



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**REGULACIÓN DE PROCESOS DE MUERTE CELULAR POR
S-NITROSILACIÓN EN EL MIOCARDIO
ISQUÉMICO-REPERFUNDIDO**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

NADIA GIOVANNA ROMÁN ANGUIANO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA CARDIOVASCULAR,
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

COMITÉ TUTOR

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN
DEPARTAMENTO DE NEURODESARROLLO Y FISIOLÓGÍA,
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DRA. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitirme realizar un posgrado en el **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, **Facultad de Medicina**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por otorgarme apoyo económico a través de una beca, **número de becario: 330150**.

Al **Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**, por brindarme un espacio en el **Departamento de Biomedicina Cardiovascular** para desarrollar mi proyecto de investigación de posgrado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 EL ÓXIDO NÍTRICO	6
1.2 SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO	7
1.3 ISOFORMAS DE LA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO	9
1.3.1 SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO NEURONAL	10
1.3.2 SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO INDUCIBLE	10
1.3.3 SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL	11
1.4 EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL MIOCARDIO	11
1.4.1 VÍA DE ÓXIDO NÍTRICO DEPENDIENTE DE GMPC	11
1.4.2 VÍA DE ÓXIDO NÍTRICO INDEPENDIENTE DE GMPC: LA S-NITROSILACIÓN	13
1.5 DAÑO AL MIOCARDIO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	15
1.5.1 ISQUEMIA EN EL MIOCARDIO	15
1.5.2 REPERFUSIÓN EN EL MIOCARDIO	18
1.6 ÓXIDO NÍTRICO EN ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	20
1.7 MUERTE CELULAR EN EL MIOCARDIO ISQUÉMICO-REPERFUNDIDO	22
1.7.1 APOPTOSIS	22
1.7.1.1 Caspasas	23
1.7.1.2 Apoptosis: vía extrínseca o de receptores de muerte	25
1.7.1.3 Apoptosis: vía intrínseca o mitocondrial	27
1.7.2 NECROSIS	29

1.7.3 CALPAÍNAS	34
1.8 ÓXIDO NÍTRICO Y MUERTE CELULAR	36
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GENERAL	40
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	40
5. MATERIAL Y MÉTODOS	41
5.1 APROBACIÓN ÉTICA	41
5.2 MODELO EXPERIMENTAL	41
5.2.1 GRUPOS EXPERIMENTALES	43
5.3 MEDICIÓN DEL TAMAÑO DEL INFARTO	45
5.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	45
5.5 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN CITOSÓLICA	47
5.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRITOS	47
5.7 CONTENIDO DE GMPC	48
5.8 EXTRACCIÓN Y CORRIMIENTO DE ADN	50
5.9 ENSAYO DE TUNEL	51
5.10 CONTENIDO DE CASPASA-3, -8, -9 Y CALPAÍNA-1	52
5.11 ACTIVIDAD DE CASPASA-3, -8 Y -9	53
5.12 ACTIVIDAD DE CALPAÍNA-1	54
5.13 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CALPAÍNA-1 Y CASPASA-3	54
5.14 ENSAYO DE S-NITROSILACIÓN	55
5.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56

6. RESULTADOS	57
6.1 LOS COMPUESTOS PROLAME Y SNAP MANTIENEN LA FUNCIÓN CARDIACA DE CORAZONES SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	57
6.2 LOS COMPUESTOS PROLAME Y SNAP MANTIENEN LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y REDUCEN EL TAMAÑO DEL INFARTO DE CORAZONES REPERFUNDIDOS	58
6.3 LA CONTRIBUCIÓN DE LAS VÍAS DE ACCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE GMPc EN EL EFECTO CARDIOPROTECTOR DE PROLAME O SNAP	59
6.4 EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS O NECROSIS	64
6.5 EFECTO DEL PROLAME O SNAP EN EL CONTENIDO Y ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS Y CALPAÍNA-1	67
6.6 EFECTO DEL PROLAME O SNAP EN LA S-NITROSILACIÓN DE CASPASA-3 Y CALPAÍNA-1	71
7. DISCUSIÓN	74
8. CONCLUSIÓN	79
9. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ESTRUCTURA DE LA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO.	8
FIGURA 2. REACCIONES QUÍMICAS QUE LLEVAN A LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.	9
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA GUANILTO CICLASA SOLUBLE.	12
FIGURA 4. PROCESOS CELULARES QUE OCURREN DURANTE LA ISQUEMIA.	17
FIGURA 5. PROCESOS CELULARES QUE OCURREN DURANTE LA REPERFUSIÓN.	19
FIGURA 6. DESACOPLAMIENTO DE LA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL.	21
FIGURA 7. LA FAMILIA DE LAS PROCASPASAS. A. ESTRUCTURA DE LAS PROCASPASAS.	25
FIGURA 8. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA APOPTOSIS.	28
FIGURA 9. MUERTE CELULAR POR NECROSIS.	32
FIGURA 10. EL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.	34
FIGURA 11. ESTRUCTURA DE LAS CALPAÍNAS.	36
FIGURA 12. SISTEMA DE PERFUSIÓN DE CORAZÓN AISLADO LANGENDORFF.	42
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.	43
FIGURA 14. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES TRATADOS CON INHIBIDORES.	44
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE GMPC .	49
FIGURA 16. EL DOBLE PRODUCTO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.	57
FIGURA 17. TAMAÑO DEL INFARTO Y CONTENIDO DE NITRITOS.	59
FIGURA 18. EFECTO DEL ODQ Y EL L-NAME EN LA CARDIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR PROLAME .	60

FIGURA 19. EFECTO DEL ODQ EN LA CARDIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR SNAP.	62
FIGURA 20. CONTENIDO DE GMPC.	64
FIGURA 21. ENSAYO DE TUNEL Y ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE ADN.	66
FIGURA 22. INMUNODETECCIÓN DE PROTEASAS RELACIONADAS CON MUERTE CELULAR.	69
FIGURA 23. ACTIVIDAD DE CASPASAS-3, -8, -9 Y CALPAÍNA-1 EN CORAZONES REPERFUNDIDOS TRATADOS CON PROLAME O SNAP.	70
FIGURA 24. DETECCIÓN DE LA S-NITROSILACIÓN DE CASPASA-3 Y CALPAÍNA-1 EN CORAZONES REPERFUNDIDOS TRATADOS CON PROLAME O SNAP.	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. LOCALIZACIÓN DE LOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS QUE CONFORMAN A LA TRIADA CATALÍTICA DE LA <i>M</i> -CALPAÍNA Y DE LA <i>M</i> -CALPAÍNA.	35
TABLA 2. CONCENTRACIONES DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR.	46
TABLA 3. CONCENTRACIONES DE NITRATO DE SODIO PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR.	48
TABLA 4. ADICIÓN DE LOS REACTIVOS EN LA MICROPLACA.	50

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-pNA Sustrato para caspasa-3	N-Acetil-Ácido aspártico-Ácido glutámico-Valina- Ácido aspártico-p-nitroanilina.
Ac-IETD-pNA Sustrato para caspasa-8	N-Acetil-Isoleucina-Ácido glutámico-Treonina-Ácido aspártico-p-nitroanilina.
Ac-LEHD-pNA Sustrato para caspasa-9	N-Acetil-Leucina-Ácido glutámico-Histidina-Ácido aspártico-pNA.
AIF	Factor inductor de apoptosis.
ANT	Translocasa de nucleótidos de adenina.
Apaf-1	Factor-1 activador de proteasa.
BAK	Asesino/antagonista 1 de Bcl-2.
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2.
Bcl-2	Linfoma de células B.
BH₂	Dihidrobiopterina.
BH3	Region homóloga a Bcl-2
BH₄	Tetrahidrobiopterina.
BID	Agonista del dominio de muerte que interactúa con BH3.
BIDt	BID truncado.
BKN	Bradicinina.
ciAP	Inhibidor celular de la apoptosis.
cFLIP	Inhibidor celular proteico de FLICE.
CaM	Calmodulina.
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa.
CCLT	Canal de calcio tipo L.
CD95	Cluster de diferenciación 95
CNTI	Canal de sodio tipo I.
CypD	Ciclofilina D.
Cytc	Citocromo c.
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro.
DED	Dominio efector de muerte.
DHRF	Enzima de reciclaje dihidrofolato reductasa.
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte.
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio.
ERs	Receptores nucleares a estrógenos.
ERK	Cinasas reguladas por señal extracelular.

FAD	Flavina adenina dinucleótido.
FADD	Fas asociado a dominio de muerte.
FAS	Factor activador exo s.
FASI	Ligando de FAS.
FASr	Receptor para FAS.
FMN	Flavina mononucleótido.
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GCp	Guanilato ciclasa particulada.
GCs	Guanilato ciclasa soluble.
GLUD1	Glutamato deshidrogenasa I.
GLUL	Glutamato-amonio ligasa.
GMPc	Guanosín 3',5'-monofosfato cíclico.
GSNO	S-nitrosoglutatión.
GSK3β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta.
GTP	Guanosín 5'-trifosfato.
H⁺	Hidrógeno/Protón.
HRP	Peroxidasa de rábano.
HtrA2/Omi	Proteína A2 de requerimiento de alta temperatura.
IAM	Infarto agudo al miocardio.
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis.
IκB	Inhibidor de NF-κB.
IKK	Cinasa IκB.
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato.
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal.
L-NAME	N _ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro.
LPS	Lipopolisacárido.
LVDP	Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo.
MEM	Membrana externa mitocondrial.
mitoK_{ATP}	Canal de potasio sensible a ATP.
MMTS	Metil metano tiosulfonato.
MLKL	Proteína de tipo dominio cinasa de linaje mixto.
Na⁺/K⁺ATPasa	Bomba de sodio/potasio.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
NEMO	Modulador esencial de NF-κB.
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa.
NOS	Sintasa de óxido nítrico.
NOSe	Sintasa de óxido nítrico endotelial.

NOSi	Sintasa de óxido nítrico inducible.
NOSn	Sintasa de óxido nítrico neuronal.
NOXO1	Organizador NADPH oxidasa 1.
NPs	Péptidos natriuréticos.
NXC	Intercambiador sodio/calcio.
NXH	Intercambiador sodio/hidrógeno.
NS 2028	oxadiazolo (3,4-d)Benzo(b)(1,4)oxazina-1.
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1.
P38 MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos.
PKC	Proteína cinasa C.
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc.
PTPm	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial.
PYGL	Fosforilasa glucógeno.
RHIM	Motivos de interacción homotípica de RIP.
RIP	Proteína interactiva del receptor.
RyR	Receptor de rianodina.
SERCA	Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico.
Smac/DIABLO	Segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína con bajo punto isoelectrico de unión al IAP.
SNAP	S-Nitroso-N-acetilpenicilamina.
TAK1	Cinasa activada por el factor de crecimiento tumoral- β .
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral- β .
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral.
TRADD	Receptor del TNF asociado a través del dominio de muerte.
TRAF	Factor asociado al TNFR.
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF.
TRAILR	Receptor inductor de apoptosis por ligando relacionado al factor de necrosis tumoral.
TRAMP	Proteína de membrana asociada a TNFR.
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.
TUNEL	Marcador final de corte de dUTP por deoxinucleotidil transferasa.
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje.
WD40	Dominio C-terminal de Apaf-1
XIAP	Inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X

RESUMEN

Después de la isquemia y como consecuencia de la reperfusión, el miocardio padece de daño adicional al producido durante la isquemia. La disminución en el contenido de óxido nítrico (ON•) y la muerte celular son consecuencias de este fenómeno, conocido como “daño por reperfusión”. El ON• regula la función del sistema cardiovascular a través de efectos dependientes e independientes del guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). La vía independiente del GMPc involucra la modificación postraduccional reversible de proteínas por S-nitrosilación.

Estudios *in vitro* han demostrado que el ON• inhibe la actividad de proteasas involucradas en vías de muerte celular a través de la S-nitrosilación de la cisteína localizada en su sitio catalítico; por lo tanto, en este proyecto se planteó dilucidar si las vías de acción del ON• se relacionan con cambios en la S-nitrosilación de proteasas relacionadas con muerte celular en el miocardio isquémico-reperfundido (I-R), utilizando dos compuestos que incrementan el contenido de ON•: Prolame y S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP).

Los resultados revelaron que el aumento en el contenido de ON• se asocia con la recuperación y mantenimiento de la función contráctil, con la disminución del tamaño del infarto y con la disminución de la apoptosis en corazones I-R.

Para determinar la contribución de la S-nitrosilación en la cardioprotección observada y su relación con la actividad de proteasas que participan en vías de muerte celular, se utilizó el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1 (ODQ) y el inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, N_ω-Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME) y se evaluó la función cardíaca.

Se encontró que la cardioprotección conferida por Prolame depende de mecanismos dependientes e independientes de la vía de GMPc, mientras que la que se observó en el grupo I-R+SNAP se relaciona principalmente con la S-nitrosilación.

Se midió el contenido y la actividad de caspasa-3 y de calpaína-1 en los diferentes grupos experimentales. Se observó que el péptido activo de la caspasa-3 incrementó en el tejido de corazones I-R y presentó tendencia a disminuir en el grupo tratado con SNAP, pero no en el grupo tratado con Prolame. Los resultados de actividad revelaron un comportamiento similar: la actividad de la proteasa disminuyó solo en el grupo tratado con SNAP en comparación con el grupo I-R. El análisis de los niveles de la subunidad corta de la calpaína-1 no presentó diferencias entre los grupos experimentales; sin embargo, la actividad de la calpaína-1 disminuyó en los grupos tratados con Prolame y con SNAP respecto al grupo I-R. Aunque los resultados de función cardíaca indican la participación de procesos de S-nitrosilación en el grupo tratado con SNAP y, a pesar de que éste disminuyó efectivamente la actividad de las proteasas, no se estableció una clara correlación entre la S-nitrosilación y la función de estas proteasas.

ABSTRACT

After ischemia and because of reperfusion, the myocardium suffers from additional damage to that produced during ischemia. The decrease in nitric oxide (\bullet NO) content and cell death are consequences of this phenomenon, known as ischemia reperfusion (I-R) damage. \bullet NO regulates the function of the cardiovascular system through independent and dependent effects of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP). The independent route of cGMP involves reversible post-translational modification of proteins by S-nitrosylation.

In vitro studies have shown that \bullet NO inhibits the activity of proteases involved in cell death pathways through the S-nitrosylation of cysteine located at its catalytic site; therefore, in this project it was proposed to elucidate whether the \bullet NO action pathways are related to changes in the S-nitrosylation of proteases related to cell death in the IR myocardium, using two compounds that increase the \bullet NO content: Prolame and S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP).

Results revealed that the increase in \bullet NO content is associated with the recovery and maintenance of contractile function, with the decrease in infarct size and diminution in apoptosis in I-R hearts.

To determine the contribution of S-nitrosylation in the observed cardioprotection and its relationship with the activity of proteases that participate in cell death pathways, we used the soluble guanylate cyclase inhibitor, 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxaline-1 (ODQ) and the nitric oxide synthase inhibitor, N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) and evaluated cardiac function.

It was found that cardioprotection conferred by Prolame depends on dependent and independent mechanisms of the cGMP pathway, while that observed in the I-R+SNAP group is mainly related to S-nitrosylation.

The content and activity of caspase-3 and calpain-1 in the different experimental groups was measured. It was observed that the active peptide of caspase-3 increased in I-R hearts and showed a tendency to decrease in the SNAP-treated group, but not in the Prolame-treated group. The activity results revealed a similar behavior: protease activity decreased only in the SNAP-treated group compared to the I-R group. The analysis of the levels of the short subunit of calpain-1 did not show differences between the experimental groups; however, the activity of calpain-1 decreased in the groups treated with Prolame and with SNAP as compared to the I-R group. Although the results of cardiac function indicate the participation of S-nitrosylation processes in the SNAP-treated group and, even though this effectively decreased protease activity, a clear correlation between S-nitrosylation and function was not established of these proteases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El óxido nítrico

El óxido nítrico (ON•) es una molécula de vida media corta que es generada por la familia de las sintasas de ON• (NOS) en células de mamíferos.

El ON• fue descrito inicialmente como un potente vasodilatador en preparaciones aisladas de vasos sanguíneos tratados con acetilcolina (AC) [Furchgott y Zawadzki, 1980] y en preparaciones de anillos vasculares de perro estimulados con bradicinina (BKN). En estos últimos observaron que al eliminar las células endoteliales de las arterias se perdía totalmente la respuesta relajante inducida por BKN [Cherry *et al.*, 1982], con lo que concluyeron que la relajación se inducía a través de una sustancia vasoactiva liberada de las células endoteliales, a la cual nombraron factor relajante derivado del endotelio (endothelium-derived relaxing factor: EDRF). Posteriormente, en el laboratorio del doctor Moncada, se demostró que el EDRF era el ON•, tras observar que la vida media y la actividad biológica de ambos factores era similar en aortas aisladas [Palmer *et al.*, 1987]. Después de tan importante descubrimiento, este mismo grupo de investigación demostró que el ON• es sintetizado por una enzima dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que utiliza L-arginina como sustrato [Palmer *et al.*, 1988; Palmer y Moncada, 1989].

El ON• es un radical libre heterodiatómico compuesto por un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno que puede participar en diferentes reacciones bioquímicas. El ON• es capaz de difundir a una velocidad aproximada de 50 $\mu\text{m/s}$ en solución acuosa y su vida media *in vivo* es de aproximadamente 3-6 segundos [Loscalzo, 2000]. El ON• es un mensajero intracelular que es capaz de difundir libremente a través de las membranas biológicas porque es una molécula que carece de carga [Beckman y Koppenol, 1996].

Se ha descrito que el ON• a concentraciones bajas (submicromolares) es capaz de ejecutar efectos ionotrópicos positivos que incrementan la función cardíaca basal

[Kojda *et al.*, 1996]. Además de regular procesos de relajación endotelial, se han descrito otros efectos del ON• en diferentes procesos celulares. En el sistema nervioso funciona como un mensajero neuronal a través del cual se modulan funciones sinápticas [Prast y Philippu, 2001], también participa en procesos de inmunidad e inflamación [Coleman JW, 2001], en procesos de proliferación celular [Napoli *et al.*, 2013], inhibe la agregación plaquetaria [Radomski *et al.*, 1987] y regula procesos de muerte celular, activando mecanismos antiapoptóticos o proapoptóticos [Kim *et al.*, 1999].

1.2 Síntesis de óxido nítrico

Las NOS son las enzimas responsables de la producción de ON• a partir del sustrato L-arginina, a través de la oxidación de su grupo guanidino. Todas las isoformas de la NOS tienen la misma estructura. La conformación homodimérica de las NOS favorece la unión de la L-arginina y de cofactores específicos que llevarán a la producción de ON•. El homodímero de la NOS se divide por su estructura y función en dos dominios principales: un dominio oxigenasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal [Alderton *et al.*, 2001; Aoyagi *et al.*, 2003; Förstermann y Sessa, 2012]. El dominio catalítico oxigenasa N-terminal regula la unión en su sitio hemo de la Fe-protoporfirina IX; también contiene sitios de unión para el sustrato L-arginina y para la (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄). El dominio catalítico reductasa C-terminal contiene sitios de unión para NADPH, flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina adenina mononucleótido (FMN). Ambos dominios se unen en la región intermedia del homodímero por la calmodulina (CaM), que a su vez es capaz de unir 4 moléculas de calcio (Figura 1) [Daff, 2010; Tennyson y Lippard, 2011].

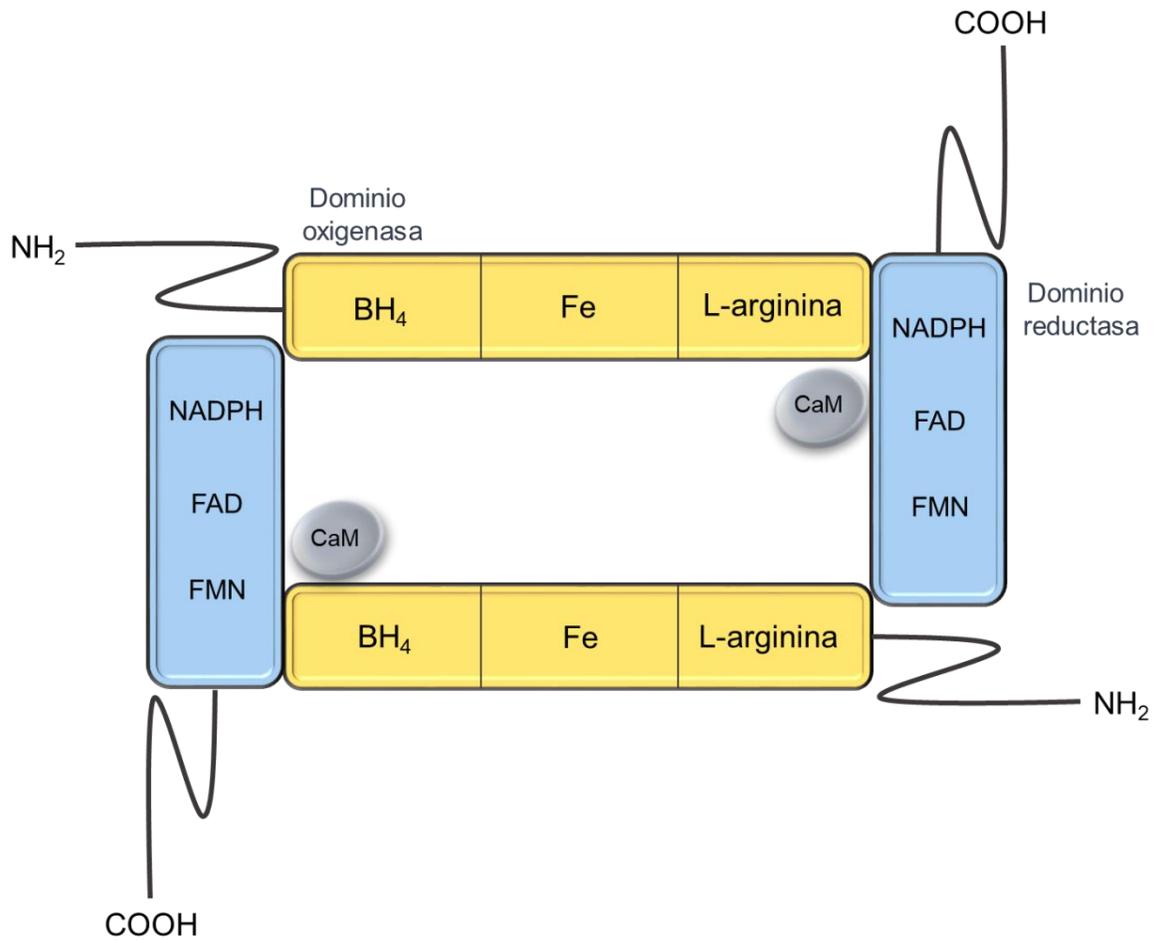


FIGURA 1. Representación gráfica de la estructura de la sintasa de óxido nítrico. La sintasa activa es un dímero con un dominio oxigenasa y uno reductasa, a los que se unen sustratos y cofactores específicos. BH₄: (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; Fe: Fe-protoporfirina IX; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; FAD: flavina adenina dinucleótido; FMN: flavina adenina mononucleótido; CaM: calmodulina.

La conversión de la L-arginina a través de las NOS sucede en dos pasos: en el primer paso, la L-arginina pasa por una hidroxilación en el nitrógeno del grupo guanidino para generar N-hidroxiarginina. Esta reacción requiere una molécula de oxígeno y una molécula de NADPH. En el segundo paso, la N-hidroxiarginina se oxida en el mismo grupo guanidino y se genera L-citrulina y ON•. Se requiere de ½ molécula de NADPH y una molécula de oxígeno (Figura 2) [Knowles y Moncada, 1994].

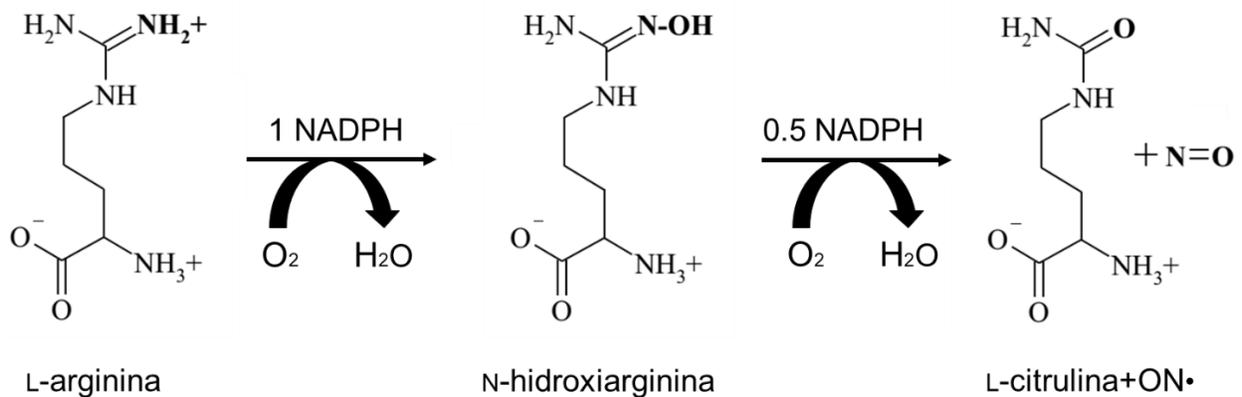


FIGURA 2. Reacciones químicas que llevan a la síntesis del óxido nítrico. En **negrita** se marca el grupo guanidino, que en el primer paso se hidroxila y en el segundo paso se oxida para generar L-citrulina y ON•.

1.3 Isoformas de la sintasa de óxido nítrico

Existen 3 tipos de NOS en los mamíferos:

- Sintasa de óxido nítrico neuronal (NOS_n).
- Sintasa de óxido nítrico inducible (NOS_i).
- Sintasa de óxido nítrico endotelial (NOS_e).

Estas enzimas se clasifican en sintasas constitutivas o inducibles. Las enzimas NOSn y NOSe son formas constitutivas y su actividad es dependiente de CaM/calcio. La actividad de la sintasa inducible (NOSi) es independiente de CaM/calcio [Arzumanian *et al.*, 2003].

1.3.1 Sintasa de óxido nítrico neuronal

La NOSn fue aislada por primera vez de cerebelo de puerco y se identificó en neuronas específicas del sistema nervioso central y periférico. Además, la NOSn ha sido identificada en otros tipos celulares como miocitos, células epiteliales, neutrófilos, células cromafines y mastocitos [Boissel *et al.*, 1998]. La NOSn está formada por 1,434 residuos de aminoácidos y su peso molecular aproximado es de 160.8 kDa. La NOSn en su forma monomérica es inactiva. La dimerización incrementa la actividad de NOSn porque crea sitios de unión de alta afinidad para L-arginina y BH₄, lo que facilita el flujo de electrones, además cuando se encuentra en forma de dímero, la NOSn es resistente contra procesos de proteólisis [Zhou y Zhu, 2009].

1.3.2 Sintasa de óxido nítrico inducible

La isoforma NOSi se ha descrito en macrófagos, células de Kupffer, hepatocitos y músculo liso vascular, entre otros tipos celulares; su actividad es inducida por acción de citocinas y lipopolisacárido (LPS) [Marsden *et al.*, 1994]. Tiene un peso molecular de 131 kDa. La NOSi es la única isoforma que no depende del incremento de calcio intracelular [De Vera *et al.*, 1996]. La NOSi produce grandes cantidades de ON• por periodos extendidos de tiempo, que pueden ser perjudiciales para el tejido en el que se sintetizan [Kubes, 2000].

1.3.3 Sintasa de óxido nítrico endotelial

La NOSe se identificó y se aisló de las células endoteliales de aorta de bovino. Es una proteína de 135 kDa que requiere calcio como activador. La NOSe se expresa principalmente en células endoteliales de los vasos sanguíneos [Govers y Rabelink, 2001] y el ON• sintetizado se utiliza en procesos de regulación del tono vascular. Esta isoforma de NOS sintetiza ON• en concentraciones bajas, lo que le permite actuar como segundo mensajero al estimular la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) e incrementar el nivel del guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) [Geller y Billiar, 1998]. El efecto de la molécula de ON• sobre la célula es dependiente de su concentración. Se ha descrito que dosis bajas del ON• (<1-30 nM) activan la señalización a través del GMPc, lo que dará como resultado efectos protectores y proliferativos en la célula. Cuando el nivel de ON• incrementa (>400 nM), se induce la fosforilación de p53, que lleva al arresto del crecimiento celular o a la vía de apoptosis y a concentraciones mayores (1µM) se induce estrés nitrosativo [Thomas *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2008].

1.4 El óxido nítrico en el miocardio

El ON• está involucrado en el sistema cardiovascular de una manera muy importante. En el miocardio, el ON• es sintetizado por la NOSe y regula el tono vascular, la contractilidad miocárdica, la proliferación celular, la agregación plaquetaria y tiene efectos antitrombóticos en la vasculatura [Loscalzo y Welch, 1995].

1.4.1 Vía de óxido nítrico dependiente de GMPc

Una de las vías mediante las cuales el ON• regula al tejido cardíaco es a través del incremento del GMPc. Este incremento se produce tras la activación de la GCs o la GC particulada (GCp) por ON• o péptidos natriuréticos, (NPs) [Hammond y Balligand, 2012].

La GCs se encuentra en tejidos de diferentes órganos, como el pulmón, cerebro, riñón y en el tejido vascular. La GCs es un heterodímero formado por dos subunidades, la subunidad α y la subunidad β , de las cuales se han identificado las isoformas α_1 , α_2 , β_1 y β_2 . El heterodímero mejor caracterizado es el α_1/β_1 . Para activar a la GCs, el $\text{ON}\cdot$ se une a la GCs en la sexta posición del anillo hemo, lo que rompe la unión entre la histidina axial y el hierro para formar un anillo 5-coordinado con el $\text{ON}\cdot$ en la quinta posición (Figura 3) [Potter, 2011].

La GCs cataliza la conversión de guanósín 5'-trifosfato (GTP) a GMPc , lo que desencadena vías de transducción de señales implicadas en el sistema cardiovascular y en el sistema nervioso [Denninger y Marletta, 1999].

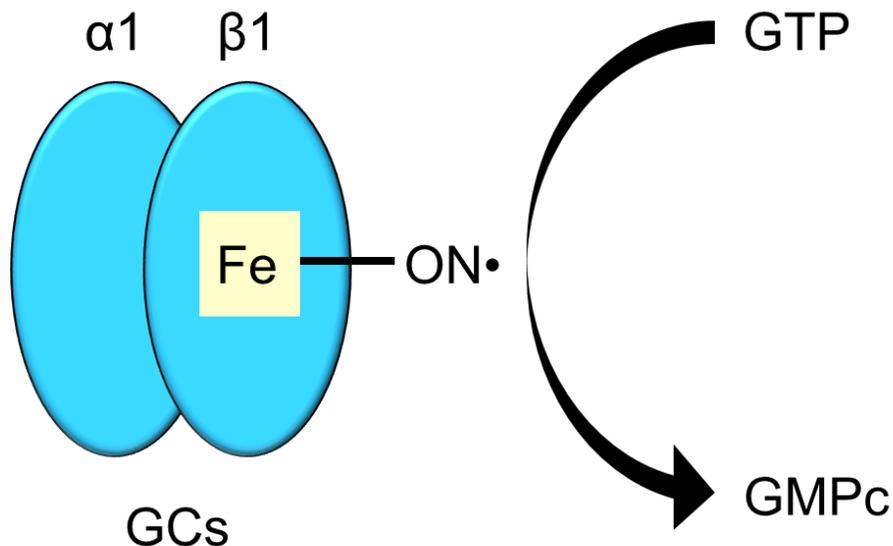


FIGURA 3. Estructura de la guanilto ciclasa soluble. Cuando el $\text{ON}\cdot$ se une a la GCs, el contenido de GMPc incrementa a partir de GTP.

Diversas moléculas producen respuestas celulares a través del GMPc . Algunas de estas moléculas incluyen: el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y fosfolambano, el receptor tromboxano A_2 , el canal de potasio activado por calcio, el canal de calcio tipo L y la fosfatasa de miosina de cadena ligera [Lucas *et al.*, 2000].

Existen compuestos que inhiben la activación de la GCs: el 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) y el oxadiazolo (3,4-d)Benz(b)(1,4)oxazin-1-one (NS 2028). El ODQ es un inhibidor competitivo que se une a la GCs, oxidando la forma ferrosa de la enzima y disminuyendo su afinidad por el ON• [Koesling *et al.*, 2004].

1.4.2 Vía de óxido nítrico independiente de GMPc: la S-nitrosilación

La vía independiente de GMPc se refiere a modificaciones postraduccionales de las proteínas. La S-nitrosilación es una modificación postraduccional que depende de la disponibilidad de ON• que se genera a través de las NOS. Esta modificación ocurre en el grupo tiol de las proteínas e involucra el acoplamiento de un ON• en los tioles para formar un nitrosotiol que funciona como un regulador sobre la actividad de la proteína modificada [Murphy *et al.*, 2012; Stamler *et al.*, 2001].

La actividad de las proteínas se altera por el incremento o la disminución de su actividad, y esto se debe a que el sitio catalítico de las proteínas generalmente contiene residuos de cisteína susceptibles de ser nitrosilados en sus grupos tiol [Murphy *et al.*, 2014].

La S-nitrosilación es dependiente de la disponibilidad de ON•, por lo tanto, el estado redox de la célula es importante para mantener disponible al ON•. En condiciones de daño al miocardio por isquemia-reperfusión (I-R), el estado redox celular puede llevar a la disminución de la disponibilidad del ON•, lo que altera el balance entre la S-nitrosilación y el estrés oxidativo. En estas condiciones de daño se ha descrito a la S-nitrosilación como un cardioprotector contra el daño por I-R: se encontró que la S-nitrosilación de la cisteína 39 del complejo I mitocondrial retarda la reactivación de la mitocondria durante los primeros minutos de la perfusión, lo que disminuye la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y por lo tanto el daño oxidativo [Murphy *et al.*, 2014; Chouchani *et al.*, 2013].

En modelos experimentales diferentes al daño por I-R del miocardio, se ha descrito la S-nitrosilación de las proteasas involucradas en la vía de muerte celular por apoptosis:

las caspasas. En hepatocitos expuestos al factor de necrosis tumoral (TNF) se describió que fuentes endógenas o exógenas de ON• previenen el incremento de la actividad proteolítica de la caspasa-3; esta inhibición fue revertida cuando se expuso la caspasa-3 a ditioneitol. También describieron que al administrar un donador de ON• a ratas tratadas con TNF y galactosamina se previene la actividad de la caspasa-3 medida en hígado y que este efecto se revierte en 50% cuando se incubaba con ditioneitol [Kim *et al.*, 1997]. En otro experimento realizado en hepatocitos a los que se les induce apoptosis con TNF y actinomicina D, se ha descrito que el ON• producido por SNAP o por NOS inhibe la actividad de la caspasa-3 y la caspasa-8, y que el efecto inhibitorio de la caspasa-8 se revierte al incubarse con ditioneitol [Kim *et al.*, 2000].

Por otro lado, se ha descrito en cultivos de células endoteliales humanas que al incubarse a la subunidad p17 de la caspasa-3 con donadores de ON•, se detectó un nitrosotiole en esa subunidad. Este resultado no se observa cuando la cisteína 163 de la subunidad p17 fue mutada a alanina, porque se previene la nitrosilación de la cisteína [Rössig *et al.*, 1999].

En otro experimento realizado en caspasas recombinantes purificadas, se ha descrito que 7 caspasas (caspasa-1, -2, -3, -4, -6, -7 y -8) inhibieron su actividad proteolítica al estar expuestas a un donador de ON•, y el ditioneitol revirtió esta inhibición, lo que sugiere la regulación de las caspasas por S-nitrosilación [Li *et al.*, 1997].

Se han descrito otras proteínas susceptibles a S-nitrosilación con efectos de protección al miocardio, entre las que se encuentran: citocromo c oxidasa, se inhibe su actividad y se disminuye el consumo de oxígeno; F1F0 ATPasa, se inhibe su actividad y se reduce el consumo de ATP durante la I-R; canal de calcio tipo L, se inhibe y se reduce la entrada de calcio durante el estrés oxidativo; NADPH oxidasa, se inhibe su actividad y suprime la producción de EROs; dinamina, promueve endocitosis y provoca efectos antiapoptóticos [Sun y Murphy, 2010].

1.5 Daño al miocardio por isquemia-reperfusión

El tejido cardiaco puede sufrir daño a nivel celular que compromete su función, dando lugar a enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardiaca, trombosis, hipertrofia e infarto agudo al miocardio, asociados a procesos de muerte celular. La isquemia se produce por la falta de perfusión sanguínea al tejido cardiaco y en consecuencia la ausencia de oxígeno en el tejido. En esta condición, el miocardio es incapaz de mantener el metabolismo aerobio dentro de la célula. La reperfusión del miocardio sucede al restablecer el flujo sanguíneo, lo que lleva a la perfusión del tejido y en consecuencia restaurar el metabolismo aerobio y la contractilidad [Jennings *et al.*, 1969; Jennings y Ganote, 1974].

Los efectos de la isquemia y la reperfusión han sido descritos desde hace tiempo [Lang *et al.*, 1974; Maroko *et al.*, 1972; Shen y Jennings, 1972; Taylor, 1971] y a continuación se explica brevemente lo que ocurre en cada situación (I-R).

1.5.1 Isquemia en el miocardio

A nivel celular, la pérdida de oxígeno inhibe la producción de ATP a través de la vía aerobia, lo que lleva a la activación de la glucólisis anaerobia como un mecanismo compensatorio de producción de ATP. La glucólisis anaerobia se activa dentro de los 15 a 20 segundos de ocurrida la oclusión en las arterias y el sustrato principal para llevar a cabo esta síntesis es el glucógeno. Las reservas de fosfatos de alta energía se agotan en menos de 5 minutos, lo que trae como consecuencia que además de la disminución del ATP, se acumulen ADP, AMP y fosfato inorgánico (Pi) en el citosol.

La principal consecuencia de este fenómeno es la acumulación de iones hidrógeno (H^+) y lactato en el citosol, porque ambos son productos netos de la glucólisis anaerobia, lo que lleva a la disminución del pH intracelular (acidosis intracelular) [Frank *et al.*, 2012]. El aumento en la concentración de H^+ activa al intercambiador sodio/hidrógeno (NXH) y

esto provoca la acumulación de sodio intracelular. Normalmente, la sobrecarga de sodio sería compensada mediante el bombeo al espacio extracelular de este ion por la bomba de sodio/potasio ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$), pero debido a la condición isquémica del tejido y a la falta de ATP, esta bomba no es funcional. El sodio es eliminado por el intercambiador sodio/calcio (NXC), a expensas de la acumulación de calcio intracelular [Buja, 2005; Dennis *et al.*, 1991].

El canal de calcio tipo L (CCTL) es otra vía para la acumulación de calcio intracelular, la despolarización del potencial de membrana inducida por la isquemia favorece su apertura y, por lo tanto, el aumento en la entrada de calcio a la célula (Figura 4) [Jennings y Reimer, 1991]. La acumulación de calcio durante la isquemia induce fragilidad estructural debido a la activación de proteasas dependientes de calcio, como las calpaínas. Sin embargo, el cambio abrupto en la permeabilidad de las membranas mitocondriales no ocurre durante la isquemia, ya que el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm), un poro de la mitocondria no selectivo permeable a cualquier molécula menor a 1.5 kDa, permanece fuertemente inhibido por la acidosis celular [Frank *et al.*, 2012; Halestrap *et al.*, 2009].

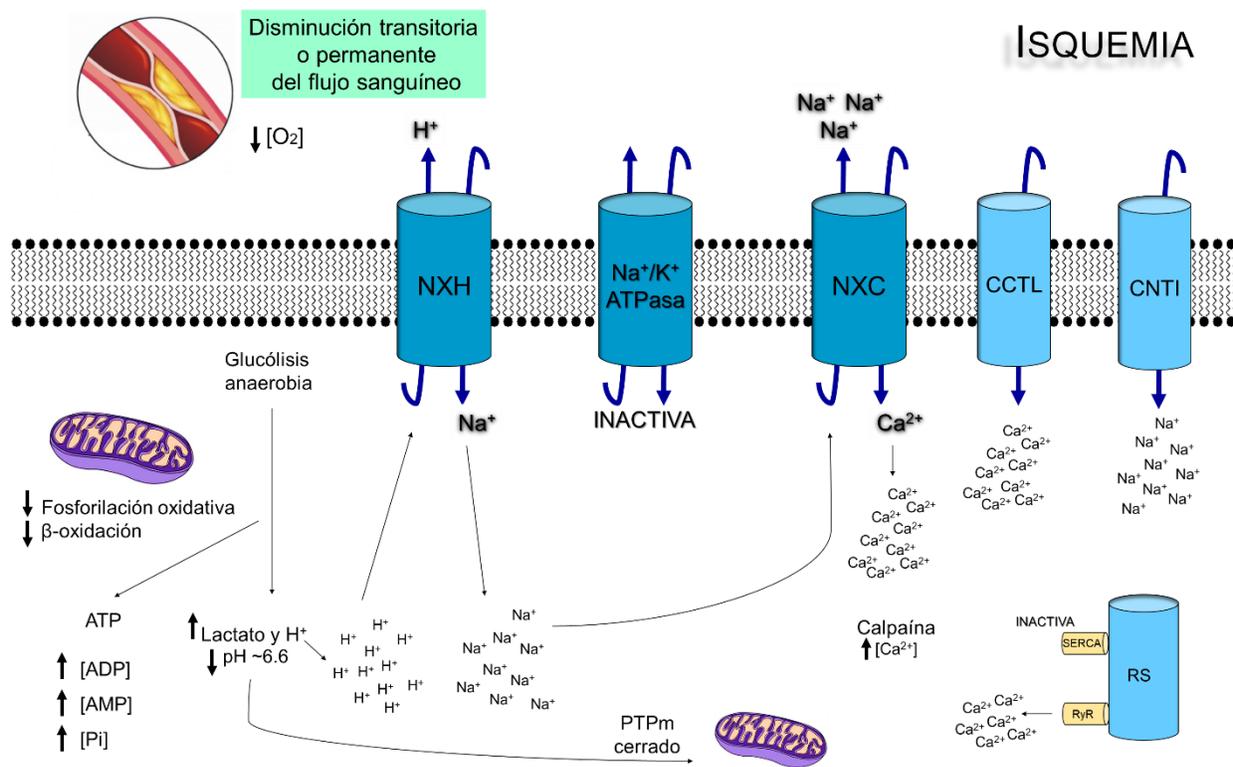


FIGURA 4. Procesos celulares que ocurren durante la isquemia. La baja disponibilidad de oxígeno en la célula debida a la isquemia disminuye los procesos de fosforilación oxidativa y β -oxidación de ácidos grasos y hace que la glucólisis anaerobia se active para generar la fuente de energía en forma de ATP. Sin embargo, se acumulan lactato y protones en el citosol que acidifican el pH intracelular. Los protones se expulsan de la célula a través del NXH, a cambio de la acumulación de sodio, que a su vez es transportado fuera de la célula a través del NXC, lo que lleva a la acumulación de calcio intracelular. Los canales de membrana dependientes de voltaje (CCTL y CNTI) se abren en respuesta a la despolarización de la membrana, lo que permite la entrada de los iones sodio y calcio al espacio intracelular y su acumulación dentro de la célula. El retículo sarcoplásmico no es capaz de capturar el calcio del citosol por la falta de ATP, necesario para que la bomba SERCA sea funcional. La sobrecarga de calcio puede llevar a la activación de proteasas dependientes de calcio, como las calpaínas. En condiciones de acidez, el poro de la transición de la permeabilidad permanece cerrado y al no haber un potencial de membrana negativo interno en la mitocondria, el calcio no se acumula en este organelo. NXH: intercambiador sodio/calcio; NXC: intercambiador sodio/calcio;

Na⁺/K⁺ATPasa: bomba de sodio/potasio; CCTL: canal de calcio tipo L; CNTI: canal de sodio tipo I; RS: retículo sarcoplásmico; SERCA: Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico; RyR: receptor de rianodina; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; AMP: adenosín monofosfato; Pi: fosfato inorgánico; PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; O₂: oxígeno; H⁺: hidrógeno/protón; Na⁺: sodio; Ca²⁺: calcio.

1.5.2 Reperusión en el miocardio

Al restaurarse el flujo sanguíneo en el miocardio isquémico, se desencadena una serie de eventos que dañan al tejido, fenómeno que se conoce como "daño por reperusión". La entrada de sangre al tejido isquémico permite la rápida restauración de sustratos esenciales (glucosa y ácidos grasos) y de los niveles de oxígeno para generar la molécula energética, el ATP, con lo que se reanuda la respiración de la célula. El incremento del potencial de membrana de la mitocondria estimula la entrada del Ca²⁺ acumulado en el citosol hacia la matriz mitocondrial [Halestrap *et al.*, 2009]. El pH intracelular se recupera rápidamente una vez iniciada la reperusión, aproximadamente en un periodo de entre 2 a 3 minutos se eliminan tanto el lactato como los H⁺. La producción de las EROs se atribuye a la repentina entrada de O₂ a la célula y a la mayor posibilidad de que reaccionen con los electrones que se transportan por los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo superóxido (O₂^{•-}). Todos estos cambios celulares: el incremento de Ca²⁺ en la mitocondria, el restablecimiento del pH y el aumento de EROs contribuyen al daño por reperusión, pues inducen la apertura del PTPm (Figura 5) [Halestrap *et al.*, 2009; Yellon y Hausenloy, 2007].

La apertura del poro desestabiliza el potencial de membrana de la mitocondria y también provoca su hinchamiento y ruptura, lo que permite la salida de proteínas apoptóticas que se encuentran en el espacio intermembranal mitocondrial, activando las vías de señalización relacionadas con la muerte celular [Baines, 2009].

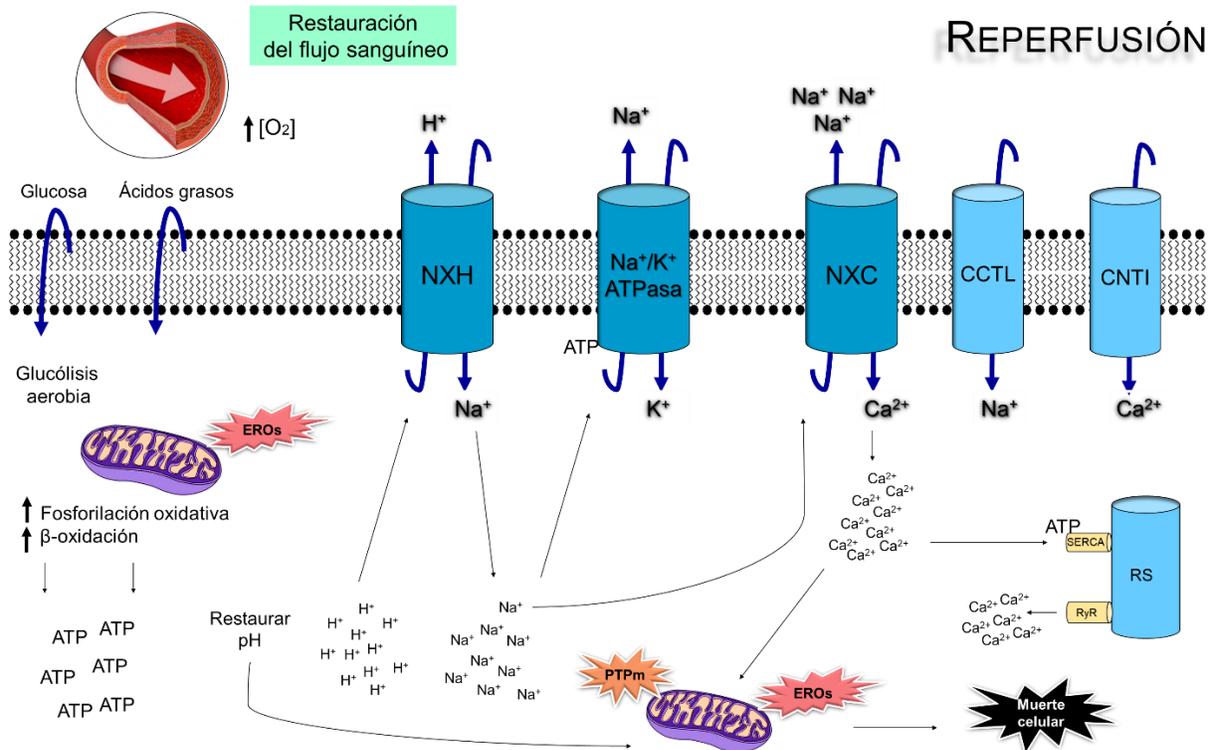


FIGURA 5. Procesos celulares que ocurren durante la reperfusion. La disponibilidad de oxígeno en la célula restablece el metabolismo aerobio, lo que permite la entrada de glucosa y ácidos grasos a la célula, incrementando los procesos de glucólisis, fosforilación oxidativa y β -oxidación de los ácidos grasos. La restauración del flujo reestablece el pH a niveles fisiológicos mediante el lavado de lactato y protones fuera de la célula. Los canales de membrana dependientes de voltaje (CCTL y CNTI) vuelven a su función fisiológica en respuesta al potencial de membrana. La bomba Na^+/K^+ ATPasa, y la de calcio del retículo sarcoplásmico funcionan de nuevo debido a la producción de ATP y comienza la recaptura de calcio del citosol hacia el retículo. El calcio también es recapturado por la mitocondria, en respuesta al restablecimiento del potencial de membrana mitocondrial. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial se abre en respuesta a la sobrecarga de calcio en la mitocondria, a la presencia de especies reactivas de oxígeno y a la restauración del pH intracelular, lo que lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a la liberación de proteínas apoptóticas que se encuentran en la mitocondria, llevando a muerte celular. NXH: intercambiador sodio/calcio; NXC: intercambiador sodio/calcio; Na^+/K^+ ATPasa: bomba de sodio/potasio;

CCTL: canal de calcio tipo L; CNTI: canal de sodio tipo I; RS: retículo sarcoplásmico; SERCA: Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico; RyR: receptor de rianodina; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; AMP: adenosín monofosfato; Pi: fosfato inorgánico; PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; EROs: especies reactivas de oxígeno; O₂: oxígeno; H⁺: hidrógeno/protón; Na⁺: sodio; Ca²⁺: calcio.

1.6 Óxido nítrico en isquemia-reperfusión

De modo adicional a los procesos intracelulares que se presentan durante la isquemia-reperfusión del miocardio, el estrés oxidativo puede afectar la biodisponibilidad intracelular del ON• debido a la disfunción de la NOSe.

Esta disminución en el nivel de ON• es resultado del desacoplamiento de la NOSe, proceso que sucede durante la I-R del miocardio y que consiste en la disminución del cofactor crítico tetrahidrobiopterina (BH₄) por oxidación. Este cofactor se encarga de unir y estabilizar al dímero de la NOSe y permitir la unión de L-arginina a la enzima. Ante la falta de BH₄, la NOSe es incapaz de unir a la L-arginina para el proceso de oxidación y el electrón donado por el NADPH pasa directamente al oxígeno molecular para producir anión superóxido (O₂⁻) (Figura 6) [Roe y Ren, 2012].

El desacoplamiento de la NOS también puede ocurrir tras la fosforilación en la serina 1177 de la NOSe o debido a la disminución en la expresión de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima involucrada en la vía de salvamento para la generación de BH₄ que se encarga de convertir a la 7,8 dihidrobiopterina (BH₂) a BH₄ [Alp y Channon, 2004; Roe y Ren, 2012].

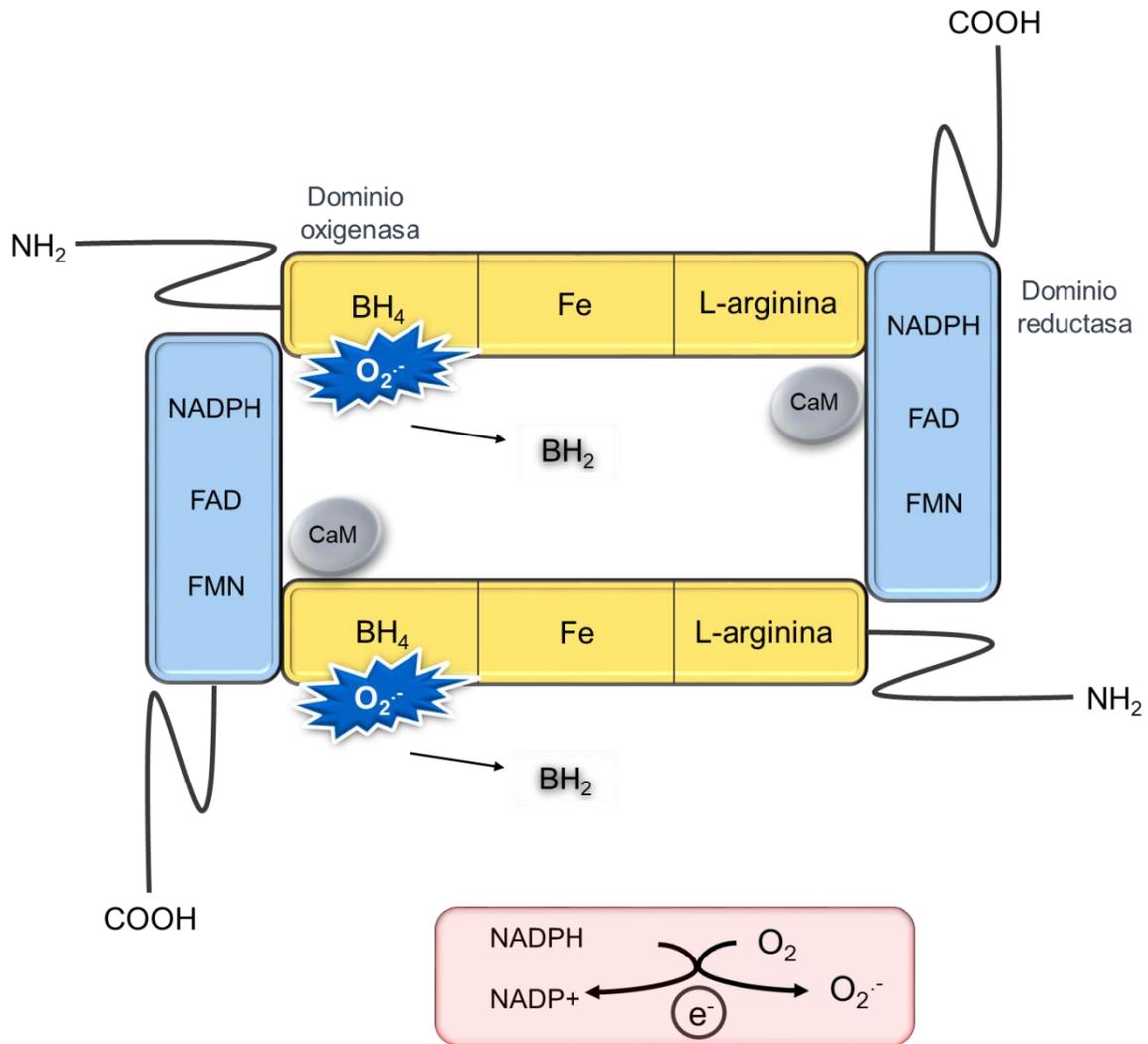


FIGURA 6. Desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial. En condiciones de estrés celular, la sintasa de óxido nítrico se desacopla, lo que trae consigo 2 consecuencias dañinas: la falta de producción de óxido nítrico y la producción de anión superóxido. El desacoplamiento es consecuencia de la oxidación del cofactor tetrahydrobiopterina, lo que perturba la estabilidad del dímero de la NOS, lo que provoca que sea incapaz de permitir la unión de la L-arginina, y el electrón donado por el NADPH reacciona directamente con el oxígeno, formando anión superóxido. BH₄: tetrahydrobiopterina; BH₂: dihydrobiopterina; Fe: hierro; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; FAD: Flavina adenina dinucleótido; FMN: Flavina

mononucleótido; CaM: calmodulina; e⁻: electrón; O₂: oxígeno molecular; O₂^{•-}: anión superóxido

1.7 Muerte celular en el miocardio isquémico-reperfundido

El daño por I-R del miocardio desencadena la muerte celular por dos vías principales: la muerte celular por apoptosis [Krijnen *et al.*, 2002] y la muerte celular por necrosis [Oerlemans *et al.*, 2012]. Tanto la necrosis como la apoptosis contribuyen al tamaño del infarto y su participación relativa puede determinar la recuperación funcional del tejido.

1.7.1 Apoptosis

La muerte celular por apoptosis es un proceso dependiente de energía (ATP), altamente regulado. Se presenta durante la morfogénesis y mantiene la homeostasis en los organismos mediante la eliminación de células dañadas, transformadas o infectadas. Durante la ejecución de la vía apoptótica, la célula padece cambios estructurales que incluyen: reducción del tamaño celular, formación de protuberancias en la membrana plasmática, membrana plasmática íntegra con exposición de fosfatidilserina en la superficie, condensación del núcleo, fragmentación del ADN y contenido celular encerrado en cuerpos apoptóticos. Las caspasas (proteasas específicas de aspartato y dependientes de cisteína) son reguladoras y ejecutoras de la muerte de la célula. Existen dos vías principales por las cuales la apoptosis es ejecutada: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial [Orogo y Gustafsson, 2013].

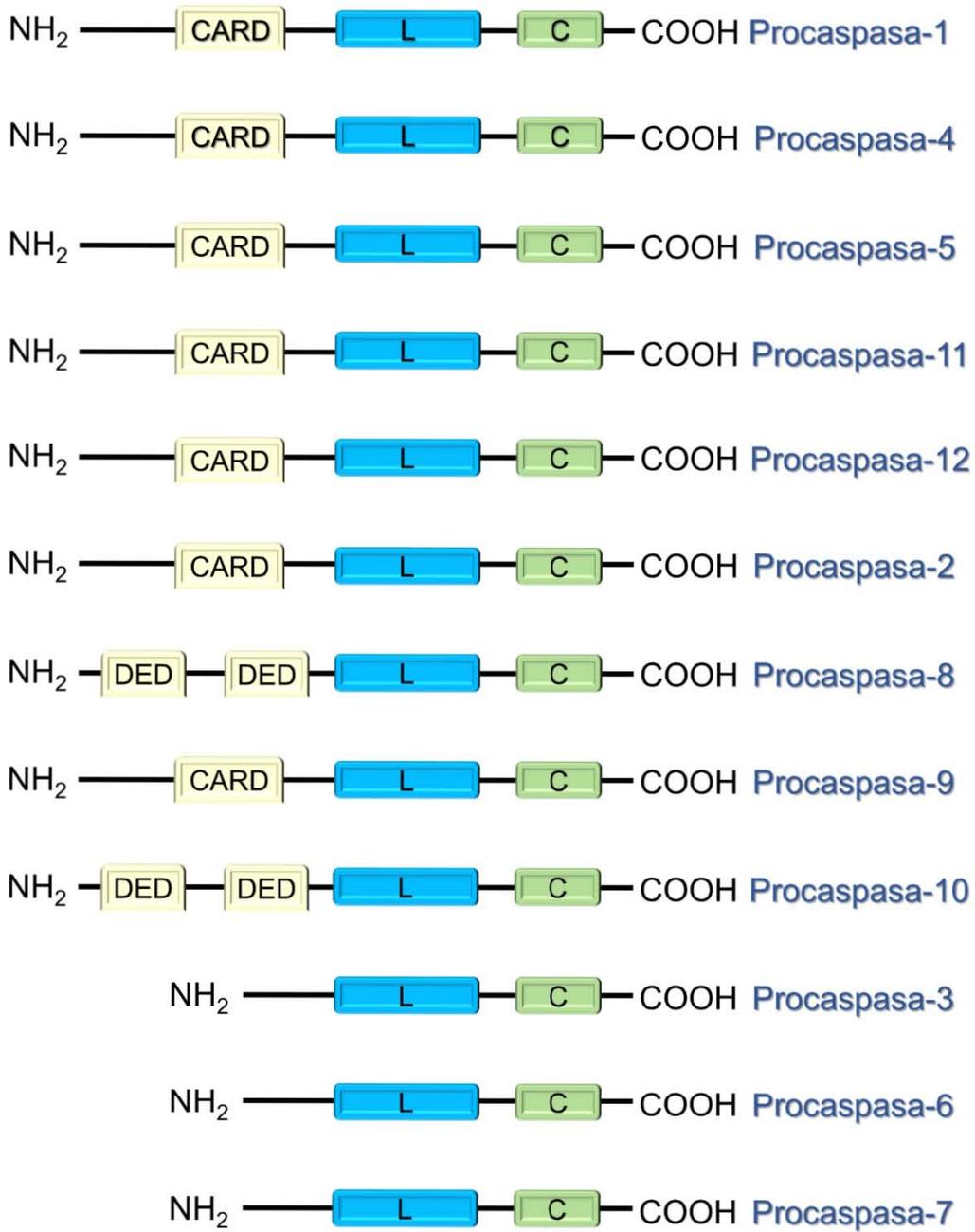
1.7.1.1 Caspasas

Las caspasas se sintetizan como zimógenos o procaspasas en el citosol y su estructura posee un dominio N-terminal, una subunidad larga de aproximadamente 20 kDa (p20) y una subunidad pequeña de aproximadamente 10 kDa (p10). De acuerdo a su estructura y función, las procaspasas se dividen en 3 grupos: el grupo I incluye a las procaspasas-1, -4, -5, -11 y -12, involucradas en la inflamación, incluyen un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) en el N-terminal; el grupo II incluye a las procaspasas-2, -8, -9 y -10, involucradas en la vía de muerte celular por apoptosis, incluyen un CARD o un dominio efector de muerte (DED) en el N-terminal; el grupo III incluye a las procaspasas-3, -6 y -7, son caspasas efectoras y no contienen dominio de reclutamiento (Figura 7a).

La activación de las caspasas inflamatorias e iniciadoras se ejecuta a través del reclutamiento de las caspasas en plataformas de activación que se ensamblan en seguida de una señal apoptótica. Las moléculas adaptadoras del complejo se unen a los dominios de caspasa en su N-terminal (CARD y DED). El reclutamiento impone un aumento local en la concentración de caspasa, lo que desencadena su dimerización por proximidad inducida. El contacto del CARD con el dominio de muerte (DD) se basa en interacciones electrostáticas, mientras que el contacto del DED con el DD utiliza interacciones hidrofóbicas. Las procaspasas-8 y -10 tienen un par de DED en su N-terminal y las procaspasas-1, -2, -4, -5, -9, -11 y -12 sólo poseen un CARD [Lamkanfi *et al.*, 2003; Pop y Salvesen, 2009].

Las caspasas se activan a través de proteólisis en un residuo de aspartato específico que se localiza entre el prodominio y las subunidades p20 y p10. La caspasa activa es un heterotetrámero que contiene dos unidades p20 y dos unidades p10 con dos sitios activos que incluyen una cisteína en cada lado opuesto de la molécula (Figura 7b) [Lamkanfi *et al.*, 2003].

A



B

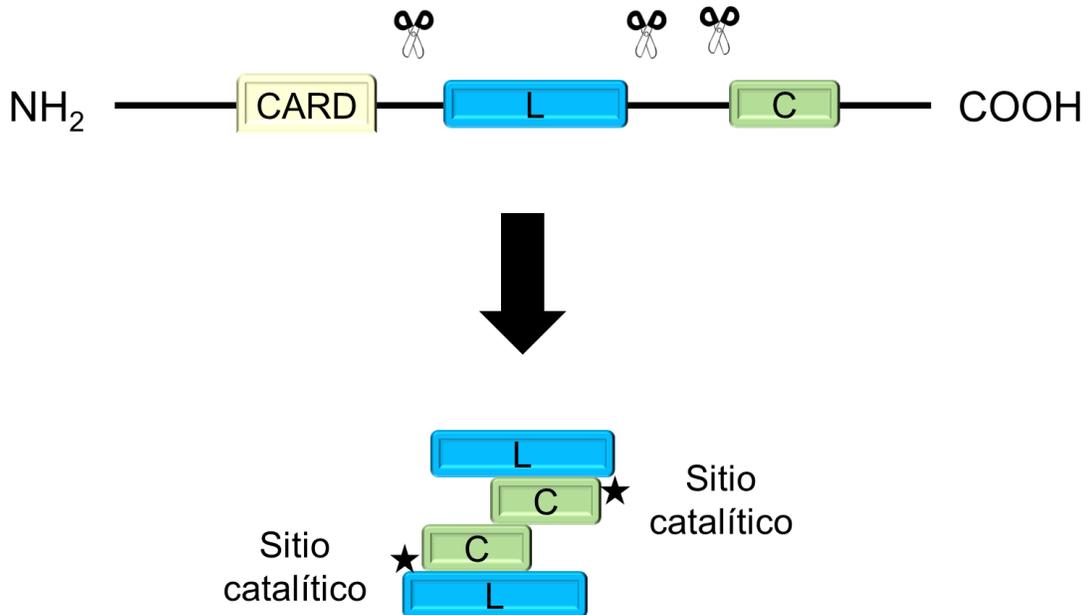


FIGURA 7. La familia de las procaspasas. **A.** Estructura de las procaspasas. Las procaspasas son zimógenos inactivos y su estructura incluye un dominio corto, un dominio largo y algunas procaspasas poseen dominios de muerte en el N-terminal. **B.** Las caspasas se activan por cortes en residuos de aspartato específicos. El corte de una procaspasa genera una subunidad larga y una corta. La caspasa activa debe tener una conformación de heterotetrámero para ser funcional, y el sitio catalítico se encuentra entre la subunidad larga y la corta. C: subunidad corta p10; L: subunidad larga p20; DED: dominio efector de muerte; CARD: dominio de reclutamiento de caspasa.

1.7.1.2 Apoptosis: vía extrínseca o de receptores de muerte

La vía extrínseca se induce a través de la activación de receptores de muerte (DR) que se encuentran en la membrana celular. La familia del receptor del TNF (TNFR) incluye 6 elementos: el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1 o DR1), el factor activador

exos (FAS, CD95 o DR2), la proteína de membrana asociada a TNFR (TRAMP, APO-1 o DR3), el receptor 1 inductor de apoptosis por ligando relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAILR1, APO2 o DR4), el receptor 2 inductor de apoptosis por ligando relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAILR2 o DR5) y DR6. Los DR tienen un dominio extracelular para interactuar con ligandos específicos y un dominio intracelular, para formar complejos que desencadenarán señales de supervivencia o de muerte. Existen dos tipos de complejos de señalización que se forman en los DRs: el primero es el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) formado en los receptores FAS y TRAIL que lleva al inicio de señales de apoptosis; el segundo se trata de complejos formados en TNFR1, DR3 y DR6 que inducen señales no apoptóticas, como la activación del factor de transcripción nuclear kappa (NF- κ B) [Krammer y Lavrik, 2010].

Señalización a través de FAS o TRAIL: la unión del ligando de FAS (FASl) al receptor FAS (FASr) o del ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) al TRAILR lleva al reclutamiento en el dominio intracelular del receptor de la proteína adaptadora con dominio de muerte asociado a FAS (FADD), a la procaspasa-8 o procaspasa-10 y el inhibidor celular proteico de caspasa-8 (c-FLIP), ambos unidos a FADD a través del DED. Con la formación del DISC, la procaspasa-8 o -10 se activa a caspasa-8 o -10. La activación de la procaspasa-8 se da por la proximidad inducida, que se refiere a que las altas concentraciones y una orientación favorable de las procaspasas-8 reclutadas en el DISC llevan a su activación por autoproteólisis. Se han establecido dos tipos celulares para inducir apoptosis a través de FAS:

i) Células tipo I, se caracterizan por poseer altos niveles del DISC y por lo tanto altos niveles de caspasa-8 y -10 activa, las cuales pueden cortar y activar a las caspasas efectoras -3, -6 y -7.

ii) Células tipo II, existen bajos niveles del DISC y poca actividad de caspasa-8, lo cual no es suficiente para activar a las caspasas efectoras y se requiere una señal de amplificación. Esto sucede cuando la caspasa-8 corta a la proteína apoptótica agonista de la muerte que interactúa con el dominio BH3 (BID) para generar BID truncado (BIDt), una proteína de 15 kDa que se transloca a la membrana externa mitocondrial (MEM) para

desencadenar la liberación de citocromo c (cytc) a través de la activación de las proteínas apoptóticas BAK (asesino/antagonista 1 de Bcl-2) y BAX (proteína X asociada a Bcl-2), lo que lleva a la liberación de cytc para formar el apoptosoma en conjunto con la procaspasa-9, lo que lleva a la activación de la caspasa iniciadora -9, que activará a la procaspasa-3 y finalmente llevará a la muerte celular (Figura 8) [Hao y Mak, 2009; Krammer y Lavrik, 2010; Lavrik *et al.*, 2005].

1.7.1.3 Apoptosis: vía intrínseca o mitocondrial

La vía intrínseca se activa por estímulos apoptóticos que incluyen daño al ADN, radiación, hipoxia, toxinas, infecciones virales, privación de señales de crecimiento y estrés celular. Bajo estas señales de estrés celular, las proteínas apoptóticas BAK y BAX se activan y se translocan a la MEM para formar poros y permitir la liberación hacia el citosol de factores apoptóticos que se encuentran dentro de la mitocondria: cytc, segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína con bajo punto isoeléctrico de unión al IAP (Smac/DIABLO), proteína A2 de requerimiento de alta temperatura (HtrA2/Omi), factor inductor de apoptosis (AIF) y endonucleasa G. El citocromo-c se une con el factor-1 activador de proteasas (Apaf-1), que es una molécula que se encuentra en el citosol y contiene 3 regiones en su estructura: el CARD, donde se une la procaspasa-9, la región de oligomerización y unión de nucleótidos para unir ATP y un dominio C-terminal WD40, que inhibe la oligomerización de Apaf-1 en el citosol, de manera que la proteína se encuentra en una forma autoinhibida. El cytc se une a Apaf-1 a través del dominio WD40 y la procaspasa-9 se une por medio del CARD; este complejo se denomina apoptosoma. El reclutamiento de la procaspasa-9 en este complejo induce a la activación de la proteasa, que ocurre por dimerización de la procaspasa-9 y el subsecuente corte en el dominio de unión, que es importante para estabilizar a los dímeros de la caspasa-9. La caspasa-9 activa a la procaspasa-3 por proteólisis. Las proteínas Smac/DIABLO y HtrA2/Omi favorecen a la apoptosis por unirse e inhibir a la proteína inhibidora de apoptosis (IAP), que a su vez pueden inhibir directamente la actividad de las caspasas.

El AIF se transloca al núcleo y causa fragmentación de ADN en piezas de 50-300 kb y condensación de la cromatina del núcleo. La endonucleasa G también se va al núcleo para cortar a la cromatina y producir fragmentos de oligonucleosomales de ADN (Figura 8) [Ferraro y Cecconi, 2010; Lavrik *et al.*, 2005].

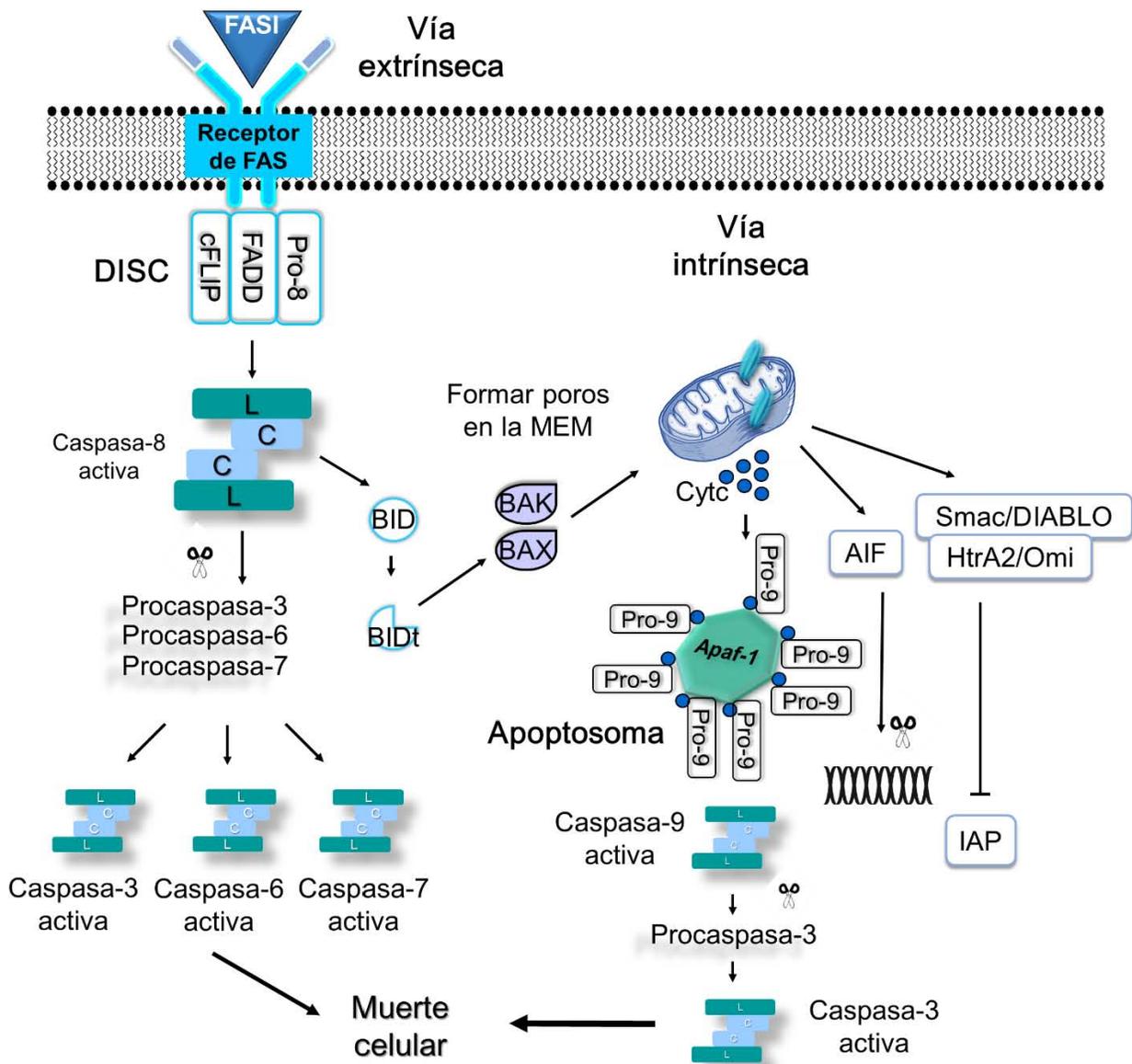


FIGURA 8. Vías de señalización de la apoptosis. Vía extrínseca o de receptores: la unión de un ligando con su receptor de muerte desencadena la muerte apoptótica por la vía

extrínseca. La procaspasa-8 se activa en el complejo DISC, la caspasa-8 activa corta por proteólisis a las procaspasas efectoras o a BID para desencadenar la muerte celular. Vía intrínseca o mitocondrial: la formación de poros en la MEM permite la salida de proteínas apoptóticas contenidas en la mitocondria. La activación de procaspasa-9 en el apoptosoma lleva a la proteólisis de la procaspasa-3 para llevar a la célula a muerte celular. FASl: ligando de FAS; FASr: receptor FAS; cFLIP: Inhibidor celular proteico de FLICE; FADD: Fas asociado a través del dominio de muerte; DISC: complejo de señalización inductor de muerte; C: subunidad corta p10; L: subunidad larga p20; BID: agonista de la muerte del dominio que interactúa con BH3 tBID: BID truncado; BAX: proteína X asociada a Bcl-2; BAK: asesino/antagonista 1 de Bcl-2; Cytc: citocromo c; MEM: membrana externa mitocondrial; AIF: factor inductor de apoptosis; Smac/DIABLO: segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína con bajo punto isoeléctrico de unión al IAP; HtrA2/Omi: proteína A2 de requerimiento de alta temperatura; Apaf-1: factor-1 activador de proteasas; IAP: proteína inhibidora de apoptosis; Pro-8: procaspasa-8; Pro-9: procaspasa-9.

1.7.2 Necrosis

La muerte celular por necrosis es un proceso que se cree ocurre de manera aleatoria, como un proceso descontrolado en respuesta al estrés celular. La disminución en el nivel de ATP, la hipoxia, la isquemia, las citocinas y la exposición a toxinas son factores que pueden desencadenar muerte celular por necrosis.

Las características morfológicas de la muerte celular por necrosis incluyen el hinchamiento de la membrana celular y la condensación de la cromatina con degradación irregular del ADN. El hinchamiento de la membrana celular causa su ruptura y la liberación del contenido celular al espacio extracelular, lo que desencadena señales de inflamación [Escobar *et al.*, 2015]

El concepto de necrosis como una forma de muerte celular programada (necroptosis) se ha observado en condiciones de isquemia-reperfusión, y se refiere al proceso de muerte celular que es independiente de las caspasas. Las proteínas interactivas del receptor (RIP) son cinasas de serina/treonina indispensables para activar a la muerte celular por necroptosis, y que se activan a lo largo de la vía de necroptosis.

La activación de la necroptosis se da a través de los receptores de muerte que se encuentran en la membrana celular. El receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) es una proteína que se localiza en la membrana celular y tiene dominios orientados hacia el citosol y hacia el medio extracelular. Se activa con la unión del ligando factor de necrosis tumoral (TNF) a través de su dominio extracelular y de inmediato lleva al reclutamiento en el dominio intracelular del TNFR1 de las proteínas: el receptor del TNF asociado a través del dominio de muerte (TRADD), el factor asociado al TNFR (TRAF2), el inhibidor celular de la apoptosis (cIAP1/2) y la proteína interactiva del receptor 1 (RIP1). La unión de estas proteínas forma al Complejo I, y puede llevar a 3 vías diferentes:

i) Vía de supervivencia por la activación del NF- κ B a través del Complejo I. Las cIAPs funcionan como ligasas e3 para catalizar la formación de cadenas de ubiquitina en la lisina 377 de RIP1, lo que sirve como sitio de unión para el modulador esencial de NF- κ B (NEMO) en el complejo cinasa I κ B (IKK). IKK se activa por fosforilación a través de la cinasa activada por el factor de crecimiento tumoral- β (TAK1). El IKK activo fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B), lo que permite a NF- κ B migrar al núcleo para unirse a los promotores de sus genes blanco. Algunos de los genes que regula NF- κ B son: cIAP1/2, XIAP y c-FLIP, que son proteínas antiapoptóticas.

ii) Vía de muerte celular por apoptosis. La formación del Complejo II continúa con la disociación del Complejo I del receptor y su endocitosis. Se eliminan las cadenas de ubiquitina de la cinasa RIP1 mediante las enzimas A20 y CLYD. El Fas asociado a través del dominio de muerte (FADD) y la procaspasa-8 se reclutan al Complejo II y la procaspasa-8 se activa por proximidad. La caspasa-8 activa corta proteolíticamente a RIP1 y RIP3 para inactivarlas y evitar la muerte celular por necrosis; también es capaz

de cortar a las procaspasas efectoras -3 y -7 para activarlas; por otro lado, también puede llevar a la proteólisis de BID a BIDt que activa a las proteínas apoptóticas BAX y BAK.

iii) Vía de muerte celular por necrosis. RIP1 y TRADD pueden reclutarse para formar un complejo con el organizador NADPH oxidasa 1 (NOXO1), Nox1 y Rac para producir $O_2^{\cdot-}$ en respuesta a $TNF\alpha$. Por otro lado, la inhibición de la activación de procaspasa-8 lleva a la fosforilación y activación de las cinasas RIP1 y RIP3 para formar un complejo llamado necrosoma. La cinasa RIP3 activa a las enzimas fosforilasa glucógeno (PYGL), glutamato deshidrogenasa I (GLUD1) y glutamato-amonio ligasa (GLUL) para incrementar la respiración celular y en consecuencia incrementar la producción de EROs. La cinasa RIP3 fosforila y activa a la proteína de tipo dominio cinasa de linaje mixto (MLKL), que una vez activa, se transloca del citosol a la membrana celular a través de las cuatro regiones helicoidales que posee. La oligomerización de MLKL lleva a la formación de poros en la membrana, que resulta en la destrucción de la membrana celular (Figura 9) [Kung *et al.*, 2011; Lin, 2014; Liu *et al.*, 2019; Martínez, 2017].

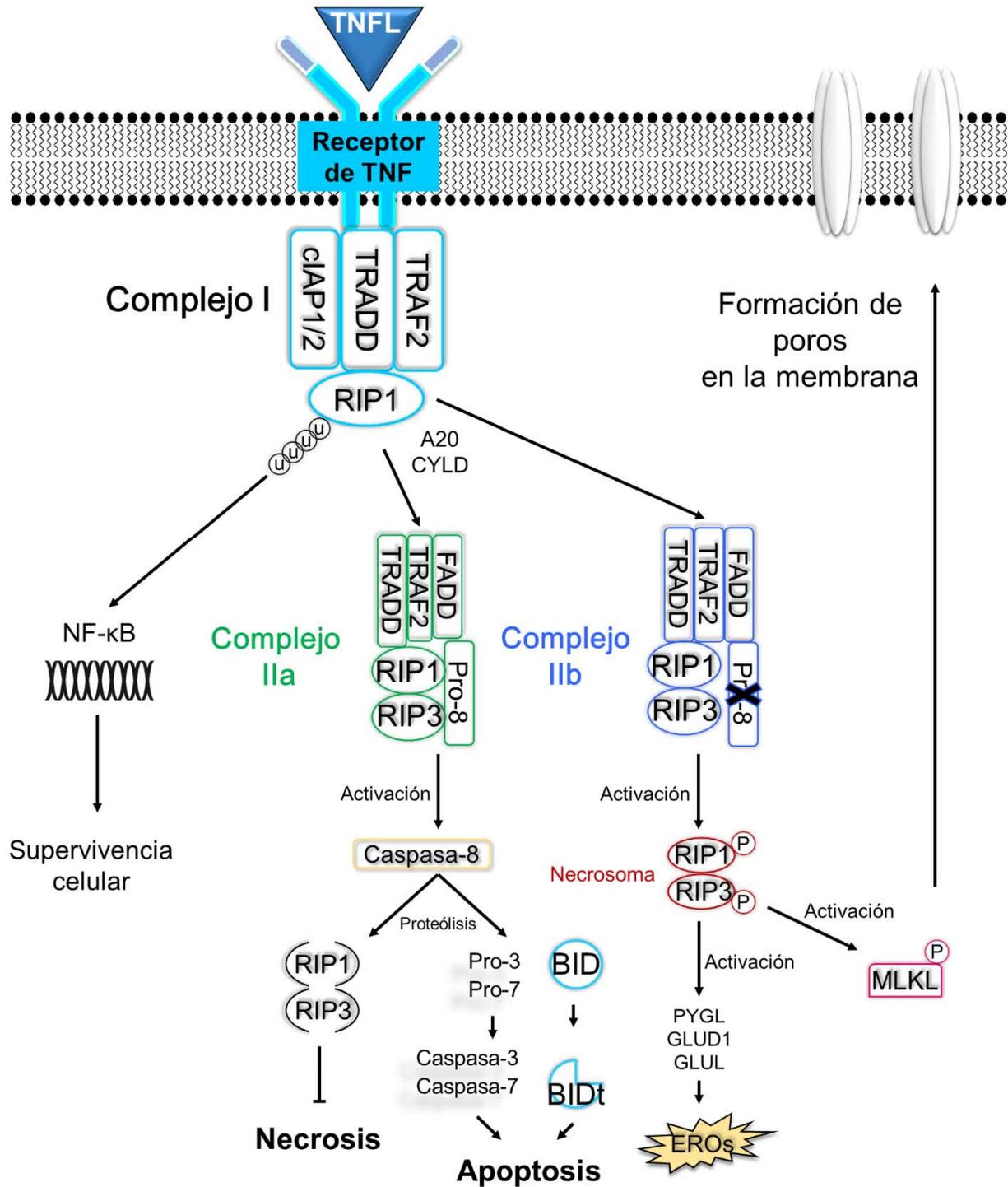


FIGURA 9. Muerte celular por necrosis. La activación del TNFR1 a través de su ligando conduce a 3 posibles vías de activación: i) vía de supervivencia celular a través de la activación de NF-κB; ii) vía de muerte celular por apoptosis a través de la activación de

caspasa-8 y iii) vía de muerte celular por necrosis a través de la activación de RIP3. TNFR1: receptor del factor de necrosis tumoral 1; TNFL: ligando del factor de necrosis tumoral 1; cIAP1/2: inhibidor celular de la apoptosis 1 y 2; TRADD: receptor del TNF asociado a través del dominio de muerte; TRAF2: factor 2 asociado al TNFR; RIP1/3: proteínas interactivas del receptor 1 y 3; NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa; tBID: BID truncado; PYGL: fosforilasa glucógeno; GLUD1: glutamato deshidrogenasa I; GLUL: glutamato-amonio ligasa; EROs: especies reactivas de oxígeno; MLKL: proteína de tipo dominio cinasa de linaje mixto; Pro-3: procaspasa-3; Pro-7: procaspasa-7; Pro-8: procaspasa-8; u: ubiquitina; P: fosforilación.

La muerte celular por necrosis también se asocia con la formación de un poro no específico mitocondrial llamado poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm). La sobrecarga de calcio en la mitocondria y el estrés oxidativo son elementos que inducen la apertura del PTPm. La apertura del poro une a la membrana mitocondrial externa e interna y el modelo clásico de los componentes del poro incluye al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna, y la ciclofilina D (CypD) en la matriz mitocondrial. El PTPm permite la difusión de moléculas de ≤ 1.5 kDa, desacopla la fosforilación oxidativa, disminuye el ATP intracelular, hace que la mitocondria se hinche por el libre paso de agua a través del PTPm y esto puede causar ruptura de la membrana externa, lo que lleva a la liberación de las proteínas apoptóticas que se encuentran en la mitocondria y a la activación de la vía de apoptosis (Figura 10) [Halestrap *et al.*, 2004; Karch y Molketin, 2015].

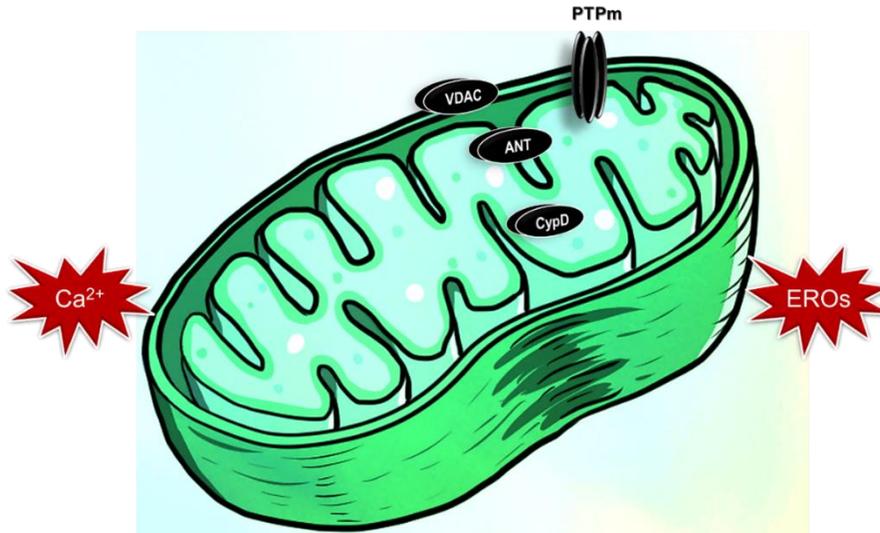


FIGURA 10. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial. La formación del PTPm es consecuencia de estrés en la mitocondria por sobrecarga de calcio y formación de EROs. El PTPm une a las dos membranas mitocondriales para formar un poro inespecífico conformado por proteínas que se encuentran en la mitocondria. PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje; ANT: translocador de nucleótidos de adenina; CypD: ciclofilina D; Ca^{2+} : calcio; EROs: especies reactivas de oxígeno.

1.7.3 Calpaínas

Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteína localizadas en el citosol, su actividad enzimática depende de la concentración de calcio en la célula. En condiciones patológicas, tanto la activación como la falta de la actividad de las calpaínas se ha asociado en distrofia muscular, isquemia cardiaca y cerebral, agregación plaquetaria, neurodegeneración, artritis reumatoide, formación de cataratas y enfermedad de Alzheimer. Se dividen en 2 grupos de acuerdo con la concentración de calcio necesaria para su activación: μ -calpaínas, requieren concentraciones micromolares de calcio (3-50 μ M); m -calpaínas, requieren concentraciones milimolares de calcio (0.4-0.8 mM). Los dos grupos de calpaínas se conforman por dos subunidades: una larga y una corta.

La subunidad larga o subunidad catalítica pesa aproximadamente 80 kDa y se divide en 4 dominios: i) dominio I, región NH₂-terminal, tiene una α -hélice única que se ancla en una cavidad del dominio VI, lo que estabiliza la disposición circular de la proteína. El dominio I es autolisado cuando las calpaínas se activan por calcio; ii) dominio II, dominio de proteasa conservado, contiene el sitio catalítico y se divide en los subdominios IIa y IIb, que cuando el calcio se une en el dominio correspondiente se forma una triada catalítica con la conformación que se describe en la Tabla 1; iii) dominio III, contiene dominios similares a los C2 de proteínas como la fosfolipasa C o la proteína cinasa C (PKC) que interactúan con calcio o con fosfolípidos; iv) dominio IV, región carboxi-terminal, contiene 5 sitios EF involucrados en la unión del calcio y en la dimerización de las subunidades a través de los EF.

TABLA 1. Localización de los residuos de aminoácidos que conforman a la triada catalítica de la μ -calpaína y de la m -calpaína.

μ -calpaína	m -calpaína
Residuo de cisteína en posición 115 Residuo de histidina en posición 272 Residuo de asparagina en posición 296	Residuo de cisteína en posición 105 Residuo de histidina en posición 262 Residuo de asparagina en posición 286

La subunidad corta o subunidad reguladora pesa aproximadamente 28 kDa y se divide en 2 dominios: i) dominio V, región NH₂-terminal, contiene una serie de residuos de glicina que pueden permitir la interacción con la membrana plasmática. Se autolisa durante la activación de la calpaína; ii) dominio VI, región carboxi-terminal, contiene 5 sitios EF involucrados en la unión del calcio y en la dimerización de las subunidades a través de los EF (Figura 11) [Goll *et al.*, 2003; Khorchid e Ikura, 2002; Storr *et al.*, 2011].

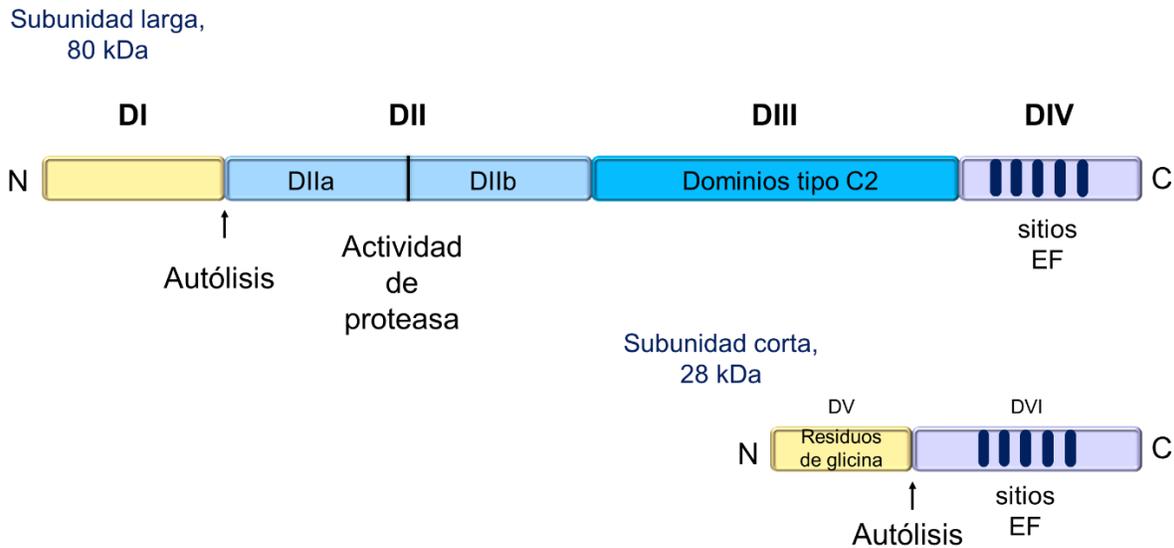


FIGURA 11. Estructura de las calpaínas. Representación esquemática de la estructura de los dominios de la subunidad larga y la subunidad corta. N: NH₂-terminal; C: carboxi-terminal, DI: dominio I; DII: dominio II; DIII: dominio III; DIV: dominio IV; DV: dominio V; DVI: dominio VI; DIIa: subdominio II a; DIIb: subdominio II b.

1.8 Óxido nítrico y muerte celular

Se sabe que el ON• puede limitar la muerte celular por apoptosis mediante la activación de la vía dependiente de GMPc, al incrementar la relación de proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas (BCL-2/BAX) [Das *et al.*, 2006].

Además de los efectos cardioprotectores dependientes de la vía de GMPc, el ON• puede modificar la estructura de las proteínas a través de la S-nitrosilación. De hecho, algunos estudios han demostrado efectos cardioprotectores mediados por este mecanismo. Sun *et al.* en 2007 describieron que al tratar corazones de ratón I-R con S-nitrosoglutatión (GSNO) disminuye el tamaño del infarto en comparación con grupos no tratados; mientras que otro grupo demostró un aumento en S-nitrosilación de proteínas al activar receptores de estrógeno en ratones hembra ovariectomizadas. Los efectos de los estrógenos se han atribuido a la unión de los estrógenos a sus receptores nucleares

clásicos (ERs). Los estrógenos tienen efectos rápidos en el corazón, al activar vías de señalización a corto plazo. Se ha informado que en ratones hembra la actividad de la NOS aumenta en el corazón, mientras que otros estudios revelan que la activación de los ERs regula la producción de ON^\bullet en cardiomiocitos [Cross *et al.*, 2002; Nuedling *et al.*, 2001].

2. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos a través de los cuales el ON• puede participar en la cardioprotección al miocardio son diversos y dependerán de los niveles de ON• y de la proteína blanco. En relación con la muerte por apoptosis, se ha descrito que todas las caspasas tienen un sitio catalítico esencial para su actividad, el cual contiene cisteínas reactivas que son susceptibles de ser nitrosiladas en presencia de ON•, lo que resulta en la inactivación de estas proteasas [Jones y Bolli, 2006; Dimmeler *et al.*, 1997]. Por otro lado, se ha informado que las calpaínas también son susceptibles ante la modificación por ON•, debido a que su actividad catalítica disminuye cuando se expone a compuestos que liberan ON• [Michetti *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 2016].

Por lo tanto, en este proyecto se planteó estudiar la participación de la S-nitrosilación, particularmente sobre la actividad de la caspasa-3 y de la calpaína-1, en relación con la disminución de la muerte celular en corazones isquémicos-reperfundidos.

Los compuestos que se utilizaron como tratamiento contra el daño por I-R fueron los siguientes:

- i) Prolame, un compuesto amino-estrogénico que se sintetizó a partir del diamino-estrógeno prodiamine. Se describió que el prodiamine tenía efectos anticoagulantes, pero al incrementar la dosis se provocaban convulsiones. El amino-estrógeno Prolame mostró actividad anticoagulante similar al Prodiamine, pero sin provocar convulsiones [Fernández *et al.*, 1985]. Se describió que el Prolame produce incremento dosis-dependiente en el tiempo de coagulación de la sangre, no genera accidente cardiovascular y que podría ser usado como tratamiento contra la trombosis [Rubio-Poó *et al.*, 1985]. También se describió el efecto de inhibición dosis-dependiente del Prolame sobre la agregación plaquetaria [De la Peña *et al.*, 1993]. Por otro lado, se describió que el Prolame induce la producción de ON• en células endoteliales, plaquetas y en un modelo de ratón *in vivo*; y se sugirió que el incremento del ON• se atribuyó parcialmente

a los receptores de estrógenos nucleares [González *et al.*, 2010]. Posteriormente, se describió que el Prolame activó a la vía de PI3K/Akt/NOSe, en correlación con el incremento de ON• [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015].

- ii) SNAP, es un nitrosotiol que dona ON•. Se describió que su vida media es de aproximadamente 4.6 horas *in vitro* [Ignarro *et al.*, 1981] y que no requiere ninguna acción metabólica para liberar al ON• [Shaffer *et al.*, 1992]. Se observó en experimentos sobre anillos aislados de la arteria coronaria que una dosis simple de SNAP indujo su relajación rápida [Henry *et al.*, 1989]. También se describió que el SNAP es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria [Salas *et al.*, 1994]. En ensayos *in vitro*, se mostró que en condiciones de hipoxia y reoxigenación, el tratamiento con SNAP confirió efectos protectores contra el daño por reoxigenación [Görbe *et al.*, 2015; Rakhit *et al.*, 2001].

3. HIPÓTESIS

El ON• intracelular activará las vías dependiente e independiente de GMPc, participando en la protección al miocardio isquémico-reperfundido. La regulación de la actividad de las proteasas caspasa-3 y/o calpaína-1 dependerá de la vía independiente de GMPc a través de la S-nitrosilación.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la contribución de las vías dependiente e independiente de GMPc en la cardioprotección de corazones isquémicos-reperfundidos y determinar el papel de la S-nitrosilación en la actividad de proteínas que participan en muerte celular.

4.2 Objetivos particulares

- a. Evaluar el efecto del Prolame y del SNAP sobre la función cardiaca del miocardio isquémico-reperfundido.
- b. Evaluar el efecto del Prolame y del SNAP sobre el daño inducido por I-R, midiendo el tamaño del infarto.
- c. Evaluar el efecto del Prolame y del SNAP en relación con el contenido de ON•.
- d. Evaluar el efecto de la cardioprotección sobre la función cardiaca observada con Prolame y SNAP en presencia de dos inhibidores: el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) y el inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, N ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME).
- e. Evaluar el contenido de GMPc para observar la participación de la vía dependiente e independiente de GMPc en los grupos tratados con los Prolame o SNAP más los inhibidores.
- f. Evaluar si el incremento del ON• induce la inactivación de proteasas relacionadas con la apoptosis, midiendo el contenido y la actividad de la caspasa-3, -8 y -9.
- g. Evaluar si el incremento del ON• induce la inactivación de la proteasa relacionada con la necrosis, midiendo el contenido y la actividad de la calpaína-1.
- h. Evaluar la posible S-nitrosilación de proteínas involucradas en procesos de muerte celular.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Aprobación ética

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC-13806) y el trabajo experimental siguió las pautas de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para la eliminación de residuos biológicos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

5.2 Modelo experimental

Las ratas Wistar macho de 300-350 g se anestesiaron por inyección intraperitoneal con una dosis simple de pentobarbital sódico (60 mg/kg) más heparina de sodio. El corazón del animal se removió quirúrgicamente y se colocó en un recipiente con solución de Krebs congelada; rápidamente se localizó la aorta y se insertó en la cánula y para perfundir al corazón de manera retrógrada en el sistema de Langendorff Radnoti a flujo constante de 12 ml/min con la solución de Krebs-Henseleit (cloruro de sodio 118 mM, bicarbonato de sodio 25 mM, glucosa 5 mM, octanoato de sodio 0.1 mM, cloruro de potasio 4.75 mM, fosfato de potasio monobásico 1.18 mM, sulfato de potasio 1.18 mM, cloruro de calcio 2.5 mM, pH 7.37) que se burbujeó continuamente con oxígeno al 95% y dióxido de carbono al 5% y se mantuvo a temperatura constante de 37°C (Figura 12).

La isquemia se realizó apagando la bomba que perfunde la solución de Krebs-Henseleit, por lo que el miocardio se quedó sin solución que lo perfunda. La reperfusión se realiza al encender de nuevo la bomba de perfusión.

El trabajo cardiaco del miocardio durante el protocolo experimental se midió mediante la inserción de un balón de látex en el ventrículo izquierdo que calculó automáticamente la presión ventricular izquierda desarrollada (LVDP) y la frecuencia cardiaca (FC) a través del sistema de adquisición digital LabChart 8.1.5 Pro. La frecuencia cardiaca se representó como el número de latidos por minuto y la presión ventricular izquierda en

milímetros de mercurio (mmHg). El doble producto (DP) se obtuvo al multiplicar la FC por la LVDP.

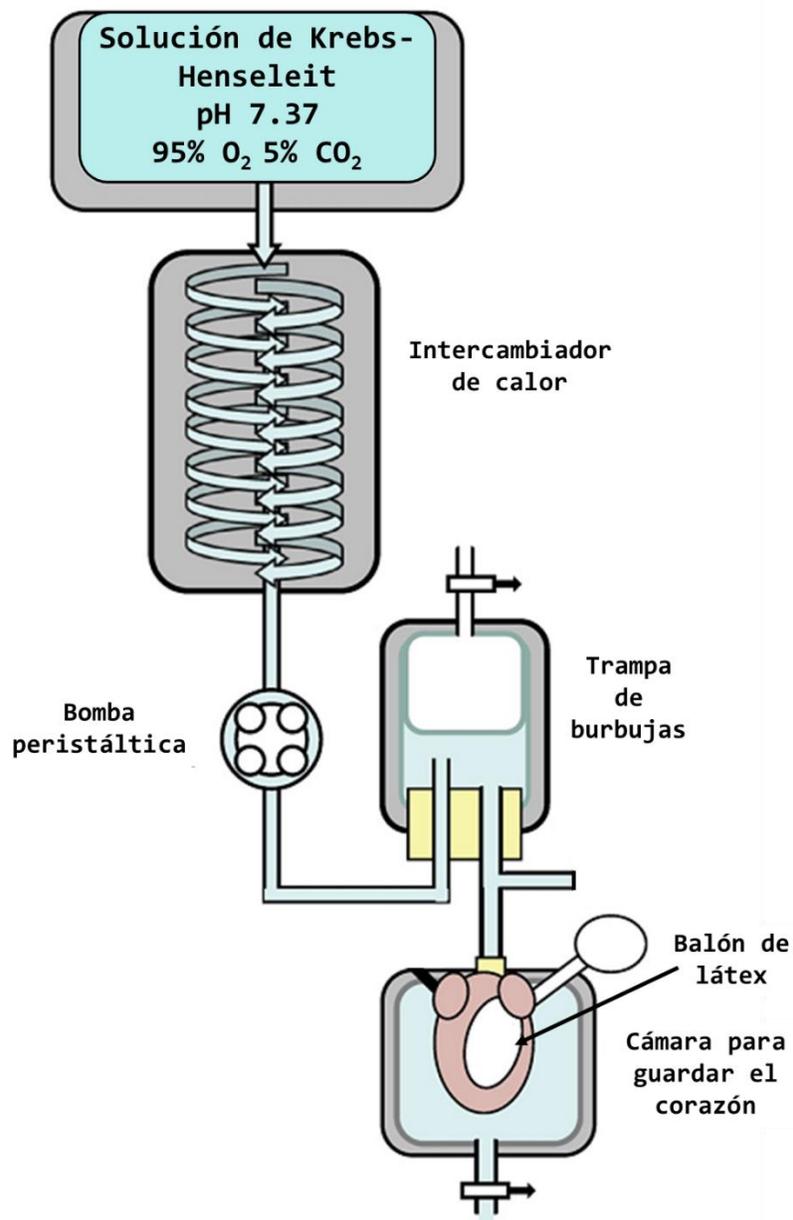


FIGURA 12. Sistema de perfusión de corazón aislado Langendorff. La solución de Krebs-Henseleit se coloca en un recipiente que mantiene la temperatura constante a través de un intercambiador de calor. La solución se perfunde a través de una bomba peristáltica y las burbujas que puedan formarse se quedan en una trampa de burbujas para evitar que lleguen al corazón. Se inserta un balón de látex en el ventrículo izquierdo para medir la

presión y la frecuencia cardiaca. La cámara para guardar el corazón mantiene una temperatura constante de 37°C.

5.2.1 Grupos experimentales

Se establecieron 4 grupos experimentales (Figura 13):

- GRUPO CONTROL, miocardio perfundido por 110 minutos.
- GRUPO ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (I-R), miocardio sujeto a isquemia global por 30 minutos y reperfusión por 60 minutos.
- GRUPO I-R+PROLAME, miocardio perfundido con 1.25 μM de Prolame por 5 minutos antes de la isquemia global.
- GRUPO I-R+SNAP, miocardio perfundido con 2 μM de SNAP por 5 minutos antes de la isquemia global y durante los 10 primeros minutos de la reperfusión.

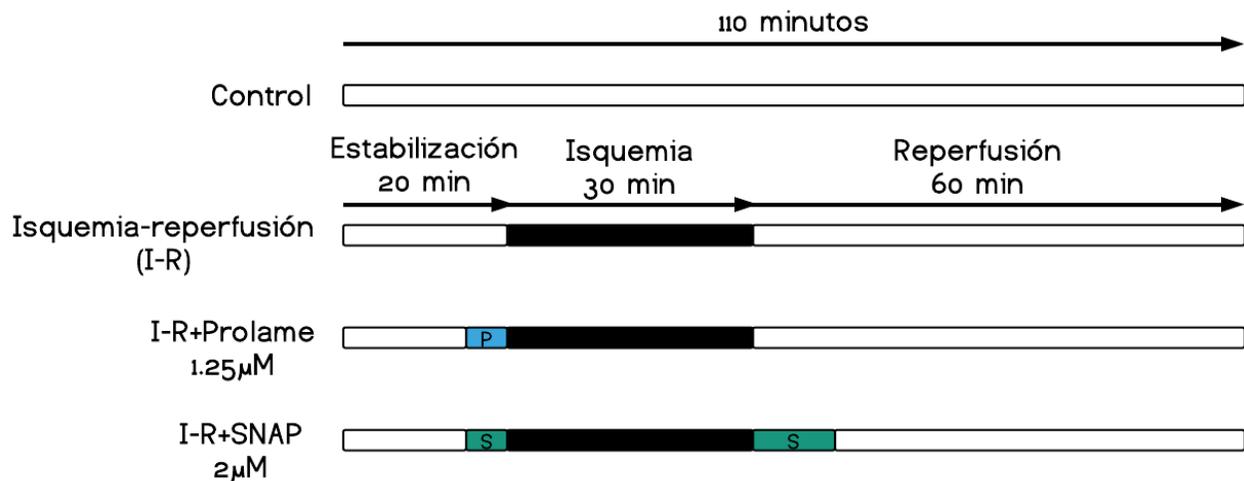


FIGURA 13. Representación esquemática de los grupos experimentales. Los compuestos Prolame o SNAP se perfundieron al miocardio a través de la solución de Krebs-Henseleit.

La concentración de Prolame o SNAP que se utilizó en el protocolo experimental se estableció realizando experimentos de dosis-respuesta de la recuperación de la función cardiaca post-isquemia.

Se establecieron grupos experimentales en los que se administraron inhibidores de la GCs (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona; ODQ) y de la NOS (N ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro; L-NAME) (Figura 14):

- e. GRUPO I-R+PROLAME+ODQ, miocardio perfundido con 50 μ M de ODQ durante los primeros 15 minutos en la estabilización.
- f. GRUPO I-R+PROLAME+L-NAME, miocardio perfundido con 15 μ M de L-NAME durante los primeros 15 minutos en la estabilización.
- g. GRUPO I-R+SNAP+ODQ, miocardio perfundido con 50 μ M de ODQ durante los primeros 15 minutos en la estabilización.

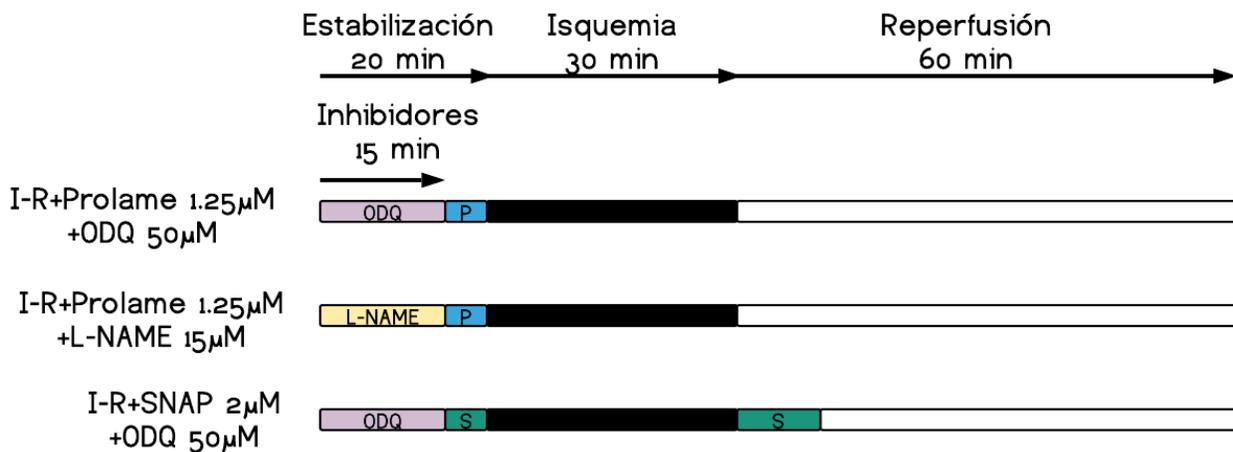


FIGURA 14. Representación esquemática de los grupos experimentales tratados con inhibidores. Los inhibidores ODQ y L-NAME se perfundieron a través de la solución de Krebs-Henseleit por 15 minutos durante el periodo de estabilización.

Tanto el SNAP como el ODQ son sensibles a la luz, por lo que la preparación de los reactivos, la perfusión de los corazones y la preparación de muestras se realizó en la oscuridad.

5.3 Medición del tamaño del infarto

El tamaño del infarto se midió por la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio [Ramírez-Camacho *et al.*, 2016]. El tejido cardíaco se quitó con cuidado de la cánula, se puso sobre una gasa dentro de un recipiente de vidrio y se congeló a -20°C por 60 minutos para cortarlo manualmente con un bisturí de manera transversal en rebanadas delgadas. Las rebanadas se incubaron en la solución de tinción (fosfato de sodio dibásico 0.1 M pH 2.2, fosfato de sodio monobásico 0.1 M pH 7.7, cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio 1%) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, las rebanadas se enjuagaron con agua destilada por 5 minutos y se fijaron con una solución de formol 5% sumergiendo las rebanadas por 5 minutos. Las rebanadas teñidas se comprimieron entre dos placas de cristal para observar la tinción del tejido. El tejido vivo presentó un color rojo brillante, mientras que las áreas muertas son blancas o incoloras. Las imágenes del tejido se digitalizaron y se analizaron usando el programa ImageJ 1.48 midiendo en píxeles las áreas pálidas. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje de muerte celular y se calculó al dividir el área muerta entre el área total del tejido.

5.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry [Lowry *et al.*, 1951]. Se prepararon las muestras en una dilución 1:200 (1 µl muestra + 199 µl agua destilada), y la curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB) de acuerdo con la Tabla 2. Se preparó la solución C mezclando la solución A (carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0.4%, tartrato de sodio 0.02%) y la solución B (sulfato de cobre al 0.5%) en una

proporción de 25 ml de solución A + 0.5 ml de solución B y se agregó a cada tubo con muestra o con ASB 1 ml de solución C. Se agregó el reactivo de Folín-Ciocalteau diluido 1:2 con agua destilada. Se agregaron 100 µl de solución D a cada muestra y a los tubos de la curva estándar, se agitó y se dejó incubar en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. Las lecturas de cada muestra se extrapolaron con los datos de la curva estándar de ASB.

TABLA 2. Concentraciones de albúmina sérica bovina para la elaboración de la curva estándar.

µg de ASB/ 0.2 ml	Stock de ASB (microlitros)	Agua destilada (microlitros)
0	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

5.5 Obtención de fracción citosólica

Se extrajo la fracción citosólica de las muestras de acuerdo con el protocolo descrito por Inserte *et al.* (2004). El tejido cardíaco fresco se picó finamente con tijeras y se homogenizó en un homogenizador de vidrio con pistilo en solución tris salina (Tris · HCl 100 mM, cloruro de sodio 145 mM, EDTA 10 mM; pH 7.3) y se centrifugó a 15,000 x *g* por 10 min a 4°C. La fracción del sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100,000 x *g* por 60 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. La proteína del sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry.

5.6 Determinación del contenido de nitritos

El contenido de nitrito se midió por la reacción de Griess [Guevara *et al.*, 1998]. El tejido cardíaco previamente congelado en nitrógeno líquido se pulverizó en un mortero con pistilo y se homogenizó en solución dPBS (Tris 50 mM, cloruro de sodio 120 mM, Tergitol 0.05%; pH 8.0). Los homogenizados se centrifugaron a 16,000 x *g* por 20 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se filtró en tubos de filtrado de 10 kDa. Se cuantificó la proteína de los filtrados por el método de Lowry. Se tomó la cantidad de lisado filtrado equivalente a 500 µg de proteína y se llevó hasta 40 µl con agua destilada. Al mismo tiempo se preparó la curva estándar de nitrato de sodio de acuerdo con las concentraciones de la Tabla 3. Se preparó la enzima nitrato reductasa bacteriana tomando el equivalente en peso a 0.007 unidades por cada tubo de acuerdo con el número de muestras y curva estándar, se diluyó en solución de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 140 mM, pH 7.5 y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se agregó a las muestras y a la curva 10 µl de la enzima preparada, 20 µl de NADPH 2.4 µM disuelto en KH₂PO₄ 140 mM, pH 7.5 y 30 µl de KH₂PO₄ 140 mM pH 7.5. Se agitó y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 µl del reactivo de Griess (100 µl de sulfanilamida 0.1% disuelta en ácido fosfórico al 2.5% y 100 µl de N-(1-Naftil) etilendiamina dihidrocloruro 0.5% disuelto en

ácido fosfórico al 2.5%). Se mezcló suavemente y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente.

La reacción colorimétrica se midió por espectrofotometría a 540 nm en una celda de cuarzo. La concentración de nitrito de los grupos experimentales se determinó a partir de las lecturas de la curva estándar de nitrato de sodio y las concentraciones de las muestras se expresaron como [nmol de nitrito/mg de proteína].

TABLA 3. Concentraciones de nitrato de sodio para la elaboración de la curva estándar.

nM de NaNO ₃	NaNO ₃ [1 μM] (μl)	Agua destilada (μl)
0	0	40
25	1	39
50	2	38
100	4	36
200	8	32
300	12	28
500	20	20

5.7 Contenido de GMPc

Se utilizaron las herramientas del estuche Cyclic GMP EIA Cat. No. 5810212 de Cayman Chemical y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se preparó la solución EIA diluyendo un frasco de EIA concentrado en 90 ml de agua destilada y se preparó la solución de lavado diluyendo un frasco de lavado concentrado en agua destilada para un

total de 2 litros y se agregó 1 ml de polisorbato 20. El tejido previamente congelado en nitrógeno líquido se pulverizó en un mortero con pistilo, se pesó y se le añadieron 5 volúmenes de ácido tricloroacético al 5% (TCA) y se homogenizó. Se centrifugó a 2000 x g por 10 minutos a 4°C, se rescató el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Se eliminó el TCA de las muestras agregando 5 volúmenes de agua saturada con éter, se mezcló por 10 segundos y se dejó separar la fase acuosa y la fase orgánica. Con cuidado se eliminó la capa de arriba y la extracción se repitió dos veces más. El éter residual se eliminó calentando las muestras a 70°C por 5 minutos. Se preparó una solución similar de TCA 5% tratada con agua saturada con éter para la preparación de la curva estándar.

Se reconstituyó el contenido del frasco con estándar de GMPc EIA (No. 481024) con 1 ml de solución EIA y para una concentración final de 300 pmol/ml. Para la curva de GMPc, se prepararon 8 tubos y se le agregó al tubo 1 900 µl de TCA al 5% extraído con agua saturada con éter y a los tubos 2 a 8 se les agregaron 500 µl de TCA al 5% extraído con agua saturada con éter. Se tomó una alícuota de 100 µl del estándar de GMPc EIA [300 pmol/ml], se añadió al tubo 1 y se mezcló. Se hicieron diluciones seriales tomando 500 µl del tubo 1 y transfiriéndolos al tubo 2. Del tubo 2 se tomaron 500 µl, se pusieron en el tubo 3 y se mezcló. Este proceso se repitió para los tubos 4-8 (Figura 15).

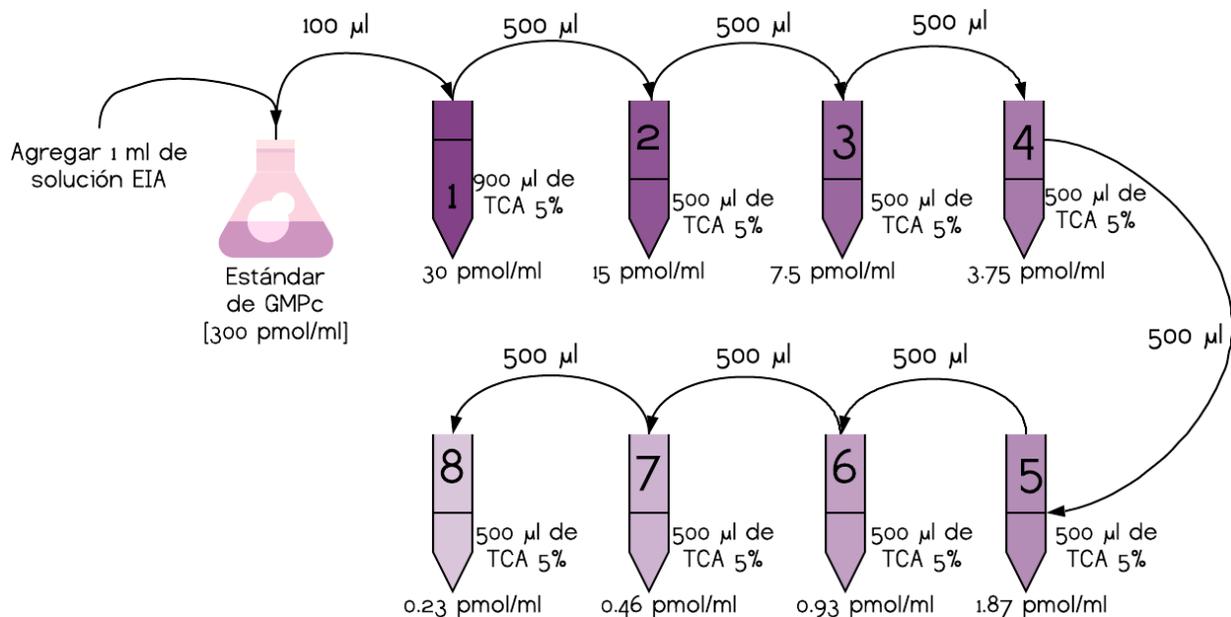


FIGURA 15. Representación esquemática de la preparación de los estándares de GMPc.

A continuación, las muestras y los estándares se cargaron en una microplaca negra de 96 pozos. La placa incluyó pozos blanco (Blk), pozos de unión no específica (NSB) pozos de unión máxima (B₀) y un pozo de actividad total (TA). La adición de los reactivos se realizó como se muestra en la Tabla 4. Se cubrió y se incubó la placa por 18 horas a 4°C y al día siguiente se reconstituyó el reactivo de Ellman con 20 ml de agua destilada. Se vaciaron los pozos con cuidado y se enjuagaron 5 veces con solución de lavado. Se agregaron 200 µl de reactivo de Ellman a todos los pozos y 5 µl de trazador a los pozos de TA. Se cubrió la placa de la luz y se agitó 90 minutos a temperatura ambiente. La lectura de la microplaca se realizó a 405 nm, cuidando que los pozos B₀ tuvieran un valor entre 0.3-1.0 de unidades arbitrarias.

TABLA 4. Adición de los reactivos en la microplaca.

Pozo	Solución EIA	Estándar/muestra	Trazador	Anticuerpo
Blk	--	--	--	--
TA	--	--	5 µl	--
NSB	100 µl	--	50 µl	--
B ₀	50 µl	--	50 µl	50 µl
Estándar/muestra	--	50 µl	50 µl	50 µl

5.8 Extracción y corrimiento de ADN

Se observó la integridad del ADN en un gel de agarosa de acuerdo con el protocolo descrito por Itoh *et al.* (1995). El tejido previamente congelado en nitrógeno líquido se pulverizó en un mortero con pistilo y se homogenizó en solución de extracción (Tris 10 mM, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%; pH 8.0), se agregaron 20 µg/ml de RNAsa y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 µg/ml de proteinasa K y se incubó toda la noche a 50°C. Al día siguiente se agregó a las muestras un volumen

igual al volumen acuoso de fenol ajustado con un amortiguador de Tris y se mantuvieron en agitación constante por 60 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 4000 x g por 30 minutos a temperatura ambiente, la fase acuosa-viscosa se separó cuidadosamente y se transfirió a un nuevo tubo. La extracción se repitió agregando un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1 v/v). La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el ADN se precipitó agregando 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto. El ADN se centrifugó a 4000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente para recolectarlo, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente y se agregó etanol 70% para enjuagar el ADN. Se dejaron secar los tubos por 10 minutos y el ADN se resuspendió en 250 µl de solución de extracción. Se midió la concentración de ADN por espectrofotometría a 260 nm. Para detectar la escisión internucleosomal, se cargaron 10 µg de ADN en un gel de agarosa al 1.8% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, disueltos en solución de corrimiento para ADN (TBE) (Tris 89.1 mM, ácido bórico 88.9 mM, 4ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0), se sumergió en solución TBE y se corrió a una diferencia de potencial de 50 V. Posteriormente, el patrón de corrimiento de ADN se visualizó bajo luz UV.

5.9 Ensayo de TUNEL

Se realizó el ensayo de TUNEL de acuerdo con el protocolo descrito por Liu *et al.* (2004). Muestras frescas de corazón se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador PBS, pH 7.4, se lavaron con PBS 3 veces por 5 minutos cada una y se incubaron en sacarosa 30% por 24 horas a 4°C. Se obtuvieron criosecciones transversales de cada corazón de 10 µm en un criostato Minotome PLUS™ y se montaron en portaobjetos gelatinizados. Las secciones de tejido se rehidrataron en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron por 2 minutos a 4°C con una solución fresca de tritón X-100 al 0.1% disuelto en citrato de sodio dihidratado al 0.1% y se lavaron con PBS 2 veces por 5 minutos cada vez. Cada sección de tejido se redondeó con una pluma hidrofóbica y se incubó con la mezcla de la reacción de TUNEL (terminal

deoxi nucleotido transferasa más mezcla de nucleótidos en solución de reacción) en una atmósfera húmeda por 60 minutos a 37 °C protegida de la luz. Después de la incubación, las rebanadas se lavaron con PBS 3 veces por 5 minutos cada vez, se añadió 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI), para observar el núcleo y montarlo para el análisis de microscopía de fluorescencia (Fluor Cell Imaging Station, Life Technologies). Se incluyeron en el ensayo secciones de tejido negativas (sin transferasa en la solución de reacción) y controles positivos pretratados con 3000 U/ml de DNasa recombinante disuelta en Tris · HCl 50 mM pH 7.5, ASB 1 mg/ml).

5.10 Contenido de caspasa-3, -8, -9 y calpaína-1

A la fracción citosólica de corazón previamente extraída, se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Se prepararon las muestras con tampón de muestra 5x (Tris · HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 45%, 2 ml de SDS 25% disuelto en Tris · HCl, azul de bromofenol 0.25%, 2-Mercaptoetanol 12.5%), solución Tris salina y el homogenado total. Los geles de acrilamida se prepararon a una concentración de 13% para caspasa-3, 12% para caspasa-8 y -9 y 10% para calpaína-1; se cargaron 50 µg de proteína total en cada pozo. Las proteínas se separaron metiendo los geles en una cámara de electroforesis llena de solución de corrimiento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%; pH 8.4) a una diferencia de potencial de 100 V. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana PVDF previamente activada con metanol por 1 minuto y remojada en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%; pH 8.4) a 15 V por 25 minutos. Las membranas se recuperaron y se enjuagaron por 5 minutos con solución TBS (Tris 25 mM, cloruro de sodio 149 mM; pH 7.29) y se cubrieron con leche descremada al 5% disuelta en TBS-T (Tris 25 mM, cloruro de sodio 149 mM, Tween 20 0.1%; pH 7.29) por 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario anti-caspasa-3, -8, -9 o anti-calpaína-1 se preparó a una concentración de 1:500 en leche descremada al 5% disuelta en TBS-T, se agregó a la membrana y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se quitó el anticuerpo primario de la membrana y se enjuagó con TBS-T 3 veces por 10 minutos cada vez y con TBS una vez por 10 minutos. Se preparó

el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una concentración de 1:25,000 en TBS-T, se agregó a la membrana y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el protocolo de lavados con TBS-T y TBS y se agregó sustrato quimioluminiscente a la membrana para exponerla en el sistema de documentación de geles BIO-RAD. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces por 30 minutos cada vez con la solución de lavado de inmunotransferencia (Tris · HCl 95.2 mM, SDS 0.1%, Tween 20 1%; pH 2.2); 2 veces por 10 minutos cada vez con PBS (cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2.7 mM, fosfato de sodio dibásico 10 mM, fosfato de potasio monobásico 1.8 mM; pH 7.4) y 2 veces por 5 minutos cada vez con TBS-T, se incubaron en leche descremada al 5% en TBS-T por 60 minutos y se preparó el anticuerpo primario anti-GAPDH a una concentración de 1:500 en de leche descremada al 5% disuelta en TBS-T, se agregó a la membrana y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se quitó el anticuerpo y se hicieron los lavados ya descritos, se incubó con anticuerpo secundario acoplado a HRP a una concentración de 1:25,000 en TBS-T por 60 minutos a temperatura ambiente, se repitió el protocolo de lavados con TBS-T y TBS. Se agregó sustrato quimioluminiscente y se expuso en el sistema de documentación de geles BIO-RAD.

Las bandas de interés de las proteasas y del control de carga se analizaron usando el programa ImageJ 1.48.

5.11 Actividad de caspasa-3, -8 y -9

Se midió la actividad de las caspasas con sustratos específicos. Se siguió el protocolo descrito por Du *et al.*, 2004. El tejido previamente congelado en nitrógeno líquido se pulverizó en un mortero con pistilo y se homogenizó en solución de HEPES [HEPES 100 mM, sacarosa 10%, tergitol 0.1%; pH 7.5]. Se agitaron las muestras en el vórtex y se homogenizaron. Se congelaron y descongelaron las muestras 3 veces y se centrifugaron a 18,000 x g por 30 minutos. Se rescató el sobrenadante y se cuantificó la proteína por el método de Lowry. Para la reacción enzimática, se tomó el equivalente en μl a 100 μg

de proteína y se cargaron en la microplaca de 96 pozos. Se agregó el sustrato colorimétrico a una concentración final de 200 μ M para caspasa-3 (Ac-DEVD-pNA), caspasa-8 (Ac-IETD-pNA) y caspasa-9 (Ac-LEHD-pNA). Se incubó la placa a 37°C por 60 minutos y se midió el producto de la escisión colorimétrica a una longitud de onda de 405 nm.

5.12 Actividad de calpaína-1

Se midió la actividad de la calpaína-1 con un sustrato específico. Se siguió el protocolo descrito por Kohli *et al.*, 1997. El tejido cardíaco fresco se picó finamente con tijeras y se homogenizó en un homogenizador de vidrio con pistilo en solución de lisis (Tris · HCl 100 mM, cloruro de sodio 145 mM y EDTA 10 mM; pH 7.3). Se centrifugó a 15,000 x *g* por 15 minutos a 4°C y se rescató el sobrenadante. La fracción del sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100,000 x *g* por 60 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína por el método de Lowry. Para la reacción enzimática se tomó el equivalente en μ l de 40 μ g de proteína y se agregó a la solución de reacción (Tris · HCl 100 mM y cloruro de sodio 145 mM; pH 7.3) en una microplaca de 96 pozos negra. Se agregó el sustrato fluorogénico específico para la calpaína-1 H-Lys(FAM)-Glu-Val-Tyr~Gly-Met-Met-Lys(DABCYL)-OH [H-K(FAM)-EVY~GMMK(DABCYL)-OH] a una concentración final de 10 μ M. Se incubó la placa a 37°C por 60 minutos y se midió el producto de la escisión fluorogénica a longitud de excitación de 490 nm y longitud de emisión de 518 nm.

5.13 Inmunoprecipitación de calpaína-1 y caspasa-3

Tejido previamente congelado en nitrógeno líquido se pulverizó en un mortero con pistilo y se homogenizó en PBS (cloruro de sodio 136.9 mM, cloruro de potasio 2.67 mM, fosfato de sodio dibásico 8.1 mM, fosfato de potasio monobásico 1.47 mM; pH 7.4).

El tejido homogenizado se agitó por 2 horas a 4°C y se centrifugó a 10,000 x *g* por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un nuevo tubo y se cuantificó la proteína por el método de Lowry. Se tomaron duplicados de muestras equivalentes a 1 mg de proteína en microlitros, se pusieron en un tubo nuevo etiquetado y se llevaron a 1 ml con PBS. Se tomaron 5 µl del anticuerpo de calpaína-1 acoplado a agarosa ó 5 µl del anticuerpo de caspasa-3 acoplado a agarosa, se incubaron con los sobrenadantes de los grupos experimentales y se mantuvieron en rotación toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras con anticuerpo se centrifugaron a 10,000 x *g* por 2 minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró con cuidado para no perturbar el botón y se agregó 1 ml de PBS, el tubo se invirtió suavemente con la mano para lavar el botón. De nuevo se centrifugaron las muestras con anticuerpo a 10,000 x *g* por 2 minutos a 4°C y se retiró con cuidado el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más y finalmente el botón se recuperó y se guardó para determinar la S-nitrosilación de las proteínas.

5.14 Ensayo de S-nitrosilación

Se utilizaron las herramientas del estuche de S-Nitrosylation Western Blot de Pierce™ con números de catálogo 90105 y 90106. A la proteína previamente inmunoprecipitada con calpaína-1 y caspasa-3 se le añadieron 100 µl de solución HENS (**HEPES** 100 mM pH 7.8, **EDTA** 1 mM, **Neocuproína** 0.1 mM, **SDS** 1%). Se le añadieron 2 µl de metilmetanotiosulfonato (MMTS) 1 M a cada muestra y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La proteína se precipitó agregando 600 µl de acetona previamente enfriada a cada tubo y los tubos se incubaron por 2 horas a -20°C para eliminar el MMTS. Las muestras se centrifugaron a 16,000 x *g* por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante invirtiendo los tubos cuidadosamente para no perturbar al botón. Se dejó secar el botón por 10 minutos. El botón de cada tubo se resuspendió en 50 µl de solución HENS y se agregó 1 µl del reactivo marcador a cada muestra y se agitó. Después se agregaron 2 µl de ascorbato de sodio 1 M a cada muestra y se agitó. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad y después se preparó la

muestra con tampón de muestra 5x libre de agentes reductores (Tris · HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 45%, 2 ml de SDS 25% disuelto en Tris · HCl, azul de bromofenol 0.25%). Se prepararon geles de acrilamida al 13% para caspasa-3 y al 10% para calpaína-1, se cargaron 25 µl de cada muestra en cada pozo, se llenó la cámara de electroforesis con solución de corrimiento y se mantuvo a una diferencia de potencial de 100 V. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana PVDF previamente activada con metanol por 1 minuto y remojada en solución de transferencia a 15 V por 25 minutos. Las membranas se recuperaron y se enjuagaron por 5 minutos con TBS, se agitaron en 5% de leche descremada en TBS-T por 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario anti-TMT se preparó a una concentración de 1:1000 en leche descremada al 5% disuelta en TBS-T, se agregó a la membrana y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se quitó el anticuerpo primario y se enjuagó la membrana con TBS-T 3 veces por 10 minutos cada vez y con TBS una vez por 10 minutos. Se preparó el anticuerpo secundario a una concentración de 1:25,000 en TBS-T y se agregó a la membrana en agitación por 60 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el protocolo de lavados con TBS-T y TBS y se agregó sustrato quimioluminiscente a la membrana para exponerla en el sistema de documentación de geles BIO-RAD. Las bandas de interés de las proteasas nitrosiladas se analizaron usando el programa ImageJ 1.48.

5.15 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni, utilizando el software Graph Pad PRISM 5 para Windows versión 5.03. Los resultados se expresaron como media±DE o como se indica en el texto; los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Los compuestos Prolame y SNAP mantienen la función cardíaca de corazones sometidos a isquemia-reperfusión

La función contráctil se expresó como doble producto (DP=presión ventricular x frecuencia cardíaca). El grupo Control mantuvo la función contráctil constante durante los 110 minutos de perfusión. El valor del DP disminuyó durante el periodo de reperfusión en el grupo I-R. La administración de Prolame (1.25 μM) o SNAP (2 μM) en los grupos experimentales sometidos a I-R recuperaron y mantuvieron la función cardíaca durante la reperfusión ($P < 0.05$, Figura 16).

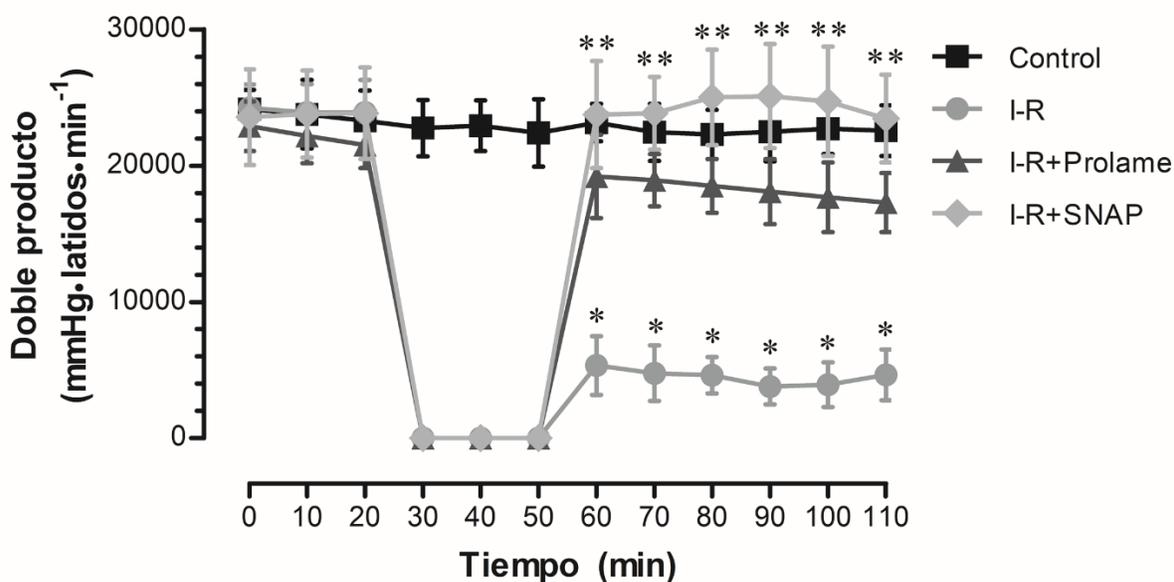


FIGURA 16. El doble producto de los grupos experimentales. La función cardíaca se expresa como el doble producto (DP= frecuencia cardíaca x presión ventricular) de los grupos experimentales. Los valores se expresan como la media \pm DE de 8 experimentos independientes por grupo. * $P < 0.05$ vs. todos los grupos; ** $P < 0.05$ I-R+SNAP vs. I-R+Prolame.

6.2 Los compuestos Prolame y SNAP mantienen los niveles de óxido nítrico y reducen el tamaño del infarto de corazones reperfundidos

El tamaño del infarto de los grupos experimentales tratados con Prolame o SNAP disminuyó significativamente respecto al grupo I-R (9 ± 1 y 6 ± 2 vs. $56\pm 2\%$ de muerte celular, respectivamente; $P < 0.05$, Figura 17A).

El contenido de nitrito, un indicador de los niveles de ON^{\bullet} , disminuyó significativamente en el grupo I-R comparado con el grupo Control (3.8 ± 0.9 vs. 41.5 ± 6.7 nmol nitrito/mg proteína; $P < 0.05$, Figura 17B). En los grupos experimentales a los que se les administró Prolame o SNAP, los niveles de nitrito se incrementaron a niveles más altos que en el grupo Control (I-R+Prolame: 84.1 ± 5.6 e I-R+SNAP: 120.8 ± 7.3 nmol de nitrito/mg de proteína, Figura 17B). Los datos obtenidos se relacionan con la recuperación de la función contráctil después de la isquemia.

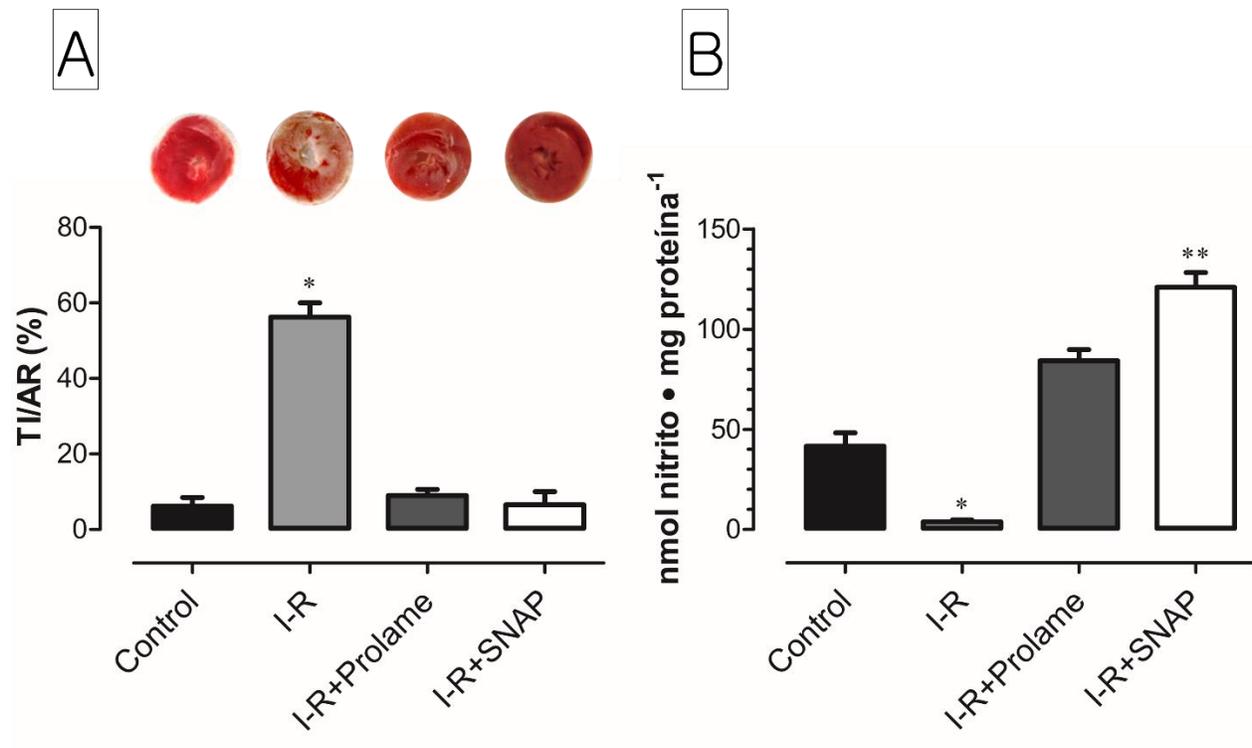


FIGURA 17. Tamaño del infarto y contenido de nitritos. **A.** Imágenes representativas de corazones procesados con la tinción con TTC. La gráfica muestra el tamaño del infarto de cada grupo experimental expresado como porcentaje de tamaño del infarto/área de riesgo. Los valores se expresan como la media \pm DE de 5 experimentos independientes por grupo. *P<0.05 vs. todos los grupos experimentales. **B.** Contenido de óxido nítrico en los grupos experimentales medido en forma de nitrito. Los valores se expresan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por grupo. *P<0.05 vs. todos los grupos; **P<0.05 vs. I-R+Prolame.

6.3 La contribución de las vías de acción de óxido nítrico dependiente e independiente de GMPc en el efecto cardioprotector de Prolame o SNAP

Para evaluar la participación de los mecanismos dependientes e independientes de GMPc activados por ON \cdot en la recuperación de la función cardíaca inducida por Prolame o SNAP, se administraron inhibidores de dos componentes de la vía de acción del ON \cdot : el inhibidor de la GCs, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) y el inhibidor de la NOS, N ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME). El ODQ y el L-NAME se administraron al grupo I-R+Prolame (Figura 18); mientras que al grupo I-R+SNAP sólo se le administró el compuesto ODQ (Figura 19).

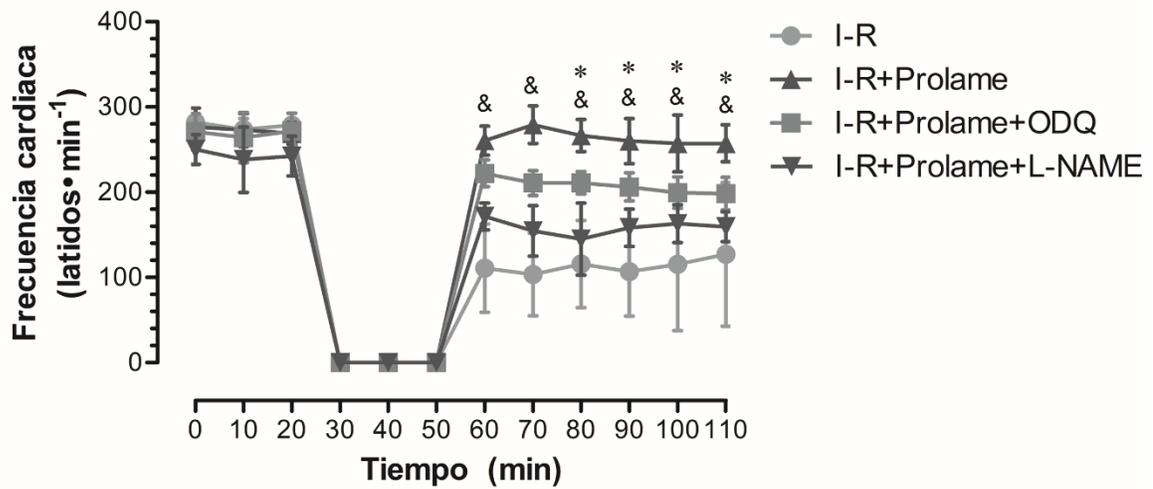
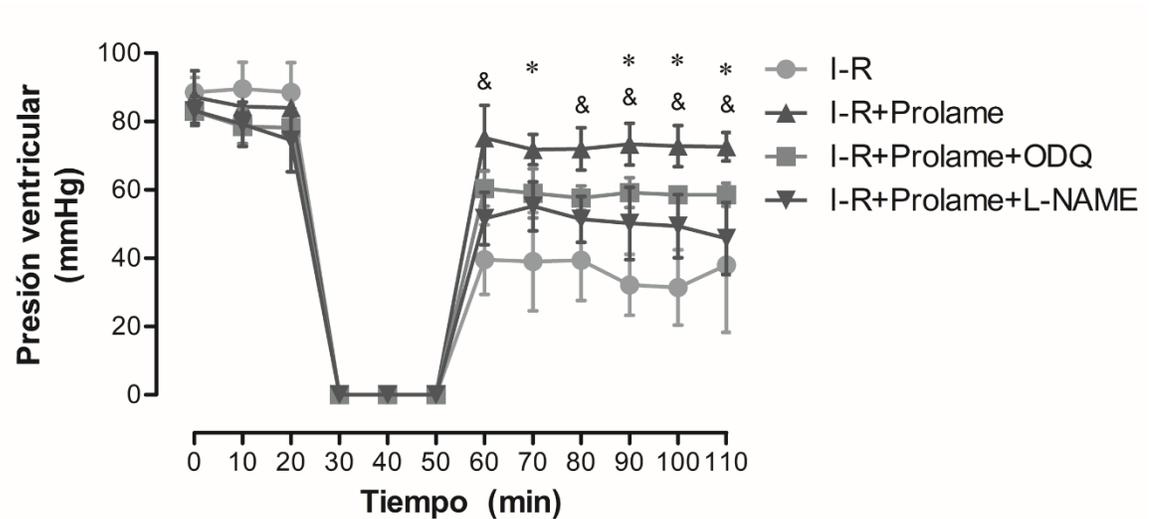
A**B**

FIGURA 18. Efecto del ODQ y el L-NAME en la cardioprotección conferida por Prolame. Los inhibidores ODQ (15 μ M) y L-NAME (50 μ M) se agregaron de manera independiente durante 15 minutos al inicio de la estabilización y posteriormente se administró el compuesto Prolame (1.25 μ M) 5 minutos antes de la isquemia. **A.** Frecuencia cardiaca de los grupos experimentales con inhibidores. Los valores se expresan como la media \pm DE de 5 experimentos independientes por grupo. *P<0.05 I-R+Prolame vs. I-R+Prolame+ODQ; &P<0.001 I-R+Prolame vs. I-R+Prolame+L-NAME. **B.** Presión ventricular de los grupos experimentales con inhibidor. Los valores se expresan como la

media \pm DE de 5 experimentos independientes por grupo. *P<0.05 I-R+Prolame vs. I-R+Prolame+ODQ; &P<0.001 I-R+Prolame vs. I-R+Prolame+L-NAME.

Durante el periodo de estabilización (20 minutos) previos a la administración de Prolame o SNAP, observamos que ni el ODQ ni el L-NAME tuvieron efecto alguno en la frecuencia cardiaca (Figuras 18A y 19A) o en la presión ventricular (Figuras 18B y 19B).

El L-NAME inhibió el efecto conferido por Prolame tanto en la frecuencia cardiaca (Figura 18A) como en la presión ventricular (Figura 18B) al final de la reperfusión, lo que indica la participación del ON \cdot en la cardioprotección; mientras que la administración del ODQ a corazones tratados con Prolame disminuyó de manera parcial pero significativa la frecuencia cardiaca de 257 ± 21 a 198 ± 19 latidos \cdot min $^{-1}$ (P<0.05) y la LVDP de 72 ± 4 a 58 ± 3 mmHg (P<0.05), lo que demuestra que los mecanismos independientes de GMPc también contribuyen a la cardioprotección en el grupo tratado con Prolame.

Al bloquear la vía dependiente de GMPc en el grupo I-R+SNAP con ODQ, se observan con mayor claridad los mecanismos activados por el ON \cdot que contribuyen a la cardioprotección. En este grupo, la administración de ODQ disminuye la frecuencia cardiaca de 294 ± 10 a 231 ± 42 latidos \cdot min $^{-1}$ al final de la reperfusión (Figura 19A) pero no se observa ningún efecto en la presión ventricular, que es comparable a la que se observó en el grupo I-R+SNAP (I-R+SNAP+ODQ: 72 ± 7 mmHg, I-R+SNAP: 86 ± 10 mmHg; Figura 19B), lo que demuestra que hay una contribución importante de la vía independiente de GMPc en la cardioprotección conferida por SNAP durante la I-R.

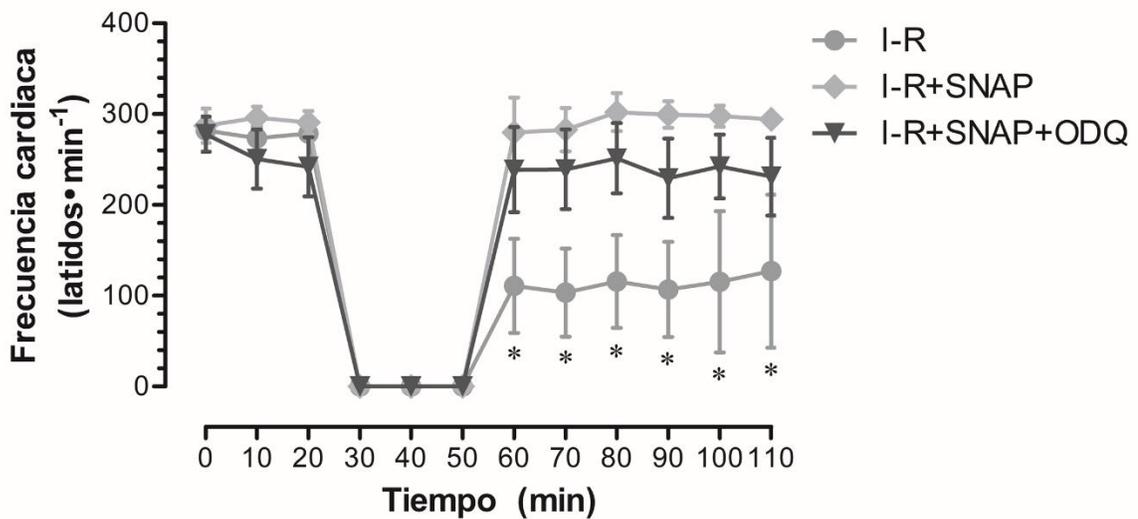
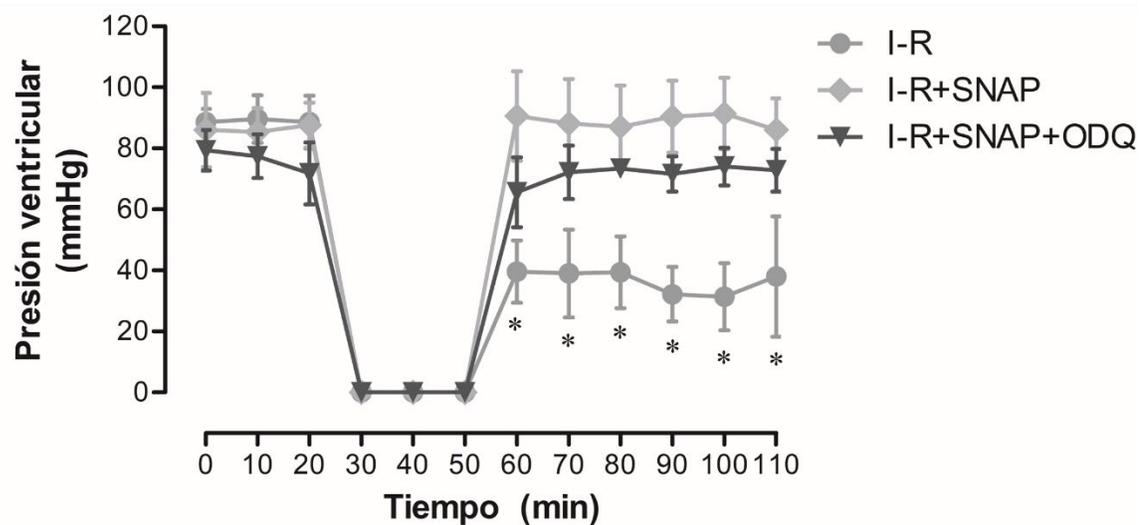
A**B**

FIGURA 19. Efecto del ODQ en la cardioprotección conferida por SNAP. El inhibidor ODQ (15 μ M) se agregó durante 15 minutos al inicio de la estabilización y posteriormente se administró el compuesto SNAP (2 μ M) 5 minutos antes de la isquemia y 10 minutos al inicio de la reperusión. **A.** Frecuencia cardiaca de los grupos experimentales. Los valores se expresan como la media \pm DE de 5 experimentos independientes por grupo * P <0.001 I-R vs. I-R+SNAP e I-R+SNAP+ODQ. **B.** Presión ventricular de los grupos

experimentales. Los valores se expresan como la media \pm DE de 5 experimentos independientes por grupo. *P<0.001 I-R vs. I-R+SNAP e I-R+SNAP+ODQ.

Para confirmar que la inhibición parcial del efecto cardioprotector tanto de Prolame como de SNAP estaba relacionada con la vía independiente de GMPc, se evaluó el contenido de GMPc en todos los grupos experimentales. El contenido de este monofosfato nucleótido cíclico disminuyó de manera significativa en el grupo I-R comparado con el grupo Control (1.0 \pm 0.6 vs. 20.3 \pm 3.2 pmol/ml; P<0.05); mientras que los grupos experimentales tratados con Prolame o SNAP mostraron valores comparables a los obtenidos en el grupo Control (25.1 \pm 7.0 y 19.4 \pm 3.5 pmol GMPc/ml, respectivamente).

En el grupo I-R+Prolame tratado con ODQ o L-NAME, el contenido de GMPc disminuyó a 3.1 \pm 1.4 y 1.4 \pm 0.6 pmol/ml, respectivamente, mientras que en el grupo I-R+SNAP+ODQ disminuyó a 0.5 \pm 0.4 pmol/ml (Figura 20). Estos resultados confirman la participación de la S-nitrosilación en la cardioprotección conferida por Prolame y en mayor medida por SNAP.

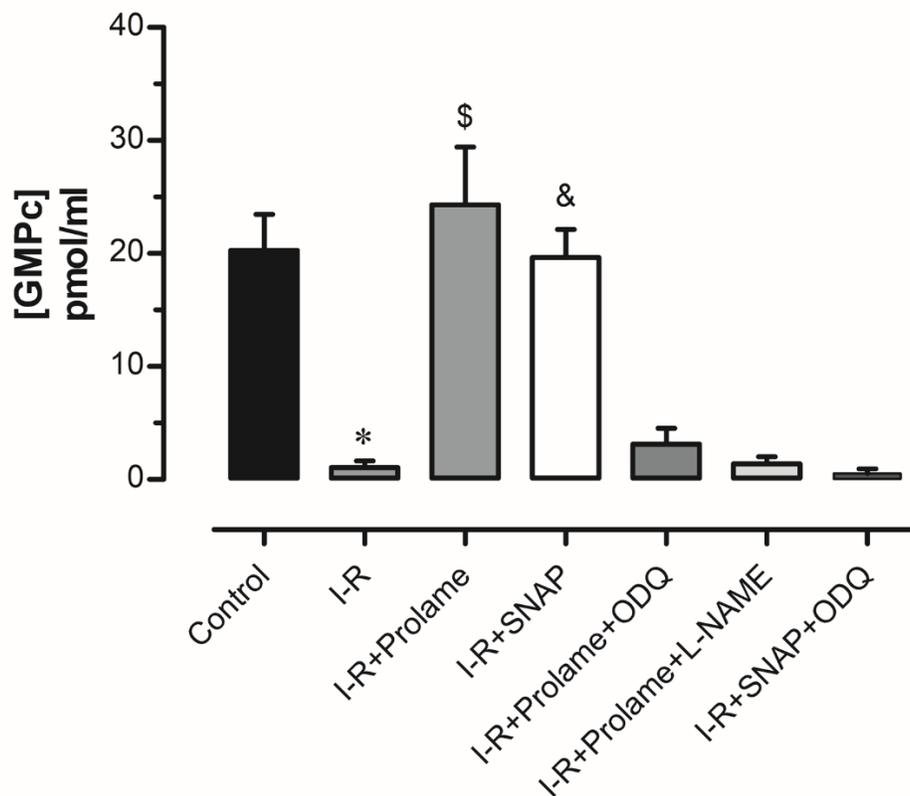


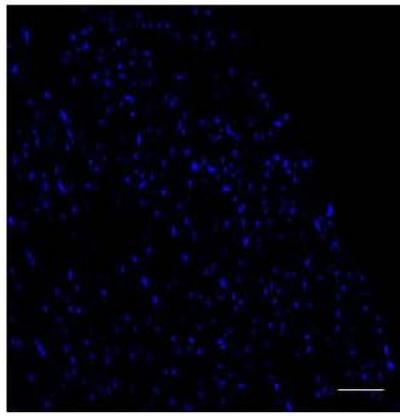
FIGURA 20. Contenido de GMPC. El contenido de GMPC se midió al final de la reperfusión en todos los grupos experimentales. Los valores se expresan como la media±DE de 3 experimentos independientes por grupo. *P<0.05, I-R vs. Control, I-R+Prolame e I-R+SNAP; \$P<0.05, I-R+Prolame vs. I-R+Prolame+ODQ, I-R+Prolame+L-NAME e I-R+SNAP+ODQ; &P<0.05, I-R+SNAP vs. I-R+Prolame+ODQ, I-R+Prolame+L-NAME e I-R+SNAP+ODQ.

6.4 Efecto del óxido nítrico en la muerte celular por apoptosis o necrosis

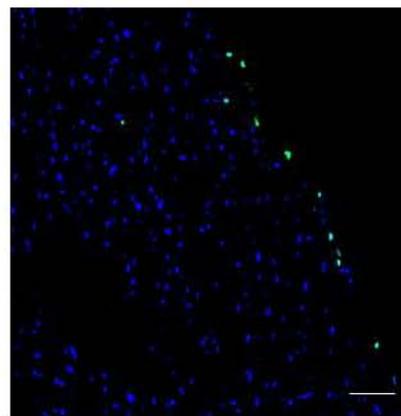
Se realizó el ensayo de TUNEL y el análisis de la integridad del ADN mediante el patrón de escalera para evaluar el efecto del ON• en la regulación de la muerte celular. Los resultados muestran núcleos apoptóticos en corazones I-R, mientras que la imagen de

escala del ADN muestra una mezcla de muerte celular por apoptosis/necrosis. En los grupos experimentales tratados con Prolame o SNAP se observó reducción en la cantidad de núcleos condensados y en la fragmentación del ADN (Figura 21).

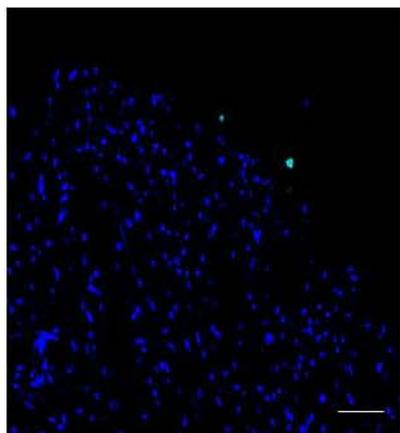
A



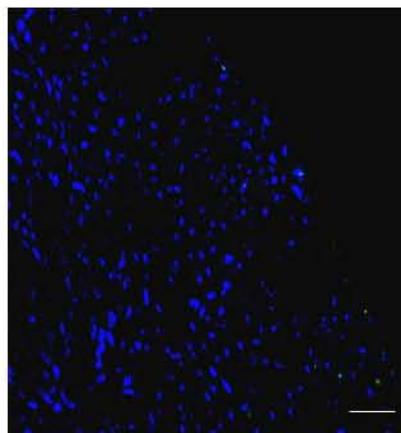
B



C



D



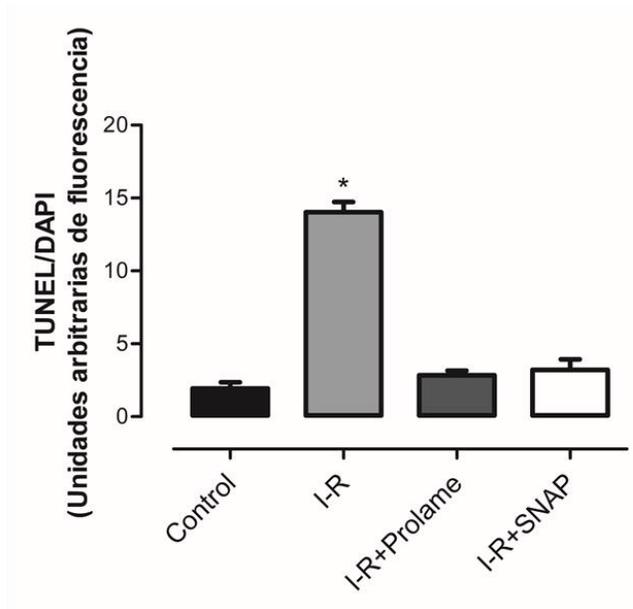
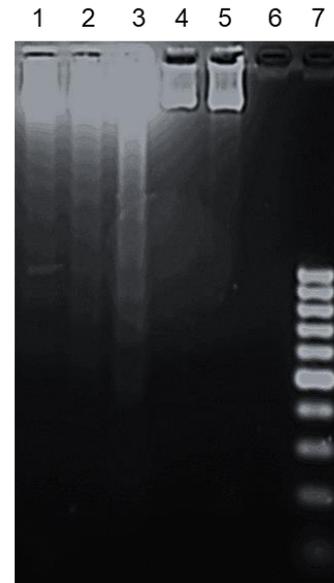
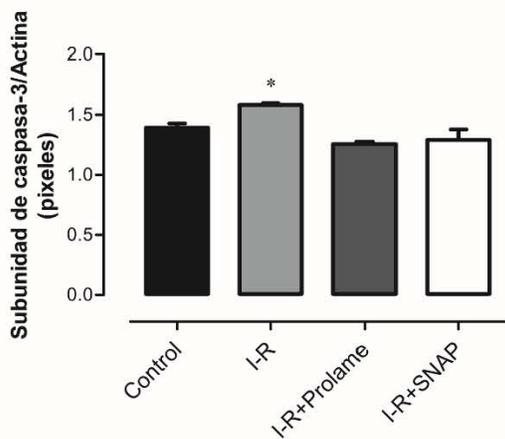
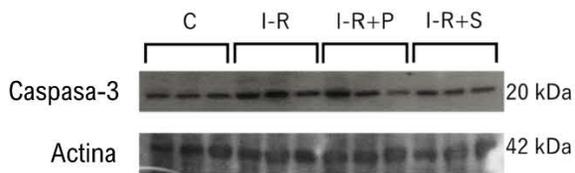
E**F**

FIGURA 21. Ensayo de TUNEL y análisis de fragmentación de ADN. Imágenes representativas de los grupos Control (A), I-R (B), I-R+Prolame (C) e I-R+SNAP (D) del ensayo de muerte celular *in situ*, que muestra pocos núcleos implicados en la muerte celular en el grupo I-R. E. Las barras muestran el nivel de fluorescencia de los núcleos en los 4 grupos experimentales. * $P < 0.05$ I-R vs. todos los grupos. F. Fragmentación de ADN analizada mediante electroforesis en gel de agarosa. Línea 1, grupo control; línea 2, grupo I-R con 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión; línea 3, grupo I-R con 30 minutos de isquemia y 120 minutos de reperfusión; línea 4 grupo I-R+Prolame; línea 5, grupo I-R+SNAP, línea 6, vacío; línea 7, marcador del patrón de escalera del ADN.

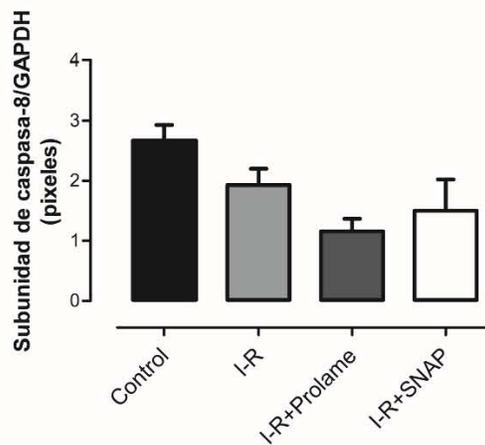
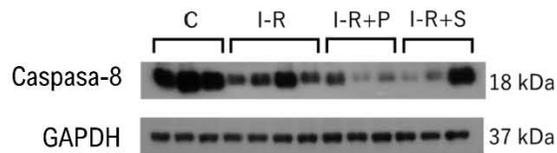
6.5 Efecto del Prolame o SNAP en el contenido y actividad de las caspasas y calpaína-1

Se evaluó por inmunodetección la activación de la vía apoptótica midiendo el aumento de los fragmentos de caspasa-3 (Figura 22A), caspasa-8 (Figura 22B) y caspasa-9 (Figura 22C) y por otro lado de la calpaína-1 (Figura 22D) como marcador de necrosis en homogenados de corazón. Un incremento moderado, pero no significativo se observó en el fragmento p20 de la caspasa-3 activa en el grupo I-R que fue atenuado por Prolame o SNAP; sin embargo, no se detectó ningún cambio en el fragmento p18 de la caspasa-8 activa ni en el fragmento p37 de la caspasa-9 entre los diferentes grupos experimentales. Respecto al fragmento corto de la calpaína-1 de 30 kDa, no hubo ningún cambio en el contenido de este fragmento entre los grupos experimentales.

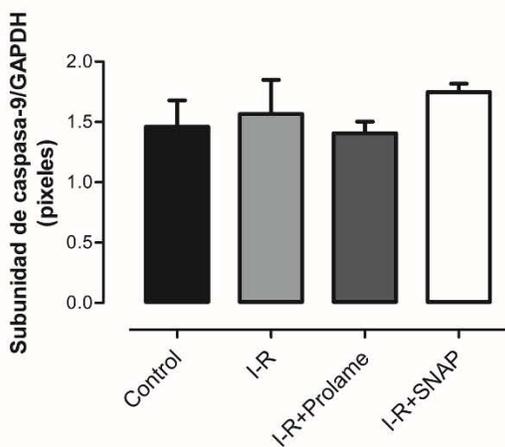
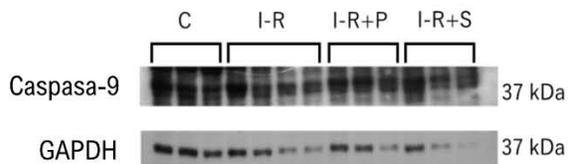
A



B



C



D

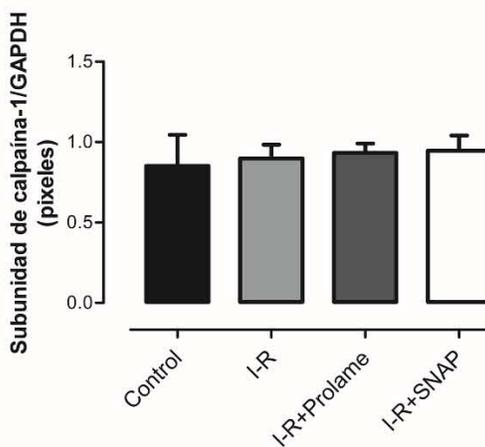
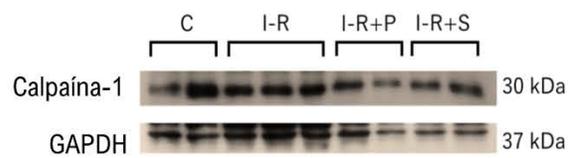


FIGURA 22. Inmunodetección de proteasas relacionadas con muerte celular. **A.** Inmunodetección del fragmento p20 de la caspasa-3 (20 kDa) y actina como control de carga (42 kDa). Los valores se expresan como la media±DE de 3 experimentos independientes por grupo. *P<0.05 I-R vs. I-R+Prolame e I-R+SNAP. **B.** Inmunodetección del fragmento p18 de la caspasa-8 (18 kDa) y GAPDH como control de carga (37 kDa). Los valores se expresan como la media±DE de al menos 3 experimentos independientes por grupo. **C.** Inmunodetección del fragmento p37 de la caspasa-9 (37 kDa) y GAPDH como control de carga (37 kDa). Los valores se expresan como la media±DE de al menos 3 experimentos independientes por grupo. **D.** Inmunodetección del fragmento corto de la calpaína-1 (30 kDa) y GAPDH como control de carga (37 kDa). Los valores se expresan como la media±DE de al menos 3 experimentos independientes por grupo.

Se evaluó el nivel de activación de las caspasas utilizando sustratos sintéticos específicos para estas proteasas. La actividad de la caspasa-8 incrementó significativamente en el grupo I-R comparado con el grupo Control y con el grupo I-R+SNAP (248 ± 13 vs. 174 ± 12 y 172 ± 18 pmol de pNA•mg/60 minutos, respectivamente; $P<0.05$); la actividad de la caspasa-9 también incrementó significativamente en el grupo I-R comparado con el grupo Control y con el grupo I-R+SNAP (228 ± 14 vs. 164 ± 11 y 173 ± 17 pmol de pNA•mg/60 minutos, respectivamente; $P<0.05$); mientras que la actividad de la caspasa-3 sólo disminuye significativamente en el grupo I-R+SNAP comparado con el grupo I-R (157 ± 14 vs. 225 ± 12 pmol de pNA•mg/60 minutos, $P<0.05$). El tratamiento con Prolame redujo ligeramente la actividad de caspasa-3, -8 y -9 comparado con el grupo I-R, pero no hubo diferencia significativa entre estos grupos experimentales (Figuras 23A-C).

Por otro lado, la actividad de la calpaína-1 incrementó en el grupo I-R comparado con el grupo Control (1.6080 ± 0.1193 vs. 1.0680 ± 0.0214 de aumento de actividad de calpaína-1 sobre el control, $P<0.05$; Figura 23D) y disminuyó en los grupos tratados con Prolame o con SNAP a niveles basales (1.0590 ± 0.0165 y 1.0040 ± 0.0340 de aumento de actividad de calpaína-1 sobre el control, Figura 23D). Estos resultados sugieren que ambas vías

promueven la muerte celular durante la reperfusión, y que la actividad de las proteasas evaluadas está sujeta a la regulación por ON.

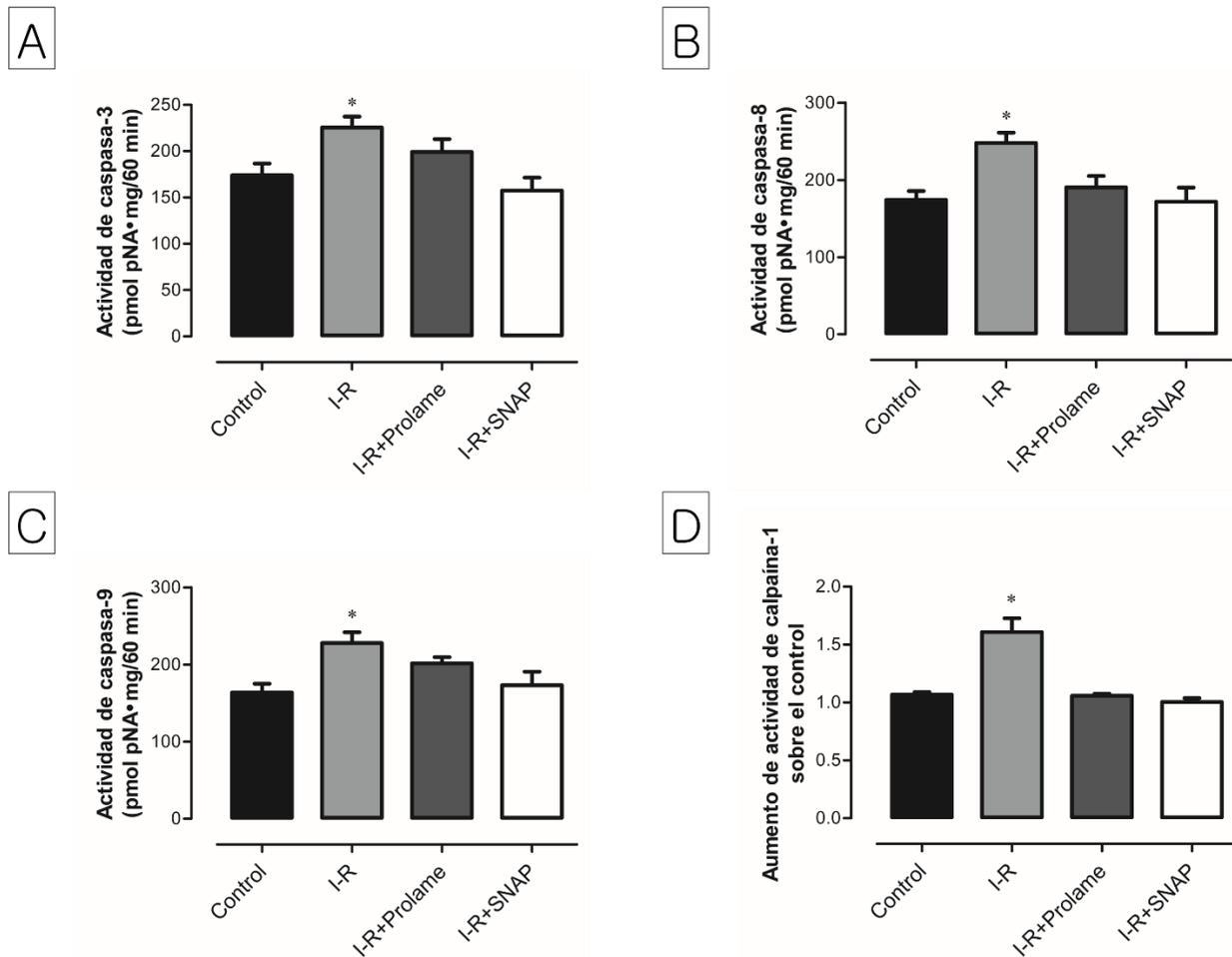


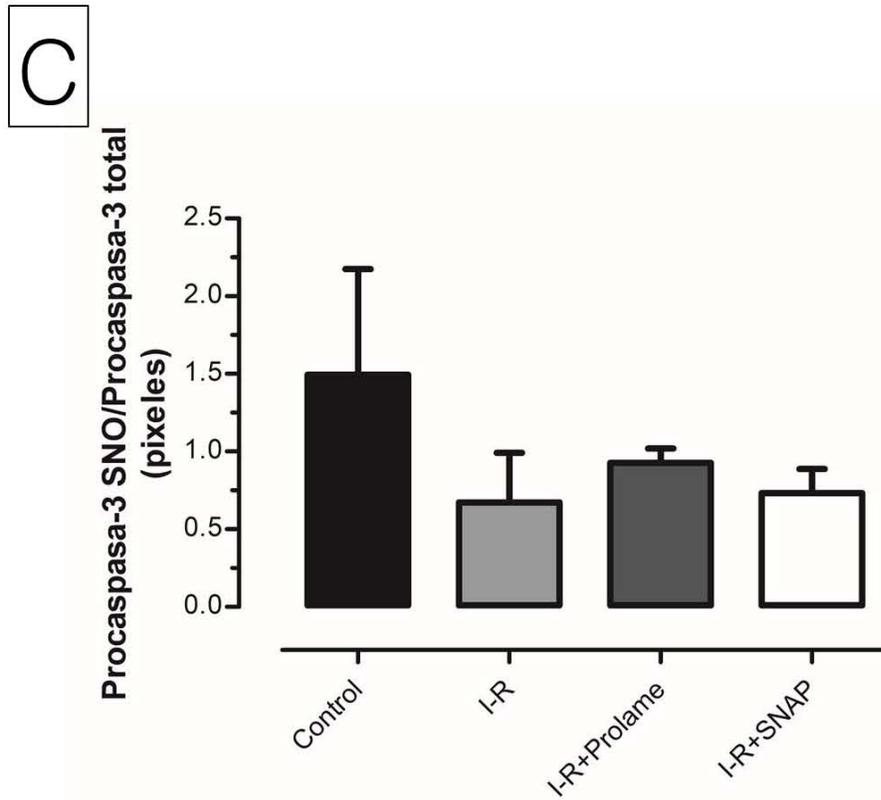
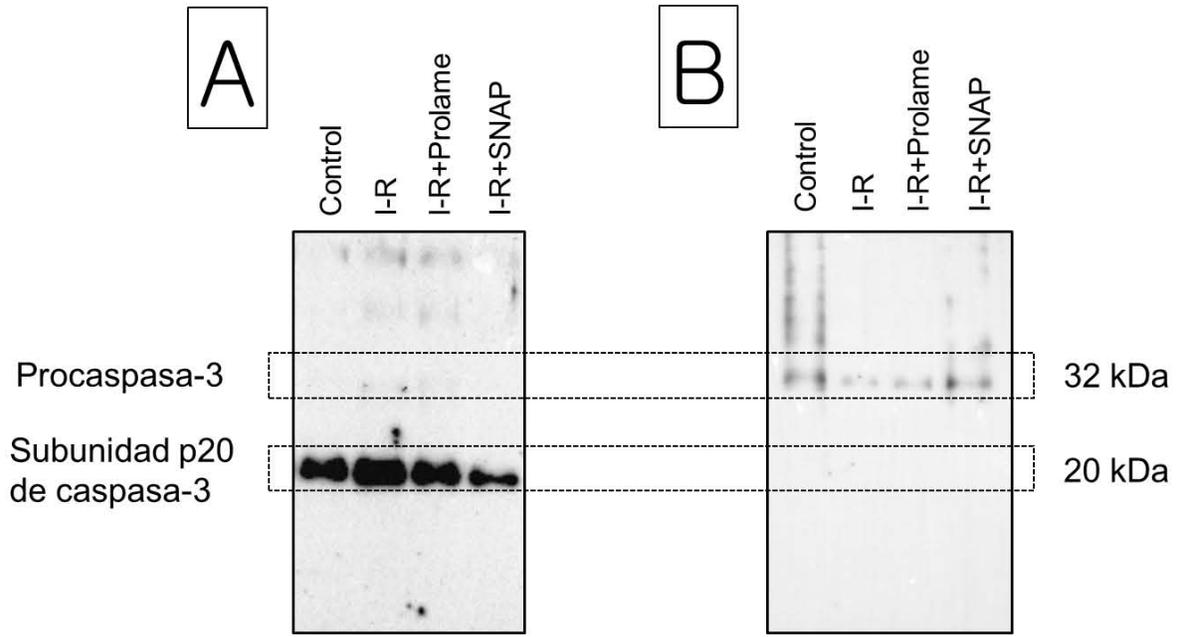
FIGURA 23. Actividad de caspasas-3, -8, -9 y calpaína-1 en corazones reperfundidos tratados con Prolame o SNAP. La actividad de caspasa-3 (**A**), caspasa-8 (**B**) y caspasa-9 (**C**) se midió como la liberación de p-nitroanilina (pNA) respecto a una curva estándar de pNA. Los valores se expresan como la media±EE de 6 experimentos independientes por grupo. Actividad de caspasa-3: *P<0.05 vs. I-R+SNAP; actividad de caspasa-8: *P<0.05 vs. Control e I-R+SNAP; actividad de caspasa-9: *P<0.05 vs. Control

e I-R+SNAP. **D.** Actividad de calpaína-1 en todos los grupos experimentales. Los valores se expresan como la media±EE de 9 experimentos independientes por grupo. *P<0.05 vs. todos los grupos experimentales.

6.6 Efecto del Prolame o SNAP en la S-nitrosilación de caspasa-3 y calpaína-1

Se ha descrito que el ON• puede modificar el sitio catalítico de las caspasas activas a través de la nitrosilación de la cisteína reactiva [Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997; Rössig *et al.*, 1999], lo que lleva a la disminución de la actividad de las proteasas. Para determinar si la disminución en la actividad de la caspasa-3 y de calpaína-1 está asociada con el nivel de S-nitrosilación, se marcaron los residuos S-nitrosilados de caspasa-3 y calpaína-1, previamente inmunoprecipitados, con el reactivo iodoacetil TMT. Se observó que el anticuerpo anti-caspasa-3 atrapó principalmente a la subunidad p20 de la caspasa-3 y en mucha menor extensión a la procaspasa-3 (Figura 24A). La cantidad de la caspasa-3 activa fue mayor en el grupo I-R que en los grupos Control, I-R+SNAP e I-R+Prolame, sin embargo, no se lograron detectar residuos S-nitrosilados en el residuo activo de la proteína. El anticuerpo anti-TMT sólo reconoció a la procaspasa-3 (Figura 24B) y aunque no hubo diferencia significativa, la señal de la S-nitrosilación en la procaspasa-3 tiende a incrementar en los grupos I-R+Prolame e I-R+SNAP en comparación con el grupo I-R (0.9276 ± 0.019 y 0.7328 ± 0.1547 vs. 0.6714 ± 0.3198 pixeles, respectivamente; Figura 24C).

Por otro lado, el anticuerpo anti-calpaína-1 detectó a la subunidad corta de 30 kDa de la calpaína-1 (Figura 24D) y se obtuvo señal de S-nitrosilación en el mismo sitio de la subunidad corta de la calpaína-1 (Figura 24E). El análisis de las inmunodetecciones de calpaína-1 tiende a incrementar la S-nitrosilación de la subunidad pequeña en corazones reperfundidos tratados con Prolame o SNAP en comparación con el grupo I-R (0.7242 ± 0.1661 y 0.7669 ± 0.1916 vs. 0.4847 ± 0.1127 pixeles, respectivamente; Figura 24F).



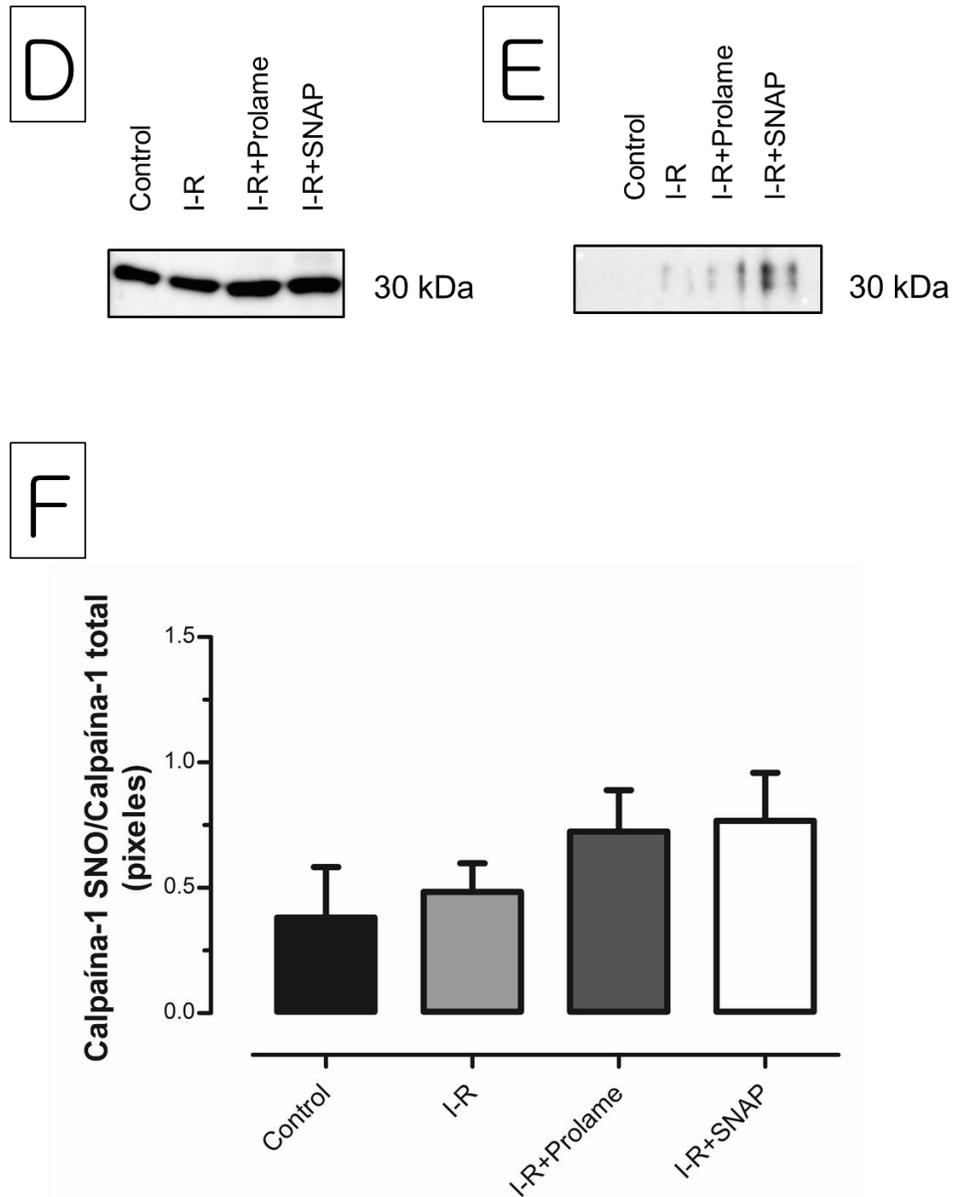


FIGURA 24. Detección de la S-nitrosilación de caspasa-3 y calpaína-1 en corazones reperfundidos tratados con Prolame o SNAP. **A.** Caspasa-3 inmunoprecipitada y **(B)** S-nitrosilada. **C.** Las barras representan la densitometría entre procaspasa-3 S-nitrosilada/procaspasa-3 total. Los valores se expresan como la media \pm EE de 3 experimentos independientes por grupo. **D.** Subunidad corta de la calpaína-1 inmunoprecipitada y **(E)** S-nitrosilada. **F.** Las barras representan la densitometría entre calpaína-1 S-nitrosilada/calpaína-1 total. Los valores se expresan como la media \pm EE de 5 experimentos independientes por grupo.

7. DISCUSIÓN

En este proyecto, nuestro interés fue investigar si los compuestos Prolame y SNAP incrementan el contenido de ON• para proteger contra el daño por I-R e investigar acerca de las vías de acción del ON• y ver si la vía de S-nitrosilación tenía mayor relevancia en conferir cardioprotección; por lo tanto, saber si había proteínas relacionadas con procesos de muerte celular que fueran susceptibles de esta modificación postraduccional.

Los resultados demostraron que el incremento en el contenido de ON• conferido por el tratamiento con Prolame o SNAP en el miocardio isquémico-reperfundido se asoció con la recuperación de la función cardiaca, con la disminución en el tamaño del infarto y con la disminución de la muerte celular. Por otro lado, en los resultados de función cardiaca obtenidos en los grupos I-R+Prolame+ODQ e I-R+SNAP+ODQ se observó que la vía independiente de GMPc es importante para proteger al miocardio contra la I-R, lo que se observó más claramente en el grupo tratado con SNAP. La actividad de las caspasas-3, -8 y -9 disminuyó con el tratamiento con SNAP y la actividad de calpaína-1 disminuyó con el tratamiento con Prolame o SNAP.

Se ha descrito en modelos de isquemia-reperusión que la adición de diferentes donadores exógenos de ON• son efectivos para ayudar a proteger contra el daño causado por I-R [Grievink *et al.*, 2016; Lefer *et al.*, 1993; Pálóczi *et al.*, 2016; Siegfried *et al.*, 1992; Trescher *et al.*, 2015]. En nuestras condiciones experimentales, se observó que los compuestos Prolame y SNAP protegen al corazón contra el daño por I-R, ambos ya han sido descrito en modelos de I-R y se ha observado que ambos incrementan el contenido de ON• en relación con la cardioprotección [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015; Kanno *et al.*, 2000].

En nuestro grupo de trabajo, Correa *et al.* (2015) mostraron en un modelo de I-R que al añadir un donador de ON• a corazones tratados con ODQ se recuperó parcialmente la función contráctil, lo que sugiere que esta recuperación está ligada a procesos independientes de GMPc. Nuestros resultados de función ventricular tuvieron un efecto

similar: los corazones a los que se les añadió el inhibidor de la GCs (ODQ) en presencia de Prolame o SNAP mostraron una recuperación de la función contráctil con ambos tratamientos (Figuras 18 y 19), recuperación que fue más evidente en el grupo tratado con SNAP (Figura 19), lo que indicó que la S-nitrosilación parece estar favorecida en la cardioprotección conferida por SNAP, ya que no observamos diferencias en los parámetros de frecuencia cardíaca y presión ventricular entre los grupos IR+SNAP vs. IR+SNAP+ODQ (Figuras 19A y B) en comparación con los mismos parámetros en los grupos IR+Prolame vs. IR+Prolame+ODQ (Figuras 18 A y B).

La activación de la vía independiente de GMPc con Prolame o SNAP se relacionó con la disminución en la actividad de las proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis y necrosis debido al daño por I-R. La necrosis es un tipo de muerte celular que produce inflamación porque libera el contenido celular al medio extracelular. Por otro lado, la apoptosis es una forma de muerte celular programada que se caracteriza por la condensación nuclear y citoplasmática y la formación de cuerpos apoptóticos. Se ha descrito que la necrosis y la apoptosis contribuyen a la muerte celular en corazones reperfundidos; aunque este tema permanece en debate. Si bien la necrosis se ha relacionado con el daño isquémico, se cree que la apoptosis ocurre solo durante la reperfusión y coexiste con la muerte por necrosis [McCully *et al.*, 2004; Takashi y Ashraf, 2000; Zhao *et al.*, 2000]. La relevancia de la apoptosis en el daño por reperfusión es un tema sujeto a debate, ya que el uso de inhibidores de las caspasas no ha demostrado conclusivamente que se reduzca el daño por reperfusión. Por ejemplo, Yaoita *et al.* (1998), describieron que inhibidor de caspasas Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F disminuye el tamaño del infarto, mejora los parámetros hemodinámicos en corazones con I-R y reduce el número de cardiomiocitos positivos para TUNEL; mientras que otros grupos encontraron que otros inhibidores de caspasas mejoran la función cardíaca independientemente de la regulación de la muerte celular por apoptosis [Kovacs *et al.*, 2001; Ruetten *et al.*, 2001].

La propuesta de que el ON• podría disminuir la muerte celular por apoptosis modificando los residuos de cisteína ubicados en el sitio catalítico de los miembros de la familia de las caspasas, surgió de observaciones en donde el ON• se correlaciona con la inhibición de

la actividad de las caspasas. Se ha descrito que la adición de donadores exógenos de ON• en condiciones de muerte por apoptosis, que la digestión de PARP por caspasa-3 se inhibe de manera dosis-dependiente de los donadores de ON• [Melino *et al.*, 1997]; también se ha descrito la disminución en la actividad de proteasas de cisteína inducidas por TNF α con donadores de ON• y la disminución en la fragmentación del ADN [Dimmeler *et al.*, 1997]. Por otro lado, utilizando caspasas purificadas recombinantes, se ha descrito la disminución en la actividad de 7 caspasas al exponerlas a un donador de ON• y al agregar ditiotreitol se revirtió la inhibición por ON•, lo que indicó que el ON• regula a las caspasas por la nitrosilación de su sitio catalítico [Jianrong *et al.*, 1997].

Nuestros resultados muestran que la actividad de la caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 disminuyen en el grupo I-R+SNAP (Figura 23). Encontramos que las modificaciones postraduccionales de S-nitrosilación en la caspasa-3 se asociaron con la enzima no procesada (procaspasa-3) y no con la forma activa, aunque este fragmento se capturó preferentemente durante la inmunoprecipitación (Figuras 24A-C). En este sentido, Mannick *et al.* (1999) han propuesto que durante la apoptosis la procaspasa-3 mitocondrial se libera hacia el citoplasma, donde se activa por desnitrosilación. Además, se ha informado que la S-nitrosilación en la cisteína 163 del sitio catalítico de la procaspasa-3 inhibe su escisión [Lai *et al.*, 2011; Saligrama *et al.*, 2014], mientras que la caspasa-3 activa S-nitrosilada (p17) solo ha sido descrita por un grupo de investigación en células inmunes infectadas por patógenos bacterianos [Dunne *et al.* 2013]. Respecto a otras caspasas, estudios en hepatocitos demostraron que el ON• previene la activación proteolítica de la caspasa-8 [Li *et al.*, 1999] y que la S-nitrosilación de la caspasa-8 activa disminuye su actividad y previene la muerte por apoptosis [Kim *et al.*, 2000]. Algunos informes indican que el zimógeno de la caspasa-9 está nitrosilado en las mitocondrias [Mannick *et al.*, 2001] y que la cisteína 325 es un sitio crítico para su nitrosilación [Zhang *et al.*, 2016].

Se encontró un aumento en la S-nitrosilación de la subunidad corta de la calpaína-1 en el grupo I-R+SNAP en comparación con el grupo I-R (Figuras 24D-F). En este sentido, se ha descrito que la S-nitrosilación inducida por SNAP coincide con la disminución de la actividad de la calpaína en cardiomiocitos murinos sometidos a hipoxia/reoxigenación, así como en un modelo de reperfusión *in vivo* [Totzeck *et al.*, 2017]. La regulación de la

calpaína por el ON• ha sido descrita en otros modelos de estudio. En experimentos realizados en muestras de carne post mortem incubadas con donadores de ON•, se sugiere que el ON• puede regular la autólisis y la actividad proteolítica de la calpaína-1 [Zhang *et al.*, 2018]; por otro lado, la calpaína que se incubó con un donador de ON• y que se agregó a miofibrillas purificadas mostró disminución en su actividad que se asoció a la nitrosilación de los residuos de cisteína 49, 351, 384 y 592 en la subunidad catalítica y la cisteína 142 en la subunidad pequeña [Liu *et al.*, 2016]. En experimentos realizados en miofibrillas incubadas con un donador de ON• [Liu *et al.*, 2019a] o con calpaína purificada incubada con un donador de ON• [Liu *et al.*, 2019b], ambos mostraron inhibición de la actividad de calpaína.

La calpaína-1 tiene un papel central en la lesión miocárdica durante el daño por I-R, induciendo la muerte celular por apoptosis [Iwamoto *et al.*, 1999; Gao y Dou, 2000] y por necrosis [Aguilar *et al.*, 1996]. Se ha descrito que esta proteasa media la translocación del AIF al citosol y al núcleo [Chen *et al.*, 2011] y que también corta a la proteína apoptótica BID, lo que favorece la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis [Chen *et al.*, 2001]. La calpaína activa degrada enzimáticamente a proteínas como la actina, anquirina, caldesmona, troponina T, troponina I, titina y desmona [Neuhof y Neuhof, 2014; Patterson *et al.*, 2011; Potz *et al.*, 2015], además de otras proteínas que producen fragilidad de la membrana y una mayor sobrecarga de Ca²⁺. Esta condición aumenta la concentración de Ca²⁺ mitocondrial promoviendo la apertura del PTPm, que se considera el "evento distintivo" en la muerte celular necrótica. Por lo tanto, la activación de la calpaína-1 podría inducir necrosis al promover la sobrecarga de Ca²⁺, pero también de acuerdo con Thompson *et al.* (2016) podría modular directamente la apertura del PTPm.

Los factores que determinan la preponderancia de la ruta dependiente de GMPc sobre la ruta de la S-nitrosilación aún no se han aclarado, pero se ha especulado que la concentración y/o el sitio de generación de ON• podrían ser relevantes para una u otra vía. En este sentido, se ha informado que SNAP a concentración de 100 mM aumenta los niveles de ON• y de GMPc en asociación con la disminución de la contractilidad; mientras que las concentraciones más bajas de SNAP (0.1-1 mM) se relacionan con un

menor contenido de generación de ON•, mayor contractilidad y S-nitrosilación en corazones aislados de ratas [González *et al.*, 2008]. En nuestros experimentos, aunque SNAP induce niveles más altos de ON• que Prolame (Figura 17B), los niveles del GMPc fueron similares en ambos grupos (Figura 20).

No podemos atribuir completamente el efecto cardioprotector de Prolame a la vía dependiente del GMPc, ya que este compuesto podría ejercer efectos adicionales a los relacionados con la señalización del ON•. Se sabe, por ejemplo, que la vía de rescate PI3K/Akt activa otros mediadores río abajo además de NOSe, como la GSK3 β , PKC- ϵ y el canal de potasio dependiente de ATP mitocondrial que regula la apertura del PTPm [Ong y Gustafsson, 2015].

8. CONCLUSIÓN

Los efectos cardioprotectores de Prolame o SNAP están relacionados con la producción de $\text{ON}\cdot$ y con la disminución de las actividades de caspasas y de calpaína-1. Sin embargo, aunque nuestros resultados sugieren la activación de la vía independiente de GMPc (S-nitrosilación) en la cardioprotección conferida por el $\text{ON}\cdot$ de los corazones reperfundidos, no pudimos establecer una clara correlación entre la actividad de las proteasas y dicho proceso. Sin embargo, es claro que la S-nitrosilación es un mediador importante de la cardioprotección, probablemente modificando otras proteínas relevantes para la función cardíaca, tampoco podemos descartar la contribución de mecanismos alternativos en la cardioprotección observada.

9. REFERENCIAS

Aguilar HI, Botla R, Arora AS, Bronk SF, Gores GF. Induction of the mitochondrial permeability transition by protease activity in rats: a mechanism of hepatocyte necrosis. *Gastroenterology*. 1996; 110(2):558-566. DOI: 10.1053/gast.1996.v110.pm8566604.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001; 357: 593-615. DOI: 10.1042/0264-6021:3570593

Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24: 413-420. DOI: 10.1161/01.ATV.0000110785.96039.f6

Aoyagi M, Arvai AS, Tainer JA, Getzoff ED. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *The EMBO Journal*. 2003; 22: 766-775. DOI: 10.1093/emboj/cdg078

Arzumanian V, Stankevicius E, Laukevicine A, Kevelaitis E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina (Kaunas)*. 2003; 39: 535-541.

Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2009; 104: 181-188. DOI: 10.1007/s00395-009-0004-8

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology*. 1996; 271: C1424-C1437. DOI: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424

Boissel JP, Schwarz PM, Förstermann U. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*. 1998; 2: 337-349. DOI: 10.1006/niox.1998.0189

Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology*. 2005; 14: 170-175. DOI: 10.1016/j.carpath.2005.03.006

Chapman JG, Magee WP, Stukenbrok HA, Beckius GE, Milici AJ, Tracey WR. A novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin reduces myocardial ischemic injury. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 456(1-3):59-68. DOI: 10.1016/S0014-2999(02)02484-6.

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(33):30724-30728. DOI: 10.1074/jbc.M103701200

Chen Q, Paillard M, Gomez L, Ross T, Hu Y, Xu A, Lesnefsky EJ. Activation of mitochondrial μ -calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;415(4):533-538. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.037

Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Physiological Sciences*. 1982; 79: 2106-2110. DOI: 10.1073/pnas.79.6.2106

Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, James AW, Cochemé HM, Reinhold J, Lilley KS, Partridge L, Fearnley IM, Robinson AJ, Hartlet RC, Smith RA, Krieg T, Brookes PS, Murphy MP. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nature Medicine*. 2013; 19: 753-759. DOI: 10.1038/nm.3212

Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 2001; 1: 1397-1406. DOI: 10.1016/S1567-5769(01)00086-8

Correa F, Buelna-Chontal M, Chagoya V, García-Rivas G, Viguera RM, Pedraza-Chaverri J, García-Niño WR, Hernández-Pando R, León-Contreras JC, Zazueta C. Inhibition of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway limited the cardioprotective effect of post-conditioning in hearts with apical myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*. 2015;765:472-81. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.09.018

Cross HR, Murphy E, Koch WJ, Steenbergen C. Male and female mice overexpressing the beta(2)-adrenergic receptor exhibit differences in ischemia/reperfusion injury: role of nitric oxide. *Cardiovascular research*. 2002 ;53(3):662-671. DOI: 10.1016/s0008-6363(01)00528-4

Daff S. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*. 2010; 23: 1-11. DOI: 10.1016/j.niox.2010.03.001

Das A, Smolenski A, Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP-dependent protein kinase α attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 38644-38652. DOI: 10.1074/jbc.M606142200

De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Mandoki JJ, Fernández JM. Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids*. 1993;58(9):407-409. DOI: 10.1016/0039-128x(93)90079-3

De Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Billiar TR, Geller DA. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93: 1054-1059. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1054

Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the •NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 1411: 334-350. DOI: 10.1016/s0005-2728(99)00024-9

Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1991; 23: 1077-1086. DOI: 10.1016/0022-2828(91)91642-5

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1-beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997; 185: 601-607. DOI: 10.1084/jem.185.4.601

Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(1):115-123. DOI: 10.1172/JCI18330

Dunne KA, Allam A, Macintosh AM, Houston SA, Cerovic V, Goodyear CS, Roe AJ, Beatson SA, Milling SW, Walker D, Wall DM. Increased S-nitrosylation and proteasomal degradation of caspase-3 during infection contribute to the persistence of adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) in immune cells. *PLOS ONE*. 2013; 8(7):e68386. DOI: 10.1371/journal.pone.0068386

Escobar ML, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH. Necrosis as Programmed Cell Death. In Ntuli T. *Cell Death. Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. 2015; (pp. 419-434). University of South Africa, South Africa. Editorial IntechOpen. DOI: 10.5772/59648

Fernández JM, Rubio-Arroyo MF, Soriano-García M, Toscano RA, Pérez-César MC. Synthesis and molecular structure of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 beta-yl)-3-hydroxypropylamine; an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids*. 1985;45(2):151-157. DOI: 10.1016/0039-128x(85)90044-3

Ferraro E, Cecconi F. The apoptosome: the executioner of mitochondria-mediated apoptosis. In Melino G, Vaux D. *Cell death*. 2010; (pp. 37-50) Bangalore, India. Editorial Willey-Blackwell.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012; 33: 829-837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304

Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2012; 16: 123-132. DOI: 10.1177/1089253211436350

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376. DOI: 10.1038/288373a0

Gao G, Dou QP. N-Terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes Bcl-2-independent cytochrome c release and apoptotic cell death. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2000; 80(1):53-72. DOI: 10.1002/1097-4644(20010101)80:1<53::aid-jcb60>3.0.co;2-e.

Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998; 17: 7-23. DOI: 10.1023/A:1005940202801

Goll D, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiological Reviews*. 2003; 83: 731-801. DOI: 10.1152/physrev.00029.2002

González DR, Fernández LC, Ordenes PP, Treuer AV, Eller G, Boric MP. Differential role of S-nitrosylation and the NO-cGMP-PKG pathway in cardiac contractility. *Nitric Oxide*. 2008; 18(3):157-167. DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.086

González G, Alvarado-Vasquez N, Fernández-G JM, Cruz-Robles D, Del Valle L, Pinzón E, Torres I, Rodríguez E, Zapata E, Gómez-Vidales V, Montañó LF, de la Peña A. The antithrombotic effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17B-YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2010;208(1):62-68. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.017

Görbe A, Eder A, Varga ZV, Pálóczi J, Hansen A, Ferdinandy P, Eschenhagen T. Protection by the NO-Donor SNAP and BNP against Hypoxia/Reoxygenation in Rat Engineered Heart Tissue. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132186. DOI: 10.1371/journal.pone.0132186

Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001;280(2):F193-206. DOI: 10.1152/ajprenal.2001.280.2.F193

Grievink H, Zeltcer G, Drenger B, Berenshtein E, Chevion M. Protection by Nitric Oxide Donors of Isolated Rat Hearts Is Associated with Activation of Redox Metabolism and Ferritin Accumulation. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159951. DOI: 10.1371/journal.pone.0159951

Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*. 1998;274(2):177-188. DOI: 10.1016/s0009-8981(98)00060-6

Halestrap AP, Clarke S, Javadov S. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research*. 2004; 61: 372-385. DOI: 10.1016/S0008-6363(03)00533-9

Halestrap AP and Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1787: 1402-1415. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.12.017

Hammond J, Balligand JL. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: From contractility to remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012; 52: 330-340. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.029

Hao Z, Mak TW. Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2010; 2: 63-64. DOI: 10.1093/jmcb/mjp034

Henry PJ, Drummer OH, Horowitz JD. S-nitrosothiols as vasodilators: implications regarding tolerance to nitric oxide-containing vasodilators. *British Journal of Pharmacology*. 1989;98(3):757-766. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb14603.x

Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, De los Santos S, Román-Anguiano NG, Flores M, de la Peña A, Flores PL, Fernández JM, Coral-Vázquez RM, Zazueta C. Reduction of no-reflow and reperfusion injury with the synthetic 17 β -aminoestrogen compound Prolame is associated with PI3K/Akt/eNOS signaling cascade. *Basic Research in Cardiology*. 2015; 110: 1-12. DOI: 10.1007/s00395-015-0464-y

Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1981;218(3):739-749.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agulló L, Pina P, Soler-Soler J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovascular Research*. 2000;64(1):105-114. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.06.001

Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *The American Journal of Pathology*. 1995;146(6):1325-1331.

Iwamoto H, Miura T, Okamura T, Shirakawa K, Iwatate M, Kawamura S, Tatsuno H, Ikeda Y, Matsuzaki M. 1999. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33(4):580-586. DOI: 10.1097/00005344-199904000-00010

Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circulation Research*. 1974;35 Suppl 3:156-72. DOI: 10.1161/res.35.3_supplement.iii-156

Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual review of medicine*. 1991; 42: 225-246. DOI: 10.1146/annurev.me.42.020191.001301

Jennings RB, Sommers HM, Herdson PB, Kaltenbach JP. Ischemic injury of myocardium. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1969; 156: 61-78. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1969.tb16718.x

Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006; 40: 16-23. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2005.09.011

Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, Billiar TR. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000; 101(23):2742-8. DOI: 10.1161/01.cir.101.23.2742

Karch J, Molkentin JD. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. *Circulation Research*. 2015; 116: 1800-1809. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305421

Khorchid A, Ikura M. How calpain is activated by calcium. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2002; 9: 239-241- DOI: 10.1038/nsb0402-239

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research*. 1999; 84: 253-256. DOI: 10.1161/01.RES.84.3.253

Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor α -induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology*. 2000; 32(4):770-778. DOI: 10.1053/jhep.2000.18291.

Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(49):31138-31148. DOI: 10.1074/jbc.272.49.31138

Knowles RG and Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*. 1994; 298: 249-258. DOI: 10.1042/bj2980249

Koesling D, Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochemistry International*. 2004; 45: 813-819. DOI: 10.1016/j.neuint.2004.03.011

Kohli V, Gao W, Camargo CA Jr, Clavien PA. Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *PNAS*. 1997;94(17):9354-9359. DOI: 10.1073/pnas.94.17.9354

Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter K, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circulation Research*. 1996; 78: 91-101. DOI: 10.1161/01.RES.78.1.91

Kovacs P, Bak I, Szendrei L, Vecdernyes M, Varga E, Blasig IE, Tosaki A. Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2001; 364(6):501-507. DOI: 10.1007/s002100100483

Krammer PH, Lavrik IN. Death receptors. In Melino G, Vaux D. *Cell death*. 2010; (pp. 110-116). Bangalore, India. Editorial Willey-Blackwell.

Krijnen PAJ, Nijmeijer R, Meijer CJLM, Visser CA, Hack CE, Niessen HWM. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *Journal of Clinical Pathology*. 2002; 55: 801-811. DOI: 10.1136/jcp.55.11.801

Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000; 47: 6-9. DOI: 10.1136/gut.47.1.6

Kung G, Konstantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circulation Research*. 2011; 108: 1017-1036. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225730

Lamkanfi M, Declercq W, Depuydt B, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. The caspase family. In Los M, Walczak H. *Caspases: their role in cell death and cell survival*. 2003; (pp. 1-40). New York, USA. Editorial Landes Bioscience.

Lai YC, Pan KT, Chang GF, Hsu CH, Khoo KH, Hung CH, Jiang YJ, Ho FM, Meng TC. Nitrite-mediated S-nitrosylation of caspase-3 prevents hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction. *Circulation Research*. 2011;109(12):1375-1386. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.256479.

Lang TW, Corday E, Gold H, Meerbaum S, Rubins S, Costantini C, Hirose S, Osher J, Rosen V. Consequences of reperfusion after coronary occlusion. Effects on hemodynamic and regional myocardial metabolic function. *American Journal of Cardiology*. 1974; 33(1):69-81. DOI: 10.1016/0002-9149(74)90741-3

Lavrik IN, Golks A, Kramer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 2665-2672. DOI: 10.1172/JCI26252

Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE, Vinten-Johansen J. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion of dogs. *Circulation*. 1993;88(5 Pt 1):2337-2350. DOI: 10.1161/01.cir.88.5.2337

Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997; 240(2):419-424. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7672

Li J, Bombeck CA, Yang S, Kim Y, Billiar TR. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(24):17325-17333. DOI: 10.1074/jbc.274.24.17325.

Lin Y. RIP1-mediated signaling pathways in cell survival and death control. In Shen HM, Vandenabeele P. *Necrotic cell death*. 2014; (pp. 23-43). New York, NY, USA. Editorial Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-4614-8220-8

Liu HR, Gao F, Tao L, Yan WL, Gao E, Christopher TA, Lopez BL, Hu A, Ma XL. Antiapoptotic mechanisms of benidipine in the ischemic/reperfused heart. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142(4):627-634. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705847

Liu R, Li Y, Wang M, Zhou G, Zhang W. Effect of protein S-nitrosylation on autolysis and catalytic ability of μ -calpain. *Food Chemistry*. 2016;213:470-477. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.104.

Liu R, Lonergan S, Steadham E, Zhou G, Zhang W, Huff-Lonergan E. Effect of nitric oxide on myofibrillar proteins and the susceptibility to calpain-1 proteolysis. *Food Chemistry*. 2019a; 276:63-70. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.005

Liu R, Lonergan S, Steadham E, Zhou G, Zhang W, Huff-Lonergan E. Effect of nitric oxide and calpastatin on the inhibition of μ -calpain activity, autolysis and proteolysis of myofibrillar proteins. *Food Chemistry*. 2019b; 275:77-84. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.104

Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, Qi D, Lin C, Tong R, Wang Y. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2019; 44: 771-786. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4244

Loscalzo J. The biological chemistry of nitric oxide. In Loscalzo J, Vita JA. *Nitric oxide and the cardiovascular system*. 2000; (pp. 3-10). Totowa, New Jersey. Editorial Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-59259-002-5

Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1995; 2: 87-104. DOI: 10.1016/S0033-0620(05)80001-5

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-275.

Lucas KY, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52: 375-413.

Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005; 38(1):163-174. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.10.012

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*. 1999; 284(5414):651-654. DOI: 10.1126/science.284.5414.651

Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B. S-nitrosylation of mitochondrial caspases. *Journal of Cell Biology*. 2001; 154(6):1111-1116. DOI: 10.1083/jcb.200104008.

Maroko PR, Libby P, Ginks WR, Bloor CM, Shell WE, Sobel BE, Ross J Jr. Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1972; 51(10):2710-2716. DOI: 10.1172/JCI107090

Marsden PA, Heng HH, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics*. 1994; 19: 183-185. DOI: 10.1006/geno.1994.1039

Martínez J. Prix fixe: efferocytosis as a four-course meal. In Nagata S, Nakano H. Apoptotic and non-apoptotic cell death. 2017; (pp. 1-36). Gewerbestrasse, Switzerland. Editorial Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-319-23913-2

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*. 1997;388(6641):432-433.

McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004; 286(5):H1923-1935. DOI: 10.1152/ajpheart.00935.2003

Michetti M, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S. Reversible inactivation of calpain isoforms by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995; 207: 1009-1014. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1285

Murphy E, Kohr M, Menazza S, Nguyen T, Evangelista A, Sun J, Steenbergen C. Signaling by S-nitrosylation in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014; 73:18-25. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.003.

Murphy E, Kohr M, Sun J, Nguyen T, Steenbergen C. S-nitrosylation: a radical way to protect the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012; 52(3):568-577. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.021

Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, Infante T, Ignarro LJ. Effects of nitric oxide on cell proliferation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 62: 89-95. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.03.070

Neuhof C, Neuhof H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World Journal of Cardiology*. 2014; 6(7):638-652. DOI: 10.4330/wjc.v6.i7.638

Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Meyer R, Vetter H, Grohé C. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS letters*. 2001;502(3):103-108.

Oerlemans M, Liu J, Arslan F, Ouden K, Middelaar BJ, Doevendans PA, Sluijter JP. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Research in Cardiology*. 2012; 107: 1-13. DOI: 10.1007/s00395-012-0270-8

Ong SB, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovascular Research*. 2012; 94: 190-196. DOI: 10.1093/cvr/cvr312

Orogo AM, Gustafsson AB. Cell death in the myocardium: my heart won't go on. *IUBMB Life*. 2013; 65: 651-656. DOI: 10.1002/iub.1180

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526. DOI: 10.1038/327524a0

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666. DOI: 10.1038/333664a0

Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989; 158: 348-352. DOI: 10.1016/s0006-291x(89)80219-0

Pálóczy J, Varga ZV, Apáti Á, Szabó K, Sarkadi B, Madonna R, De Caterina R, Csont T, Eschenhagen T, Ferdinandy P, Görbe A. Exogenous Nitric Oxide Protects Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes against Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:4298945. DOI: 10.1155/2016/4298945.

Patterson C, Portbury A, Schisler JC, Willis MC. Tear me down: role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circulation Research*. 2011; 109(4):453-462. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.239749.

Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 14;284(33):21777-21781. DOI: 10.1074/jbc.R800084200.

Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cellular Signaling*. 2011; 23: 1921-1926. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.09.001

Potz BA, Sabe AA, Abid MR, Sellke FW. Calpains and coronary vascular disease. *Circulation Journal*. 2015; 80(1):4-10. DOI: 10.1253/circj.CJ-15-0997.

Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*. 2001; 64: 51-68. DOI: 10.1016/S0301-0082(00)00044-7

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *THE LANCET*. 1987; 330: 1057-1058. DOI: 10.1016/s0140-6736(87)91481-4

Rakhit RD, Mojet MH, Marber MS, Duchon MR. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. *Circulation*. 2001; 103: 2617-2623. DOI: 10.1161/01.cir.103.21.2617

Ramírez-Camacho I, Bautista-Pérez R, Correa F, Buelna-Chontal M, Román-Anguiano NG, Medel-Franco M, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Cano-Martínez A, Zazueta C. Role of sphingomyelinase in mitochondrial ceramide accumulation during reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1862(10):1955-1963. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.07.021

Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascular Pharmacology*. 2012; 57: 168-172. DOI: 10.1016/j.vph.2012.02.004

Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-Nitrosation *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(11):6823-6826. DOI: 10.1074/jbc.274.11.6823

Rubio-Póo C, Mandoki JJ, Mendoza-Patiño N, Lemini C, de la Peña A, Cruz F, Zavala E, Silva G, Garcia-Mondragón J, Fernández JM. The anticoagulant effect of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17 beta-yl)-3-hydroxypropylamine, a novel amino-estrogen. *Steroids*. 1985;45(2):159-170. DOI: 10.1016/0039-128x(85)90045-5

Ruetten H, Badorff C, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis-inhibitory effects. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001; 38(7):2063-2070. DOI: 10.1016/S0735-1097(01)01670-9.

Salas E, Moro MA, Askew S, Hodson HF, Butler AR, Radomski MW, Moncada S. Comparative pharmacology of analogues of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine on human platelets. *British Journal of Pharmacology*. 1994;112(4):1071-1076. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb13192.x

Saligrama PT, Fortner KA, Secinaro MA, Collins CC, Rusell JQ, Budd RC. IL-15 maintains T-cell survival via S-nitrosylation-mediated inhibition of caspase-3. *Cell Death & Differentiation*. 2014; 21(6):904-914. DOI: 10.1038/cdd.2014.10

Shaffer JE, Han BJ, Chern WH, Lee FW. Lack of tolerance to a 24-hour infusion of S-nitroso N-acetylpenicillamine (SNAP) in conscious rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992;260(1):286-293.

Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *The American Journal of Pathology*. 1972; 67(3):417-440.

Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL, Lefer AM. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992;260(2):668-675.

Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001; 106: 675-683. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00495-0

Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. The calpain system and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2001; 11: 364-374. DOI: 10.1038/nrc3050

Sun J, Morgan M, Shen RF, Steenbergen C, Murphy E. Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circulation Research*. 2007; 101: 1155-63. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155879

Sun J, Murphy E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circulation Research*. 2010; 106(2):285-296. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209452

Takashi E, Ashraf M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000;32(2):209-24. DOI: 10.1006/jmcc.1999.1067

Taylor RR. Myocardial potassium and ventricular arrhythmias following reperfusion of ischaemic myocardium. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*. 1971; 1(2):114-120. DOI: 10.1111/j.1445-5994.1971.tb02276.x

Tennyson AG, Lippard SJ. Generation, translocation and action of nitric oxide in living systems. *Chemistry & Biology*. 2011, 18: 1211-1220. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.09.009

Thomas DD, Espey MG, Ridnour LA, Hofseth LJ, Mancardi D, Harris CC, Wink DA. Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(24):8894-8899. DOI: 10.1073/pnas.0400453101

Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzellie S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambs S, Colton C, Harris C, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide. Implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 45:18-31. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020

Thompson J, Hu Y, Lesnefsky EJ, Chen Q. Activation of mitochondrial calpain and increased cardiac injury: beyond AIF release. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2016;310(3):H376-84. DOI: 10.1152/ajpheart.00748.2015

Totzeck M, Korste S, Miinalainen I, Hendgen-Cotta UB, Rassaf T. S-nitrosation of calpains is associated with cardioprotection in myocardial I/R injury. *Nitric Oxide*. 2017; 67:68-74. DOI: 10.1016/j.niox.2017.04.003.

Trescher K, Dzilic E, Kreibich M, Gasser H, Aumayr K, Kerjaschki D, Pelzmann B, Hallström S, Podesser BK. The nitric oxide donor, S-nitroso human serum albumin, as an adjunct to HTK-N cardioplegia improves protection during cardioplegic arrest after myocardial infarction in rats. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. 2015;20(3):387-94. DOI: 10.1093/icvts/ivu383

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 357: 1121-1135. DOI: 10.1056/NEJMra071667

Zhang C, Liu R, Wang A, Kang D, Zhou G, Zhang W. Regulation of calpain-1 activity and protein proteolysis by protein nitrosylation in postmortem beef. *Meat Science*. 2018;141:144-49. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.03.017

Zhang D, Zhao N, Ma B, Wang Y, Zhang G, Yan X, Hu X, Xu T. Procaspase-9 induces its cleavage by transnitrosylating XIAP via the thioredoxin system during cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Scientific Reports*. 2016; 6(1):1-12. DOI: 10.1038/srep24203

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research*. 2000;45(3):651-660. DOI: 10.1016/s0008-6363(99)00354-5

Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 2009; 20: 223-230. DOI: 10.1016/j.niox.2009.03.001