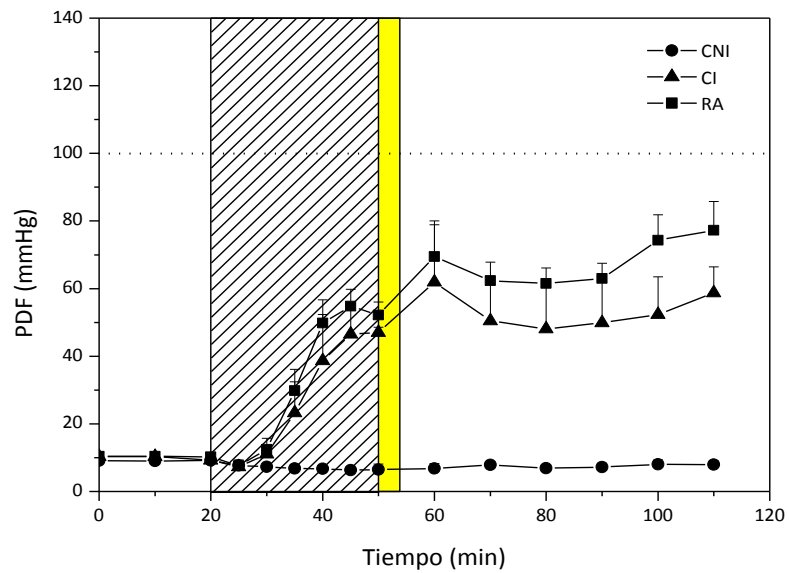


Figura 67: Cambios de la presión diastólica final (PDF), expresada en mmHg, en los grupos CNI, CI y RA en presencia de SB202190.

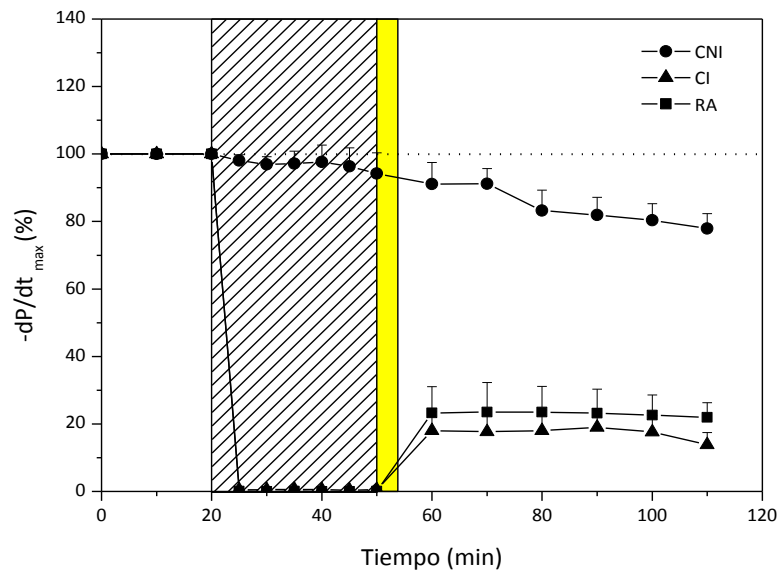


Figura 68: Máxima velocidad de descenso de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo ($-dP/dt_{max}$), expresada como porcentaje del valor obtenido en la estabilización, en los grupos CNI, CI, y RA en presencia de SB202190.

Los cambios en el $-dP/dt_{max}$ de los grupos CNI + SB202190, CI + SB202190, y RA + SB202190 se muestran en la Figura 68. Los valores promedio al final del periodo de reperusión fueron $83 \pm 4 \%$, $23 \pm 8 \%$ y $21 \pm 6 \%$, respectivamente. Al igual que para los parámetros anteriormente analizados, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CI + SB202190 y RA + SB202190.

3. Estado mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) para el grupo CNI + SB202190 fue -143 ± 11 mV. Una marcada disminución se encontró para el grupos CI + SB202190, siendo el valor -92 ± 7 mV. En el grupo RA + SB202190 se registró un valor promedio de -95 ± 4 mV (Figura 69). Los valores de CRC para los grupos CNI, CI y RA en presencia de SB202190 fueron de 398 ± 20 , 15 ± 2 y 20 ± 3 nmol Ca^{2+} /mg proteína, respectivamente. Sólo se observó una disminución significativa de CRC entre los grupos RA y RA + SB202190 (Figura 70).

Los cambios de la dispersión de la luz producidos por el agregado de $200 \mu M$ de Ca^{2+} para los grupos CNI, CI y RA en presencia de SB202190 se muestran en la Figura 71. Los valores obtenidos

fueron $1,40 \pm 0,20$; $0,25 \pm 0,09$; $0,50 \pm 0,09$ y $0,33 \pm 0,04$ u.a. Sólo el grupo RA + SB202190 mostró una disminución significativa con respecto a lo observado en el grupo RA.

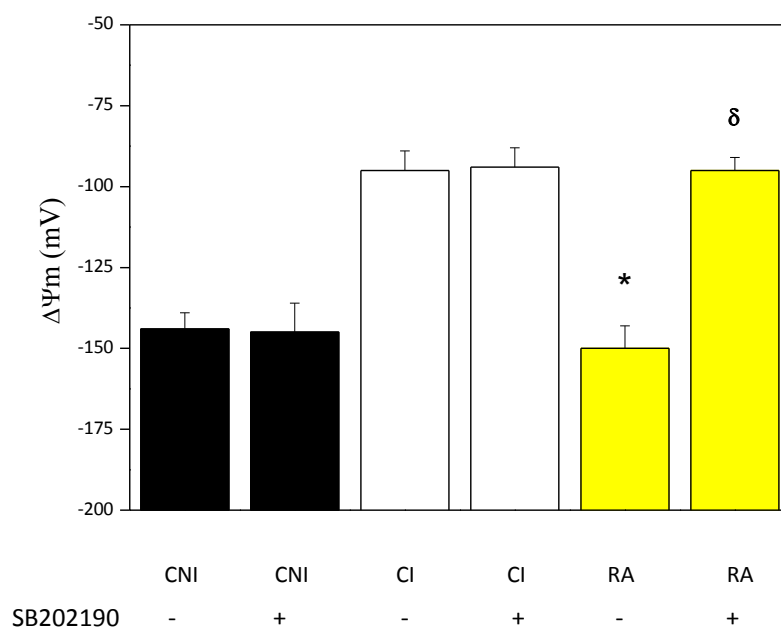


Figura 69: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), expresado en mV, en los grupos CNI (n = 7), CI (n = 8) y RA (n = 8) en presencia y en ausencia de SB202190.

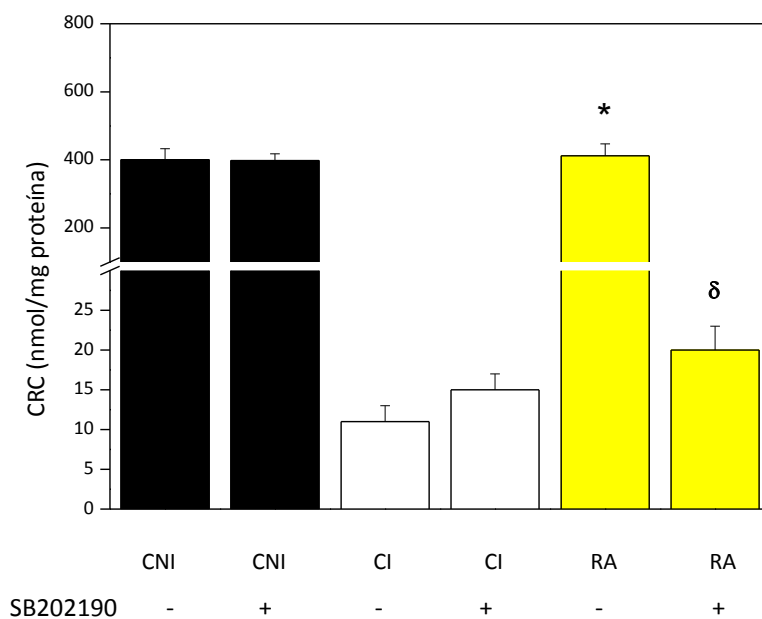


Figura 70: Capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), expresado en nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, en los grupos CNI (n = 7), CI (n = 8) y RA (n = 8), en presencia y en ausencia de SB202190. * p < 0.05 vs. CI; δ p < 0.05 vs. RA

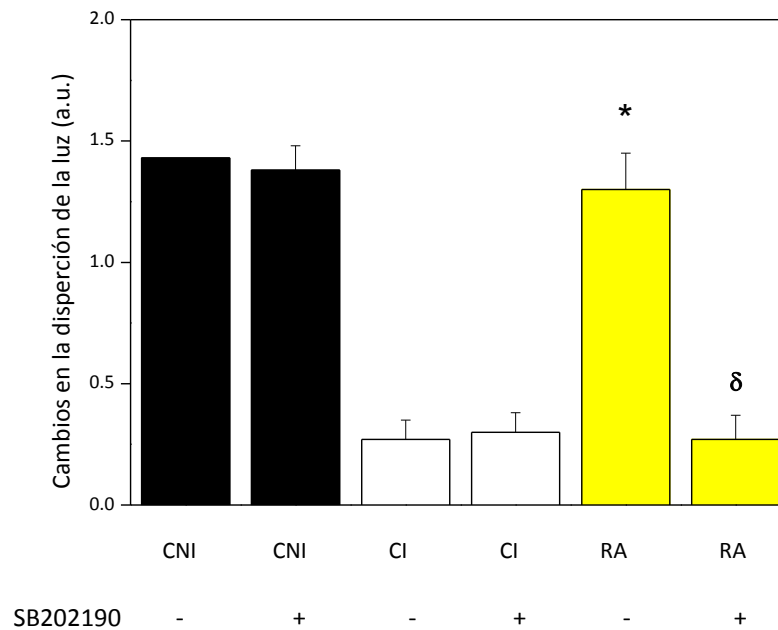


Figura 71: Cambios en la dispersión de la luz, expresados en unidades arbitrarias (a.u.), en los grupos CNI (n = 7), CI (n = 8) y RA (n = 8), en presencia y en ausencia de SB202190.

4. Expresión de P-p38MAPK

La expresión de la forma fosforilada de la p38MAPK con respecto a la p38MAPK total (P38MAPK/p38MAPK) en los grupos tratados con SB202190 sólo se modificó en aquellos corazones tratados con RA. De esta forma, en el grupo RA + SB202190 el contenido de P-p38MAPK disminuyó hasta el valor de 60 ± 6 % (Figura 72).

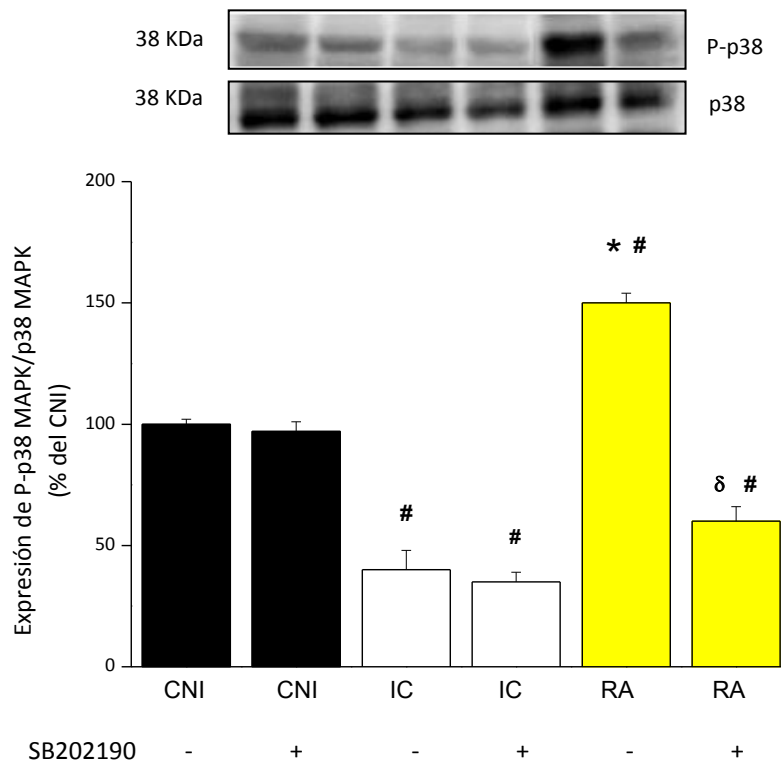


Figura 72: Expresión de fosfo-p38MAPK con respecto a la p38MAPK total (P-p38MAPK/p38 MAPK), expresada como porcentaje del valor obtenido en CNI (n=6), en los grupos CI (n=7) y RA (n=7), en presencia y ausencia de SB2021910. # p < 0,05 con respecto a CNI; * p < 0.05 con respecto a CI; δ p < 0,05 con respecto a RA.

Por lo tanto, la inhibición de p38MAPK en el grupo de reperfusión ácida produjo:

- **Aumento del tamaño del infarto**
- **Disminución de la recuperación postisquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas**
- **Despolarización mitocondrial**
- **Disminución de la capacidad de retención de Ca^{2+}**
- **Reducción de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}**

Estos resultados indican que los efectos miocárdicos y mitocondriales beneficiosos producidos por la reperfusión temprana con una solución de pH ácido son dependientes de la fosforilación/activación de p38MAPK.

4.5 EXPRESIÓN DE CALCINEURINA A β

En la Figura 73 se muestran los datos promedios de la expresión de calcineurina A β en todos los grupos experimentales. En los grupos CI y S se observó un aumento significativo del contenido de calcineurina con respecto al observado en los corazones no isquémicos ($121 \pm 2 \%$ y $120 \pm 2 \%$, respectivamente). El tratamiento con a-L3, BZ, ETX y en la RA disminuyó significativamente la expresión de calcineurina ($92 \pm 7 \%$, $95 \pm 5 \%$, 96 ± 8 , $94 \pm 6\%$, respectivamente). Este efecto fue anulado cuando las intervenciones se realizaron en presencia de SB202190, inhibidor de p38MAPK.

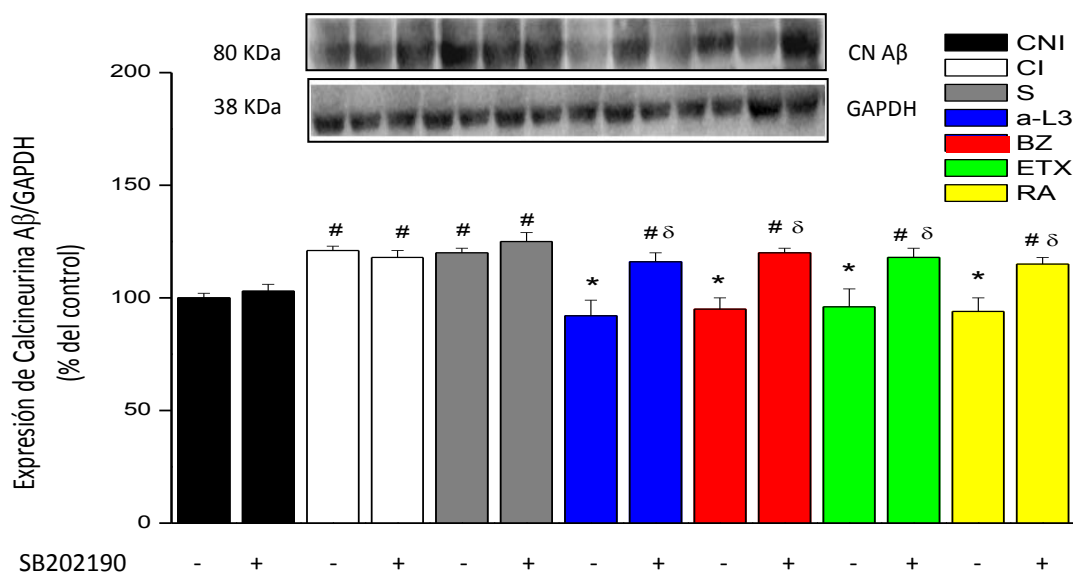


Figura 73: Expresión de calcineurina A β con respecto a GAPDH (calcineurina A β /GAPDH), expresada como porcentaje del valor obtenido en CNI (n=6), en los grupos CNI, CI (7), S (6) a-L3 (7), BZ (8), ETX (7) y RA (7), en presencia y ausencia de SB202190. # p < 0,05 con respecto a CNI; * p < 0,05 con respecto a CI; δ p < 0,05 con respecto a a-L3, BZ, ETX y RA.

De acuerdo a estos resultados, el tratamiento al inicio de la reperusión con a-L3, BZ, ETX o una solución ácida reduce la expresión de calcineurina A β , efecto que fue significativamente atenuado cuando la p38MAPK fue inhibida con SB202190.

4.6 EXPRESIÓN DE P-HSP27

En los grupos CI y S la expresión de HSP27 fosforilada (P-HSP27) disminuyó significativamente con respecto al contenido observado en los corazones controles no isquémicos. Los valores fueron $76 \pm 5 \%$ y $77 \pm 4 \%$, respectivamente. En los corazones tratados con a-L3, BZ, ETX y RA la expresión de P-HSP27 aumentó llegando a valores de $145 \pm 4 \%$, $141 \pm 3 \%$, $143 \pm 2 \%$ y $155 \pm 5 \%$, respectivamente. Estos valores disminuyeron cuando el tratamiento se realizó en presencia de SB202190, inhibidor de p38MAPK (Figura 74).

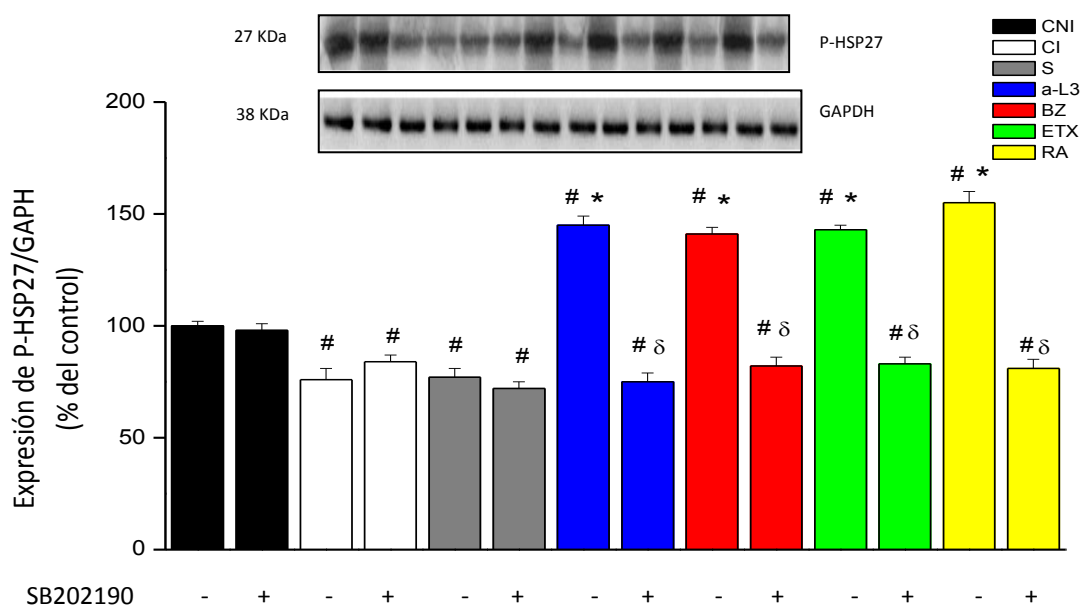


Figura 74: Expresión de fosfo-HSP27 con respecto a GAPDH (P-HSP27/GAPDH), expresada como porcentaje del valor obtenido en CNI, en los grupos CNI, CI (7), S (6) a-L3 (7), BZ (8), ETX (7) y RA (7), en presencia y ausencia de SB202190. # $p < 0,05$ con respecto a CNI; * $p < 0,05$ con respecto a CI; δ $p < 0,05$ con respecto a a-L3, BZ, ETX y RA.

A partir de estos resultados podemos concluir, que el tratamiento al inicio de la reperusión con a-L3, BZ, ETX o una solución ácida aumenta la expresión de P-HSP27. Este aumento fue anulado cuando los tratamientos se realizaron en presencia de SB202190, inhibidor de la p38 MAPK.

4.7 EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN LAS DISTINTAS INTERVENCIONES

Para la evaluación del daño oxidativo se midió el contenido de la primera barrera de defensa antioxidante, el glutatión, en su estado reducido (GSH) y la peroxidación lipídica, la que se estimó a través de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

En la Figura 75 se muestra el contenido miocárdico de GSH. El valor en los corazones del grupo CNI fue de $14 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína y disminuyó en los grupos CI y S a 7 ± 05 y $6,5 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ teína, respectivamente. Ninguna de las intervenciones logró preservar los niveles de GSH, siendo los valores 7 ± 2 ; 6 ± 1 ; 6 ± 2 y 7 ± 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína para los grupos a-L3, BZ, ETX y RA, respectivamente.

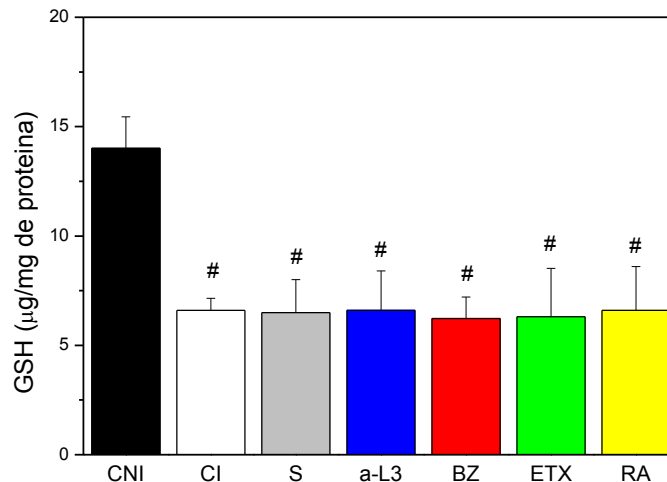


Figura 75: Contenido de glutatión reducido (GSH), expresado en μg por mg de proteína, en los grupos CNI, CI, S, a-L3, BZ, ETX y RA ($n = 7$ para cada grupo). # $p < 0,05$ con respecto a CNI

Los valores medios de TBARS en homogenatos de miocardio se muestran en la Figura 76. En el grupo CNI fue $0,26 \pm 0,08$ nmol/mg proteína, aumentó significativamente en los grupos CI y S ($0,75 \pm 0,09$ y $0,63 \pm 0,08$ nmol/mg proteína, respectivamente) y no se modificó por ninguna de las intervenciones. Los valores fueron $0,6 \pm 0,07$; $0,69 \pm 0,07$; $0,62 \pm 0,05$ y $0,64 \pm 0,09$ nmoles/mg proteína en los grupos a-L3, BZ, ETX y RA, respectivamente.

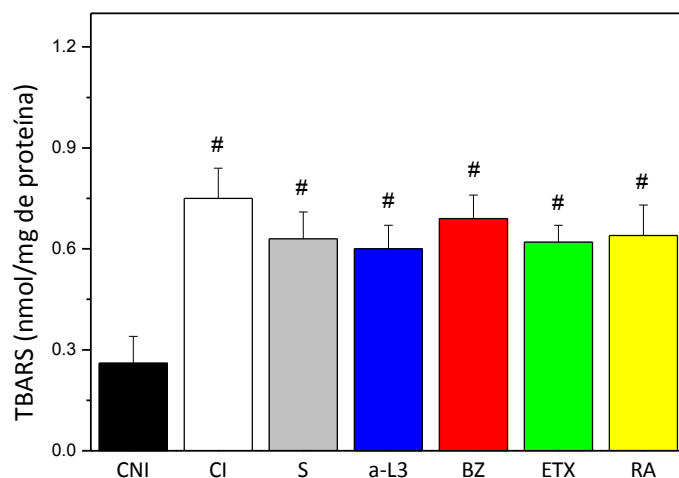


Figura 76: Concentración de TBARS, expresada en nmoles/ mg de proteína, en los grupos CNI, CI, S, a-L3, BZ, ETZ y RA (n = 7 para cada grupo). # p< 0,05 con respecto a CNI

De acuerdo a estos resultados, el tratamiento al inicio de la reperfusión con a-L3, BZ, ETX o una solución ácida no produce cambios significativos en los parámetros aquí usados como indicadores del daño oxidativo producido por la isquemia-reperfusión.

4. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis demuestra que, en corazones aislados de rata, el bloqueo del bucle extracelular 3 del NBCe1 con un anticuerpo (a-L3) y la inhibición de la AC con benzolamida (BZ) al inicio de la reperfusión o con etoxizolamida (ETX) al final de la estabilización y al principio de la reperfusión, protegen al miocardio contra las alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión. En esta investigación también mostramos que estos tratamientos mimetizan los efectos beneficiosos de la administración de una solución ácida al comienzo de la reperfusión, intervención llamada "reperfusión ácida" (RA).

Nuestros resultados mostraron que después de 30 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión el tamaño del infarto fue aproximadamente 30 % disminuyendo hasta valores entre 5 % y 12 % en los corazones tratados con a-L3, BZ, ETX o RA.

La recuperación post-isquémica de la función miocárdica también mostró grandes cambios ante las intervenciones. Así, la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, uno de los parámetros utilizados para evaluar la función sistólica, pasó de un valor de aproximadamente 20 % a 60 %, indicando una mejora significativa de la contractilidad miocárdica. De igual manera, la presión diastólica final, como índice de rigidez miocárdica, disminuyó marcadamente (alrededor de un 50 %) en los corazones isquémicos tratados en comparación a los no tratados. Es decir, la función cardíaca post-isquemia mejoró significativamente en presencia de los bloqueantes utilizados y en la RA comparada con la observada en los corazones no tratados. Estos resultados están de acuerdo con datos previos obtenidos en nuestro laboratorio utilizando a-L3 en un modelo "ex vivo" de oclusión aguda (Fantinelli y col., 2014.) y BZ y ETX en un modelo "in vivo" de oclusión sostenida de una arteria coronaria (Vargas y col., 2016). En estos trabajos se demostró que a-L3 disminuyó el tamaño del infarto y aumentó la recuperación post-isquémica de la función miocárdica y que el tratamiento con BZ o ETX mejoró la función cardíaca, limitó la fibrosis intersticial y previno el remodelamiento del ventrículo izquierdo. Resultados similares obtuvimos por la administración de una solución ácida al inicio de la reperfusión. Estos datos coinciden con los mostrados por estudios previos que señalan el papel beneficioso de una reperfusión ácida breve (Qiao y col., 2013), así como los efectos perjudiciales de una solución de reperfusión básica (Queliconi y col., 2016). La protección similar observada entre las intervenciones y la RA sugiere que el bloqueo del NBCe1 con a-L3 y la inhibición de AC con BZ o con ETX al inicio de la reperfusión estarían prolongando las condiciones ácidas generadas durante la isquemia. Esta especulación es apoyada por observaciones previas realizadas en corazones aislados de hurón (Vandenberg y col., 1996) y por experimentos recientes en músculos papilares de ventrículo izquierdo de rata (Ciocci

Pardo y col., 2017), los que demuestran que la inhibición de CA lleva a un retraso de la recuperación del pH_i, manteniéndose un estado acidótico.

La pregunta que surge es: ¿cuáles son los efectos que ocurren cuando la acidosis isquémica se prolonga en la reperfusión? Durante la isquemia prevalece el metabolismo anaeróbico y se produce una disminución en el pH_i. Para amortiguar esta acumulación de H⁺ se activan los mecanismos alcalinizantes (NHE y NBC) que sacan el exceso de estos iones al espacio extracelular y provocan la entrada de Na⁺ al intracelular, aumentando su concentración (Sanada y col., 2011). Los dos transportadores se unen a la enzima citosólica CAII y forman un metabolón de transporte. La actividad catalítica de CAII ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) produce HCO₃⁻ para influjo y H⁺ para eflujo por NBC y NHE, respectivamente. Además, NBC se une al grupo anclado a la CAIV y a la CAIX. Este aumento de Na⁺ activa el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y se produce la sobrecarga de Ca²⁺. La isquemia también agota el ATP celular que inactiva las ATPasas (por ejemplo, Na⁺/K⁺ ATPasa), reduce el flujo de Ca²⁺ activo y limita la recaptación de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico, procesos que contribuyen al aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺. Durante la reperfusión, se restablece el pH extracelular, se crea un gradiente de H⁺ que produce la reactivación del NHE y NBC y aumenta la sobrecarga intracelular de Na⁺ y Ca²⁺. Por lo tanto, retrasar la normalización del pH_i o mantener un pH bajo en un período breve de la reperfusión protege al corazón (Inserte y col., 2011a; Inserte y col., 2011b) y mantiene favorablemente la homeostasis catiónica como lo demuestra la reducción de la sobrecarga intracelular de Na⁺ y Ca²⁺ (Panagiotopoulos y col., 1990). Es decir, que en nuestras condiciones experimentales, el mantenimiento del pH ácido de la isquemia al inicio de la reperfusión por los tratamientos con a-L3, BZ o ETX disminuiría la concentración intracelular de Na⁺ y Ca²⁺.

La preservación de la función mitocondrial después de la isquemia-reperfusión es fundamental para la supervivencia del miocardio (Heusch y col., 2008). La sobrecarga de Ca²⁺, la generación de EROs y la interacción entre ambos son los factores responsables de las alteraciones miocárdicas y mitocondriales por isquemia-reperfusión más importantes. La sobrecarga de Ca²⁺, producida por la reactivación de los transportadores ya descritos (NHE y NBC) (Vaughan-Jones y col., 2006), interacciona con los principales sistemas de generación de EROs (cadena de transporte de electrones y las NADPH oxidasas) y a su vez las EROs modulan la actividad de diferentes canales de Ca²⁺, bombas e intercambiadores (Görlach y col., 2015). Ambos factores (sobrecarga de Ca²⁺ y EROs) participan en la formación y apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PPTM). Cabe recordar que en los primeros minutos de la reperfusión se produce la apertura del

PPTM. Este poro, de naturaleza inespecífica, permite el paso de moléculas de hasta 1.5 kDa. Consecuencias inmediatas de la apertura de este canal son la despolarización, el cese de la síntesis de ATP, la liberación de Ca^{2+} , la depleción de nucleótidos de piridina y la inhibición de la respiración, edematización y ruptura de la membrana mitocondrial externa e incluso de la membrana mitocondrial interna. Esto genera finalmente la liberación de proteínas proapoptóticas como el citocromo c, la endonucleasa G y el factor inductor de apoptosis (Bernardi P y col., 2006; Rasola A y Bernardi P, 2011).

La apertura irreversible del PPTM produce un colapso del potencial de membrana mitocondrial acompañado por el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, hinchazón de la organela y liberación de factores involucrados en la muerte celular (Heusch y col., 2010). La alteración contráctil post-isquémica se correlaciona con el grado de apertura del PPTM y la inhibición del PPTM proporciona protección (Halestrap y col., 2004). En nuestras condiciones experimentales, los tratamientos no modificaron el daño oxidativo provocado por la isquemia-reperusión. En corazones isquémicos no tratados, la peroxidación lipídica, estimada por los valores de TBARS, aumentó mientras que el contenido de la primera barrera de defensa antioxidante, el glutatión, en su forma reducida (GSH) disminuyó al final de los 60 minutos de la reperusión. En corazones tratados con a-L3, BZ, ETX o RA estos parámetros no se modificaron. O sea que, en nuestras condiciones experimentales, la homeostasis del Ca^{2+} parece tener un papel más preponderante.

Para ver la incidencia de las intervenciones sobre el estado mitocondrial evaluamos el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), la capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) y la sensibilidad de las mitocondrias al agregado de Ca^{2+} . En los corazones controles isquémicos observamos un deterioro mitocondrial puesto de manifiesto en un importante grado de despolarización ($\Delta\Psi\text{m}$) y una menor capacidad para almacenar Ca^{2+} , así como una respuesta reducida a este ion.

Encontramos que el bloqueo del bucle extracelular 3 del NBCe1 de la AC con BZ o ETZ, mejoró significativamente el estado de las mitocondrias. Específicamente, el $\Delta\Psi\text{m}$ se conservó mientras que la CRC y la ΔDL aumentaron con respecto al CI.

Al igual que para el tamaño del infarto y la función miocárdica post-isquémica, evaluamos el estado mitocondrial en el grupo RA. De forma consistente con los datos de a-L3, BZ y ETZ, el protocolo de RA preservó el estado de las mitocondrias, encontrando diferencias en todos los parámetros cuando se los comparó con el CI.

Las vías de señalización intracelulares tienen una gran importancia en los diferentes mecanismos cardioprotectores siendo las MAPK parte de estas cascadas de señalización (Armstrong y col., 2004; Widmann et al., 1999). Una de las MAPK quinasas cuya participación en la isquemia-reperfusión es discutida es la p38. Algunos estudios muestran que la activación de p38MAPK es cardioprotectora (Nakano y col., 2000; Martin y col., 2001; Maulik y col., 2001), mientras que otros demuestran que la inhibición de dicha quinasa protege al miocardio contra la injuria por isquemia-reperfusión (Mackay y col., 2000; Gysembergh y col., 2001; Schneider y col., 2001). Nuestros datos mostraron que la fosforilación de p38MAPK (P-p38MAPK) en los corazones controles isquémicos y a los 60 minutos de la perfusión disminuye alcanzando un valor de aproximadamente 40 %. Sin embargo, cuando los corazones se perfunden al inicio de la perfusión con a-L3, BZ, ETX o solución ácida el contenido de P-p38MAPK aumenta hasta un 150 %. Estos resultados indicarían que la p38MAPK cumple un rol protector en nuestro modelo experimental. Esta participación quedó confirmada cuando al bloquear dicha quinasa con el inhibidor SB202190 los efectos beneficiosos de a-L3, BZ y RA fueron anulados. Es decir, que los corazones tratados con a-L3, BZ o RA más SB202190 no mostraron ninguna protección, evidenciada por un tamaño de infarto, una recuperación post-isquémica de la función miocárdica y un estado mitocondrial semejantes a los observados en los corazones controles isquémicos. Sin embargo, al analizar los datos de ETX + SB202190, encontramos que el bloqueo de p38MAPK redujo significativamente los efectos protectores de ETX, pero aún siguen siendo diferentes de los del grupo isquémico no tratado. ¿Cuál podría ser la razón de las diferencias en la inhibición de p38MAPK en BZ y ETX? En principio diremos que BZ y ETX poseen características farmacológicas distintas, ya que BZ a la concentración usada en este trabajo de tesis (5 μ M) no atraviesa las membranas plasmáticas, mientras que ETX sí lo hace. Al ser la ETX permeable, es posible que se estén activando otras vías de señalización, por lo cual el bloqueo de la p38-MAPK resultaría insuficiente para revertir completamente el efecto cardioprotector.

La pregunta que sigue es: ¿Cuál es la señal que activa la p38MAPK en presencia de los tratamientos? Previamente se demostró que la acidificación intracelular, independientemente de los cambios del pH extracelular, activa a la p38MAPK (Zheng y col, 2005). Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, el mantenimiento de la acidosis isquémica durante los primeros minutos de la perfusión podría explicar el aumento en el nivel de P-p38MAPK detectado en todas las intervenciones. El hecho de que este aumento también fue observado en la RA podría colocar al pH ácido como la etapa inicial de la cascada cardioprotectora.

Recordemos que el mantenimiento del pH ácido ante una disminución de la actividad de los mecanismos alcalinizantes llevaría a una disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} y a una atenuación de las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} . La calcineurina es una fosfatasa serina/treonina activada por Ca^{2+} /calmodulina que aumenta durante la isquemia-reperfusión (Lakshmikuttyamma y col., 2003) y que participa en la inactivación de p38MAPK (Lim y col., 2001). Por lo tanto, podríamos especular que el aumento de P-p38MAPK inducido por a-L3, BZ, ETX y RA podría resultar de la inactivación de la calcineurina en respuesta a la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Los datos obtenidos aquí ponen en evidencia esta hipótesis ya que detectamos un aumento del contenido de calcineurina en los corazones controles isquémicos (alto Ca^{2+}) y una menor expresión en los corazones tratados con a-L3, BZ, ETX o RA (Ca^{2+} más bajo).

Ahora la pregunta es: ¿Cuáles son las acciones mediadas por la p38MAPK responsables de la cardioprotección? Las vías de transducción de señales aguas abajo de p38MAPK implican la activación de proteínas activadas por MAP quinasas (MAPKAP) que fosforilan a varios miembros de la familia de proteínas de pequeño choque térmico, como la proteína de choque térmico 27-kDa (HSP27) (Rouse y col., 1994). En este estudio, demostramos que la fosforilación de HSP27 (P-HSP27) disminuyó en los corazones controles isquémicos y aumentó en los corazones tratados con a-L3, BZ, ETX y RA, efecto que fue anulado cuando se inhibió la p38MAPK con SB202190. Estos datos demuestran que la fosforilación de HSP27 depende de la activación de p38MAPK y podría considerarse como el posible punto final para explicar las acciones cardioprotectoras de las intervenciones aquí ensayadas.

Con respecto a las acciones mediadas por HSP27, trabajos previos demostraron que esta proteína actúa como chaperona, interactúa con proteínas en la membrana mitocondrial externa, específicamente con uno o más componentes del PPTM, evitando o atenuando los cambios de $\Delta\Psi_m$ y la vía extrínseca de la apoptosis (Tan y col., 2009).

Otro posible blanco de la p38MAPK es el uniporter de Ca^{2+} mitocondrial, disminuyendo la entrada de este ion a la mitocondria y evitando la sobrecarga de Ca^{2+} en dicha organela (Koncz y col., 2009). Este mecanismo podría estar contribuyendo a la cardioprotección mediada por la p38MAPK.

4. CONCLUSIONES

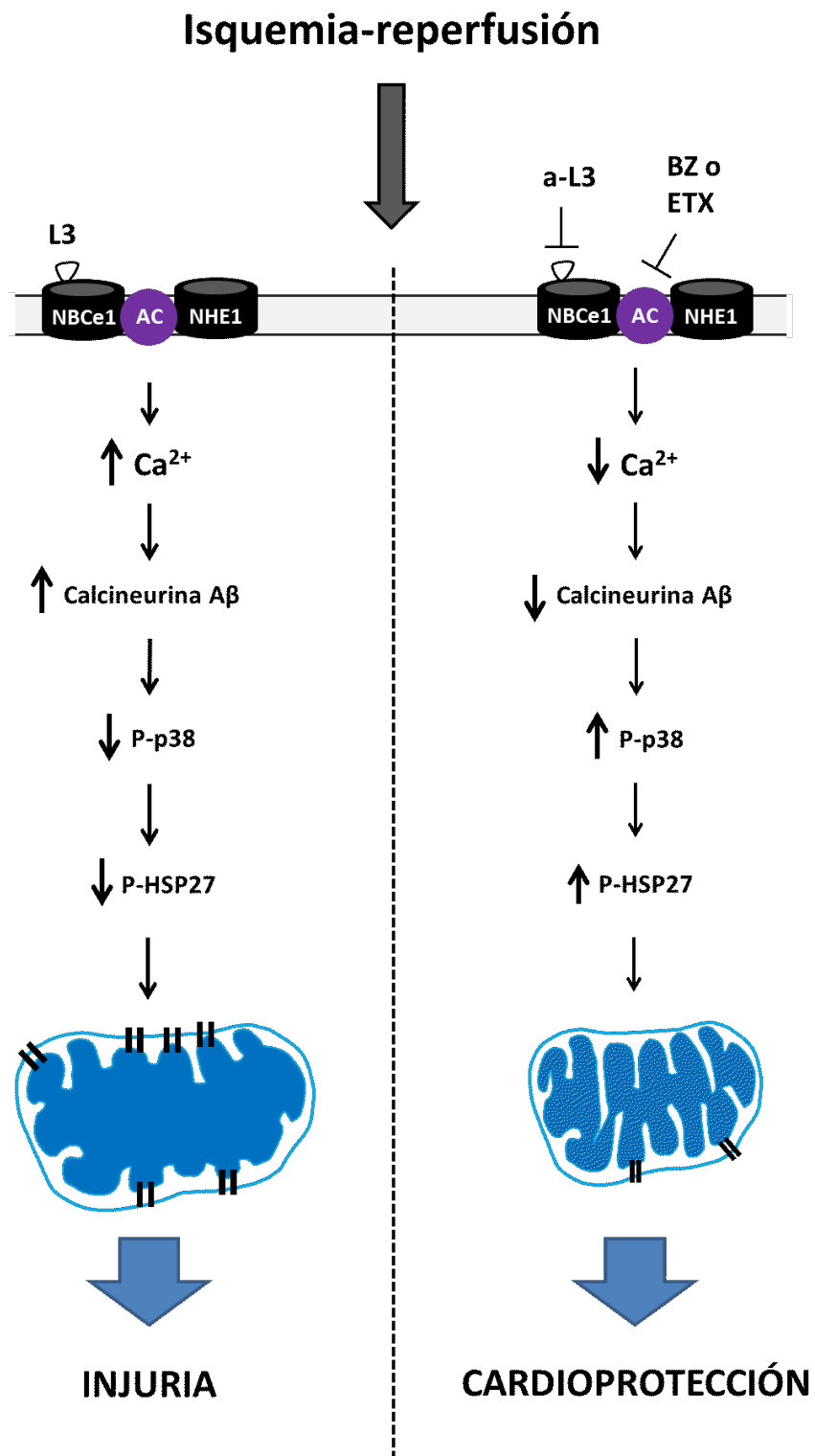
En este trabajo de Tesis demostramos que el tratamiento de corazones aislados y perfundidos a través del sistema de Langendorff con **un anticuerpo contra el bucle extracelular 3 (α -L3) de la isoforma 1 del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico (NBCe1)** o con **benzalamida (BZ) o etoxizolamida (ETX) como inhibidores de la anhidrasa carbónica**, con una **solución ácida (RA)**, produjo:

- Disminución del tamaño del infarto
- Aumento de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas
- Reducción de la despolarización mitocondrial
- Aumento de la capacidad de retención de Ca^{2+}
- Recuperación de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}
- Aumento de la fosforilación de p38MAPK
- Disminución de la expresión /actividad de calcineurina
- Aumento de la fosforilación de HSP27

La inhibición de p38MAPK con SB202190 en los grupos tratados con α -L3, BZ, ETX o RA anuló los efectos beneficiosos descriptos antes. Se observó:

- Aumento del tamaño del infarto
- Disminución de la recuperación post-isquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas
- Despolarización mitocondrial
- Disminución de la capacidad de retención de Ca^{2+}
- Reducción de la sensibilidad de respuesta mitocondrial al Ca^{2+}
- Aumento de la expresión /actividad de calcineurina
- Disminución de la fosforilación de HSP27

Todos los resultados presentados demuestran que las intervenciones aquí aplicadas a corazones aislados de ratas Wistar, protegen al miocardio contra las alteraciones producidas por 30 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión. El efecto cardioprotector se vio reflejado en una reducción del tamaño del infarto, una mejora de la función miocárdica y una preservación del estado mitocondrial en la reperfusión. Estos datos indican que una reducción en la sobrecarga de Ca^{2+} , consecuente a una actividad reducida de los mecanismos alcalinizantes, podría producir una menor activación de calcineurina y una activación de la vía p38MAPK-HSP27 que llevaría a la mejora del estado mitocondrial, blanco final de la cardioprotección.



Esquema representativo de los mecanismos involucrados en la cardioprotección obtenida por el bloqueo del bucle extracelular 3 (a-L3) del NBCe1, las AC o la perfusión ácida (RA).

Publicaciones derivadas del presente trabajo de tesis:

Revistas

Ciocci Pardo A, Díaz RG, González Arbeláez LF, Pérez NG, Swenson RS, Mosca SM, Álvarez. Benzolamide perpetuates acidic conditions during reperfusion and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury. December 2017 Journal of Applied Physiology. DOI10.1152/japplphysiol.00957.2017

Congresos

Ciocci Pardo A, González Arbeláez LF, Álvarez BV, Mosca SM. 6-Ethoxyzolamide protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. Sociedad Argentina de Fisiología, 2017

Ciocci Pardo A; González Arbeláez LF; Aiello A; Álvarez BV; Mosca SM. Role of p38mapk on the effects of $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ Co-transporter and carbonic anhydrase blockade on mitochondrial postischemic alterations: comparison to acid reperfusion. 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences at the Riocentro Convention Center in Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 2017.

Ciocci Pardo A, Gonzalez Arbeláez LF, Fantinelli JC, Mosca SM. La reperfusion ácida disminuye el tamaño de infarto en el corazón aislado de rata: quinasas involucradas. Sociedad Argentina de Fisiología, 2016

Ciocci Pardo A, Gonzalez Arbeláez LF, Fantinelli JC, Díaz RG, Álvarez BV, Mosca SM. Carbonic anhydrase inhibition by benzolamide attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via p38MAPK-dependent mechanism. International Society for Heart Research, World Congress Annual Meeting, 2016.

Ciocci Pardo A, Gonzalez Arbeláez LF, Aiello EA, Mosca SM. La inhibición de la isorfoma 1 del co-transportador electrogénico $\text{Na}^+/\text{CO}_3\text{H}^-$ (NBCe1) durante la reperfusión reduce el tamaño

de infarto y mejora el estado mitocondrial. LX reunion anual de la Sociedad Argentina de Fisiología y de la Sociedad de Investigación Clínica, 2015.

Bibliografía

- Aiello EA, Petroff MG, Mattiazzi AR, Cingolani HE (1998). Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 512 (Pt 1): p. 137-48.
- Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznarski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA Jr, Jonas EA (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:10580–10585.
- Álvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Markovich D, Casey JR (2004). Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloridebicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol*, 561: 721-34.
- Alvarez BV, Quon AL, Mullen J, Casey JR (2013) Quantification of carbonic anhydrase gene expression in ventricle of hypertrophic and failing human heart. *BMC Cardiovasc. Disord.* 8;13:2.
- Armstrong SC (2004). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 61: 427-436.
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* 377(Pt 2):347-355.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 434:658-662.
- Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F (2006). The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. *FEBS J.* 273:2077-2099.
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* 9:550-555.
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011). Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 50(6):940-50.
- Carraro M, Giorgio V, Šileikyte J, Sartori G, Forte M, Lippe G, Zoratti M, Szabó I, Bernardi P. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition (2014). *J. Biol. Chem.* 289:15980–15985.
- Bernardi P (1992). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 267:8834-8839.
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79:763-854.
- Boron, WF, Boulpaep EL (1983). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO₃⁻ transport. *J. Gen. Physiol.* 81(1):53-94.
- Boron, WF (2006). Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17(9):p. 2368-82.
- Boron, WF, Chen L, Parker MD (2009). Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *J. Exp. Biol.* 212:1697-706.

- Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Kettermann AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH (1996). Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart: p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* 79:62-173.
- Bolli R (1990). Mechanism of myocardial stunning. *Circ.* 82(3):723-738.
- Burnham C, Amlal H, Wang Z, Shull GE, Soleimani M (1997). Cloning and functional expression of a human kidney $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter. *J. Biol. Chem.* 272(31):19111-4.
- Carraro M, Giorgio V, Sileikyte J, Sartori G, Forte M, Lippe G, Zoratti M, Szabó I, Bernardi P (2014). Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 289:15980-15985.
- Choi I, Aalkjaer C, Boulpaep EL, Boron WF (2000). An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel. *Nature* 405(6786):571-5.
- Ciucci Pardo A, Díaz RG, González Arbeláez LF, Pérez NG, Swenson ER, Mosca SM, Alvarez BV (2018). Benzolamide perpetuates acidic conditions during reperfusion and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Appl. Physiol.* 125(2):340-352.
- Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P (1995). Selective inhibition of the mitochondrial permeability transition pore at the oxidation-reduction sensitive dithiol by monobromobimane. *FEBS Lett.* 362:239-42.
- Crompton M, Costi A, Hayat L (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* 245:915-8.
- Cohen MV, Downey JM (2015). Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *British Journal of Pharmacology* 172:1913-1932.
- De Giusti VC, Orlowski A, Villa-Abrille MC, Cingolani GE, Casey JR, Alvarez BV, Aiello EA (2011). Antibodies against the cardiac sodium/bicarbonate co-transporter (NBCe1) as pharmacological tools. *Br. J. Pharmacol.* 164(8):1976-89.
- Dodgson SJ (1991). Why are there carbonic anhydrases in the liver? *Biochem. Cell Biol.* 69(12):61-3.
- Downey JM, Cohen MV (2006). Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 48(5): 363-371.
- Datler C, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Chaisaklert W, Hwang MS, Osborne F, Grimm S (2014). CKMT1 regulates the mitochondrial permeability transition pore in a process that provides evidence for alternative forms of the complex. *J Cell Sci.* 127(Pt 8):1816-28.
- Dedkova LA (2008). Bladder Calcium signaling in cardiac mitochondria. *Elena N. J. Mol. Cell Cardiol.* 58:125-133.
- Seidlmayer EK, Gomez-Garcia MR, Blatter LA, Pavlov E, Dedkova EN (2012). Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.* 139,5: 321-331.

- Esbaugh AJ, Tufts BL (2006). "The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates." *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154(1-2):185-98.
- Fabiato A, Fabiato F (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* 276:233-255.
- Fleming RE, Crouch EC, Ruzicka CA, Sly WS (1993). "Pulmonary carbonic anhydrase IV: developmental regulation and cell-specific expression in the capillary endothelium." *Am. J. Physiol.* 265:L627-35.
- Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G (2009). Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex, *J. Biol. Chem.* 284: 33982-33988
- Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:5887-5892.
- Go YM, Park H, Koval M, Orr M, Reed M, Liang Y, Smith D, Pohl J, Jones DP (2010). A key role for mitochondria in endothelial signaling by plasma cysteine/cystine redox potential. *Free Radic. Biol. Med.* 48:275–283.
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanov O (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 6:260-71.
- Grantham CJ, Cannell MB (1996). Ca²⁺ influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* 79:194-200.
- Granger DN (1999). Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 6:167-178.
- Gross E, Hawkins K, Abuladze N, Pushkin A, Cotton CU, Hopfer U, Kurtz I. (2001). The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBC1 is cell-type dependent. *J Physiol.* 531(3):597-603.
- Gysembergh A, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K (2001). p38 MAPK activity is not increased early during sustained coronary artery occlusion in preconditioned versus control rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33:681–690.
- György S, Duchon MR (2008). Mitochondria: The Hub of Cellular Ca²⁺ Signaling. *Physiology* 23:84-94.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366:79-94.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61(3):372-385.
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2007). Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 12(3-4):217-34.
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2009). Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc. Res.* 15;83(2):179-94.

- Henry, RP (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58:523-38.
- Herrlich P y Böhmer FD. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells (2000). *Biochem Pharmacol.* 1;59(1):35-41.
- Heusch G, Boengler K, Schulz R (2008). Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 118:1915-1919.
- Heusch G, Boengler K, Schulz R (2010). Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic. Res. Cardiol.* 105:151-653. Hüser J, Blatter LA (1999). Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem. J.* 343(2):311-317.
- Inserte J, Barba I, Hernando V, Abellan A, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D (2008). Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc. Res.* 77:782-790.
- Inserte J, Barba I, Poncelas-Nozal M, Hernando V, Agullo L, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D (2011). cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 50:903-909.
- Inserte J, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Barba I, and Garcia-Dorado D (2011). Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection. *Antioxid Redox Signal* 14:923-939.
- Irisawa H, Sato R (1986). Intra- and extracellular actions of proton on the calcium current of isolated guinea pig ventricular cells, *Circ. Res.* vol. 59:348-355.
- Santo-Domingo J, Demareux N (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim. et Biophys Acta.* 1797:907-912.
- Karch J, Kanisicak O, Brody MJ, Sargent MA, Michael DM, Molkentin JD (2015). Necroptosis Interfaces with MOMP and the MPTP in Mediating Cell Death. *PLoS One.* 10(6) doi: [10.1371/journal.pone.0130520]
- Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF (2003). Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. (Heart Circ Physiol).* 284:H566-74.
- Kim SO, Xu Y-J, Katz S, Pelech S (2000). Cyclic GMP-dependent and -independent regulation of MAP kinases by sodium nitroprusside in isolated cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1496:277-284.
- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 97(18):1848-1867.
- Koncz P, Szanda G, Fülöp L, Rajki A, Spät A (2009). Mitochondrial Ca²⁺ uptake is inhibited by a concerted action of p38 MAPK and protein kinase D. *Cell Calcium* 46(2):122-129.
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427:461-465.

- Kvietys PR, Granger DN (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 52:556-592.
- Lagadic-Gossman, D, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD (1992). Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol.* 458:361-84.
- Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kakkar R, Kanthan R, Wang R, Sharma RK (2003). Activation of calcineurin expression in ischemia-reperfused rat heart and in human ischemic myocardium. *J. Cell Biochem.* 1;90(5):987-97.
- Leung AW., Halestrap AP (2008). Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777:946-952.
- Lim HW¹, New L, Han J, Molkentin JD (2001). Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J. Biol Chem.* 11;276(19):15913-9.
- Lindskog S, Nyman PO (1964). "Metal-Binding Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases." *Biochim. Biophys. Acta* 85:462-74.
- Li X, Alvarez B, Casey JR, Reithmeier RA, Fliegel L. (2002). Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 27;277(39):36085-91.
- Mannella CA (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys. Acta.* 1763:542–8.
- Mackay K, Mochly-Rosen D (2000). Involvement of a p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32:1585-1588.
- Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, Lochner A (2001). Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Car. Diol.* 33:769-778.
- Martin JL, Avkiran M, Quinlan RA, Cohen P, Marber MS (2001). Anti-ischemic effects of SB203580 are mediated through the inhibition of p38 α mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.* 89:750-752.
- Maulik N, Watanabe M, Zu Y-L, Huang C-K, Cordis GA, Schley JA, Das DK (1996). Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Letters* 396:233-237.
- Michel MC, Li Y, Heusch G (2001). Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363:245-266.
- Miles EW, Rhee S, Davies DR (1999). "The molecular basis of substrate channeling." *J. Biol. Chem.* 274(18):12193-6.
- Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM (2000). The p38 MAPK inhibitor, SB 203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Bas. Res. Cardiol.* 95:472-478.
- Müller-Berger S, Ducoudret O, Diakov A, Frömter E (2001). The renal Na-HCO₃-cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes: change in stoichiometry in response to elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Pflugers Arch.* 442(5):718-28.
- Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C (1991). Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ. Res.* 68:1250-1258.

- Murphy E, Steenbergen C (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* 88:581–609.
- Nakano A, Baines CP, Kim SO, Pelech SL, Downey JM, Cohen MV, Critz SD (2000). Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart. Evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ. Res.* 86:144-151.
- Negróni JA, Lascano EC, Depaoli JR (1982). Sensitivity of enzymatic release due to ischemia in the isolated heart. *Acta ohysiol. Latinoam.*, 32:303-311.
- Nicholls DG, Ward MW (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends. Neurosci.* 23:166-174.
- Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry* 32:4461-4465.
- Niederer SA, Swietach P, Wilson DA, Smith NP, Vaughan-Jones RD (2008). Measuring and modeling chloride-hydroxyl exchange in the Guinea-pig ventricular myocyte. *Biophys J.* 94(6):2385-403.
- Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle, *Am. J. Physiol.* 1990, 258:C967-C981.
- Orlowski J, Grinstein S (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 447(5):549-65.
- Okuyama T, Sato S, Zhu XL, Waheed A, Sly WS (1992). "Human carbonic anhydrase IV: cDNA cloning, sequence comparison, and expression in COS cell membranes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(4):1315-9.
- Pagliaro P, Femminò S, Popara J, Penna C (2018). Mitochondria in Cardiac Postconditioning. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00287>.
- Panagiotopoulos S, Daly MJ, Nayler WG (1990). Effect of acidosis and alkalosis on postischemic Ca²⁺ gain in isolated rat heart. *Am. J. Physiol.* 258:H821-828.
- Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* 76:725-734.
- Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F (2001). The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J. Biol. Chem.* 276:12030-12034.
- Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY (1982). Effects of pH on Na⁺–Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ. Res.* 50:287-293.
- Purkerson JM, Schwartz GJ (2005). Expression of membrane-associated carbonic anhydrase isoforms IV, IX, XII, and XIV in the rabbit: induction of CA IV and IX during maturation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288(5):R1256-63.

- Qiao X, Xu J, Yang QJ, Du Y, Lei S, Liu ZH, Liu X, Liu H (2013). Transient acidosis during early reperfusion attenuates myocardium ischemia reperfusion injury via PI3k-Akt-eNOS signaling pathway. *Oxid. Med. Cell Longev* .126083.
- Queliconi BB, Kowaltowski AJ, Gottlieb RA (2016). Bicarbonate Increases Ischemia-Reperfusion Damage by Inhibiting Mitophagy. *PLoS One* 11: e0167678, 201648.
- Raedschelders K, Ansley DM, Chen DDY (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.* 133:230-255.
- Rasola A, Bernardi P (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50:222-233.
- Reithmeier RA (2001). "A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers." *Blood Cells Mol. Dis.* 27(1):85-9.
- Romero MF, Fong P, Berger UV, Hediger MA, Boron WF (1998). Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na^{+} - HCO_3^{-} cotransporter from rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274(2 Pt 2):F425-32.
- Romero MF, Fulton CM, Boron WF (2004). The SLC4 family of HCO_3^{-} transporters. *Pflügers Arch.* 447(5):495-509.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78:1027-1037.
- Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2):320-44.
- Sanada S, Komuro I, Kitakaze M (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *Am. J. Physiol.* 301:H1723-H1741.
- Scheibe RJ, Gros G, Parkkila S, Waheed A, Grubb JH, Shah GN, Sly WS, Wetzel P (2006). "Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart." *J. Histochem. Cytochem.* 54(12):1379-91.
- Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E (2001). Inhibition of p38MAPK α/β reduces ischemicinjury and does not block protectiveeffects of preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 280:H499–H508.
- Sciortino CM, Romero MF (1990). Cation and voltage dependence of rat kidney electrogenic Na^{+} - HCO_3^{-} (3) cotransporter, rkNBC, expressed in oocytes. *Am. J. Physiol.* 277(4 Pt 2):F611-23.
- Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, Hanatani A, Kim S, Takeuchi K, Iwao H, Yoshikawa J (1998) Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 38: 116–124
- Sies H (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H., editor. *Oxidative Stress*. London:Academic press. p.1-8.
- Šileikyte J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F (2014). Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (translocator protein of 18 kDa (TSPO)). *J. Biol. Chem.* 289:13769-13781.

- Sly W S, Hu (1995). "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies." *Annu Rev Biochem* 64:375-401.
- Srere PA (1987). "Complexes of sequential metabolic enzymes." *Annu. Rev. Biochem.* 56:89-124.
- Sterling D, Reithmeier RA, Casey JR (2001). "A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers." *J. Biol. Chem.* 276(51):47886-94.
- Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E (2006). Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca^{2+} channel α_1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 98:403-411.
- Tan CY, Ban H, Kim YH, Lee SK (2009). The heat shock protein 27 (Hsp27) operates predominantly by blocking the mitochondrial-independent/extrinsic pathway of cellular apoptosis. *Mol. Cells* 27:533-538.
- Tatishchev S, Abuladze N, Pushkin A, Newman D, Liu W, Weeks D, Sachs G, Kurtz I (2003) Identification of membrane topography of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter pNBC1 by in vitro transcription/translation. *Biochemistry* 42(3):755-65.
- Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA (1993). Mechanisms of pH_i recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circ. Res.* 72:993–1003.
- Vandenberg JI, Carter ND, Bethell HW, Nogradi A, Ridderstrale Y, Metcalfe JC, Grace AA (2016). Carbonic anhydrase and cardiac pH regulation. *Am. J Physiol.* 271:C1838-1846.
- Vargas LA, Pinilla OA, Díaz RG, Sepúlveda DE, Swenson ER, Pérez NG, Álvarez BV (2016). Carbonic anhydrase inhibitors reduce cardiac dysfunction after sustained coronary artery ligation in rats. *Cardiovasc Pathol.* 25(6):468-477.
- Vassalli G, Milano G, Moccetti T (2012). Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury during Heart Transplantation. *Journal of Transplantation. Heart Fail.* 12(3-4):217-34.
- Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P (2009). Intracellular pH regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol.* 46(3):318-31.
- Villa-Abrille MC, Petroff MG, Aiello EA (2007). The electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport modulates resting membrane potential and action potential duration in cat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 578(3):819-29.
- Von Stockum S, Giorgio V, Trevisan E, Lippe G, Glick GD, Forte MA, Da-Rè C, Checchetto V, Mazzotta G, Costa R, Szabò I, Bernardi P (2015). F-ATPase of *D. melanogaster* forms 53 picosiemen (53-pS) channels responsible for mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *J. Biol. Chem.* 290:4537-4544.
- Waheed A, Zhu XL, Sly WS (1992). "Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung Purification characterization, tissue distribution and comparison with carbonic anhydrase IVs of other mammals." *J. Biol. Chem.* 267:3308-3311.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999). Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79:143-180.

- Yellon DM, Baxter GF (2000). Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 83(4): 381-387.
- Yellon DM, Hausenloy DJ (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357(11):1121-35.
- Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai R, Whelan J (1997). Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J. Biol. Chem.* 272:19943-19950
- Zamzami N, Kroemer G (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:67-71.
- Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Pike BR, Hayes RL (1998). pH dependency of mu-calpain and m-calpain activity assayed by casein zymography following traumatic brain injury in the rat, *Neurosci. Lett.* 247:53-57.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Heart. Circ. Physiol.* 285(2):H579-88.
- Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, Moldoveanu T (2016). Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS J.* 283(14):2690-700.
- Zheng M, Reynolds C, Jo SH, Wersto R, Han Q, Xiao RP (2005). Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury. *FASEB J.* 19:109-111.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 94:909-950.