

11205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

10

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
“IGNACIO CHÁVEZ”

“Lesión de las proteínas transportadoras de calcio en la reperfusión
post-isquémica del miocardio”

TESIS DE POSTGRADO PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
CARDIOLOGIA

PRESENTA:
DR. EROS OSIRIS BALAM ORTIZ.

Entrego a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impre-
sionado el contenido de mi trabajo recepcionado

NOMBRE: Eros Osiris Balam Ortiz

FECHA: 26.09.02

FIRMA: [Firma manuscrita]

ASESOR DE TESIS:
DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO.

MEXICO D.F. 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DR. Fause Attié Cury
DIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA.



DR. Sergio Férrez Santander
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA.



DR. Edmundo Chávez Cossío
SUBDIRECTOR DE INVESTIGACION BASICA
Y TECNOLÓGICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

“Lesión de las proteínas transportadoras de calcio en la reperfusión post-isquémica del miocardio”

RESUMEN

La función del miocardio como bomba depende, primordialmente, de los fenómenos de excitación-contracción-relajación. La transformación del fenómeno eléctrico en fenómeno mecánico, requiere necesariamente de la participación del calcio, por lo que el estudio de la cinética subcelular de éste catión se hace indispensable en la comprensión de la patología cardiovascular. En esta revisión, presentamos las características principales de los canales de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS), y señalamos los mecanismos de lesión que subyacen cuando existe un proceso como la isquemia y la reperfusión. Hacemos hincapié en las alteraciones de la excitación-contracción-relajación, que se presentan cuando las proteínas que forman los canales sufren modificaciones en su estructura, y sobre todo, señalamos la importancia que tiene el papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en la oxidación y degradación de estas proteínas.

Palabras Clave: Daño miocárdico por reperfusión. Especies reactivas de oxígeno. Retículo sarcoplásmico. Sobrecarga de calcio.

SUMMARY

The mechanical function of the myocardium depends, primordially, of the excitation-contraction-relaxation phenomenon. The transformation of electrical to mechanical energy requires calcium participation, therefore, the study of the subcellular kinetics of this cation becomes necessary in the comprehension of cardiovascular pathology. In this article review, we presented the main characteristics of the sarcoplasmic reticulum channels, and we also remarked the injury mechanism that underlies when a process like the ischemia-reperfusion is present. We emphasized on the disturbances in excitation-contraction-relaxation that appear when the ionic channels suffer structural modifications and stressing the importance of the reactive oxygen species (ROS) on protein oxidation and degradation.

Key Words Reperfusion injury Reactive oxygen species Sarcoplasmic reticulum Calcium overload

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de reperfusión del miocardio isquémico ha sido el método más efectivo para limitar el daño tisular durante la evolución de un infarto. Existen sin embargo, evidencias que sugieren que la reperfusión esta asociada a un daño celular aditivo, ocasionado por la liberación de enzimas intracelulares, ruptura de membranas, influjo de calcio, producción incontrolada de especies reactivas de oxígeno e incluso necrosis tisular, este fenómeno paradójico, es conocido como lesión por reperfusión¹. Su importancia radica en que la mayor parte del daño durante la isquemia pudieran estar relacionados en mayor medida a la reperfusión. Pese a que la identificación de este fenómeno fue realizada en 1935 por Tennant y Wiggers², es hasta la década de los 80's cuando los estudios de Braunwald y Kloner³ demuestran que la reperfusión se encuentra relacionada a disfunción diastólica del ventrículo isquémico, entidad conocida como "miocardio aturdido". En la actualidad, se ha propuesto su relación con un aumento de la mortalidad en las primeras 24 horas posteriores a la trombolisis, problema conocido como "el peligro temprano de la trombolisis"⁴.

El estudio de la reperfusión post-isquémica ha tomado relevancia debido a que retrasa los beneficios de la terapia de reperfusión. El desarrollo de conocimiento de los mecanismos relacionados con la producción de este fenómeno tiene implicaciones clínicas relevantes ya que permitiría la posibilidad de implementar medidas terapéuticas profilácticas, con el fin de mejorar los beneficios de la reperfusión.

La causa de la lesión cardiaca producida por la reperfusión del miocardio es aparentemente multifactorial. Sin embargo, la producción de especies reactivas de oxígeno y la sobrecarga de calcio intracelular, son los mecanismos propuestos para explicar la falta de recuperación de la función contráctil y de las taquiarritmias.

ventriculares, que se presentan posterior al restablecimiento de la circulación coronaria⁵⁻¹⁰

En esta revisión discutimos los posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de estos fenómenos, con especial énfasis, en la disfunción sarcotubular, que se produce cuando las proteínas del retículo sarcoplásmico, que mantienen la homeostasis intracelular de calcio, se ven alteradas por especies reactivas de oxígeno, conduciendo a alteraciones en la excitación-contracción-relajación

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO

INTRACELULAR

El mecanismo de excitación-contracción-relajación depende en gran medida de las concentraciones intracitoplasmáticas de Ca^{2+} o $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diversos canales proteicos regulan las concentraciones de Ca^{2+} hacia ambos lados del sarcolema. Por un lado, tenemos los que promueven la entrada de Ca^{2+} y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, entre ellos los canales sensibles al voltaje (canales tipo L), los canales liberadores de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) (receptor de ryanodina) y los canales sensibles a inositol trifosfato (canal de InsP_3), y tenemos por otro lado, proteínas con función de bomba que regulan la extracción de Ca^{2+} del citosol y disminuyen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, entre los que se encuentran, la bomba de calcio del sarcoplasma (bomba de Ca^{2+} ATPasa o PMCA) y la bomba de calcio del RS (bomba Ca^{2+} ATPasa o SERCA)¹¹, esta última abundante en la red sarcotubular que rodea a las miofibrillas del miocito. Existen otros canales que intervienen en la regulación, sin embargo, solo se activan en situaciones en las que existe la necesidad de conservar la homeostasis intracelular, mencionaremos entre ellos al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el cotransportador Na^+/H^+ (*Ver tabla I*)

Tabla I. Proteínas reguladoras de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} .

<i>Proteína</i>	<i>Localización</i>	<i>Efecto inotrópico</i>	<i>Efecto lusinotrópico</i>	<i>Efectores intracelulares</i>
<i>Bomba SERCA</i>	<i>RS</i>		+++	<i>AMPc (+), FLB(+), ATP (+).</i>
<i>Bomba PMCA</i>	<i>MP</i>		+	<i>Aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, PC Ca^{2+}-calmodulina (+) y ATP (+).</i>
<i>Canal tipo L</i>	<i>MP</i>	+		<i>Dependiente de voltaje y AMPc (+).</i>
<i>Canal IP_3</i>	<i>RS</i>	+		<i>AMPc (+)</i>
<i>Canal RYR</i>	<i>RS</i>	++		<i>Activado por Ca^{2+}</i>
<i>Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$</i>	<i>MP</i>		+	<i>Aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Ca^{2+} dependiente.</i>

SERCA. Bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico; PMCA, Bomba Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática; canal RYR, canal o receptor de ryanodina; MP, membrana plasmática; RS, retículo sarcoplásmico; FLB, Fosfolambano; PC Ca^{2+} -calmodulina, proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina. ATP, adenosina trifosfato.

Cada canal proteico participa en diferentes etapas de la excitación-contracción-relajación, por ejemplo los canales de tipo L, se encuentra estrechamente relacionados al fenómeno de Ca^{2+} induce-liberación de Ca^{2+} (excitación), mientras que el canal liberador de Ca^{2+} y los canales sensibles a InsP_3 promueven el inotropismo al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a niveles suficientes para que exista la interacción de este catión con la troponina C y se produzca la contracción, los canales SERCA y PMCA, promueven la relajación mediante la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, esta función también se conoce como efecto lusitropico, como veremos más adelante, este fenómeno es vital en la potencia contráctil del miocito

Se considera en general que, son los canales localizados en el RS, de liberación y de recaptura, los que juegan un papel crítico en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ello debido a que el canal de tipo L (también conocido como canal sensible a dihidropiridinas) aporta una cantidad transmembranal relativamente pequeña, y la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática PMCA solo se activa en situaciones de sobrecarga de calcio

Para tener una idea de la importancia del RS, solo tenemos que recordar las diferencias entre las concentraciones de Ca^{2+} intracelular-extracelular y la capacidad que tienen estas proteínas para mantener el equilibrio del Ca^{2+} intracitoplasmático. En el miocito, la concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular es de 10^{-3} M, en el espacio intracelular varia dependiendo del compartimento que se trate, por ejemplo en el retículo sarcoplásmico es de 10^{-2} M, en la mitocondria de 10^{-3} M, y en el citosol de 10^{-7} M y 10^{-6} M, en diástole y la sístole, respectivamente. En miocardio normofuncionante las proteínas iónicas tienen la capacidad de mantener 10,000 veces el gradiente de concentración del Ca^{2+} , a través del sarcolema ¹²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO Y SUS PROTEÍNAS FUNCIONALES

A continuación revisaremos las principales características de las proteínas que le dan al retículo sarcoplásmico la capacidad de mantener concentraciones intracelulares equilibradas de Ca^{2+} para la contracción-relajación

CANAL LIBERADOR DE CALCIO EN EL RS

Con la utilización de cromosomas bacterianos se ha podido aislar el gen que codifica al canal liberador de Ca^{2+} , este se ubica en el brazo corto del cromosoma 19 (RYR 19q 13.1) ¹³⁻¹⁹ Se han aislado al menos 3 isoformas del canal liberador de Ca^{2+} , siendo la isoforma RYR2 la que predomina en el corazón. La importancia de esta proteína radica en que es el objetivo final del fenómeno Ca^{2+} induce-liberación de Ca^{2+} , esencial para la excitación-contracción, lo que la convierte en parte indispensable de la respuesta inotrópica positiva.

El fenómeno de Ca^{2+} induce liberación de Ca^{2+} implica que la cantidad relativamente pequeña de Ca^{2+} que entra con la activación de los canales de tipo L, produce la apertura del poro del canal liberador de Ca^{2+} necesaria para la contracción ^{20,21}

El conocimiento de la ultraestructura del miocardio ha conducido al entendimiento anatómico del fenómeno, resalta, la estrecha cercanía que guardan las dilataciones del túbulo transversal (vesícula intermedia) y dilataciones del RS cercanas a la banda Z (cisternas terminales) que en conjunto forman la "triada de conjunción" ²² El estudio se ha enriquecido con observaciones de microscopía electrónica que sugieren la existencia de una proximidad extrema entre los canales de tipo L, que se proyectan de la superficie citoplasmática del túbulo transversal, y los canales liberadores de Ca^{2+} del RS, lo que

EL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO Y SUS PROTEÍNAS FUNCIONALES

A continuación revisaremos las principales características de las proteínas que le dan al retículo sarcoplásmico la capacidad de mantener concentraciones intracelulares equilibradas de Ca^{2+} para la contracción-relajación

CANAL LIBERADOR DE CALCIO EN EL RS

Con la utilización de cromosomas bacterianos se ha podido aislar el gen que codifica al canal liberador de Ca^{2+} , este se ubica en el brazo corto del cromosoma 19 (RYR 19q 13.1) ¹³⁻¹⁹ Se han aislado al menos 3 isoformas del canal liberador de Ca^{2+} , siendo la isoforma RYR2 la que predomina en el corazón. La importancia de esta proteína radica en que es el objetivo final del fenómeno Ca^{2+} induce-liberación de Ca^{2+} , esencial para la excitación-contracción, lo que la convierte en parte indispensable de la respuesta inotrópica positiva.

El fenómeno de Ca^{2+} induce liberación de Ca^{2+} implica que la cantidad relativamente pequeña de Ca^{2+} que entra con la activación de los canales de tipo L, produce la apertura del poro del canal liberador de Ca^{2+} necesaria para la contracción ^{20,21}

El conocimiento de la ultraestructura del miocardio ha conducido al entendimiento anatómico del fenómeno, resalta, la estrecha cercanía que guardan las dilataciones del túbulo transversal (vesícula intermedia) y dilataciones del RS cercanas a la banda Z (cisternas terminales) que en conjunto forman la "triada de conjunción" ²² El estudio se ha enriquecido con observaciones de microscopía electrónica que sugieren la existencia de una proximidad extrema entre los canales de tipo L, que se proyectan de la superficie citoplasmática del túbulo transversal, y los canales liberadores de Ca^{2+} del RS, lo que

hace suponer que están posicionados de un modo que les permite la interacción. Esta relación estructural explicaría la regulación de la liberación de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje²³⁻²⁵

Si revisamos las características generales del canal liberador de Ca^{2+} veremos que es una proteína tetramérica que se encuentra unida a la membrana del RS mediante cuatro regiones simétricas, su porción citoplasmática consiste de 4 cavidades también simétricas rodeadas por 3 dominios, se ha demostrado que tiene sitios de activación altamente afines al Ca^{2+} y sitios de inactivación de baja afinidad al Ca^{2+} . A continuación se muestran algunos de los efectores que modulan la conductancia del canal (*Ver tabla II*)

Tabla II. Efectores que modulan la sensibilidad del canal liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico.

<i>Tipo de canal</i>	<i>Efactor en el sitio de activación</i>	<i>Efactor en el sitio de inactivación</i>
Canal liberador de Ca^{2+}	Calcio, cafeína, ryanodina, AMP, calmodulina, FK-506.	Magnesio, potasio, cloro

AMP adenosín monofosfato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha propuesto que la modulación del canal liberador de Ca^{2+} se produce cuando interactúan efectores alostéricos con las partes distales de la porción citoplasmática del receptor. Esta interacción provoca cambios conformacionales en el mismo, y con ello se modula la conductancia del canal^{23,26}.

Con la ayuda de la microscopía confocal aplicado a situaciones que condicionan aumento excesivo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como la isquemia-reperfusión, se ha observado que existe liberación espontánea de Ca^{2+} que no está mediada eléctricamente, ello se ha atribuido a un aumento significativo de Ca^{2+} en las triadas de conjunción y se plantea la hipótesis, que estos fenómenos categorizados como “chispas” y “olas” de Ca^{2+} podrían estar involucradas en la inestabilidad eléctrica y en la aparición de taquiarritmias ventriculares.²⁷ La importancia de estos eventos radica, como lo ha propuesto Ferrier y Howlett²⁸, en que bajo situaciones en las que se ha alterado la homeostasis iónica, la liberación espontánea de Ca^{2+} del RS puede realizarse por mecanismos diferentes al de la entrada de Ca^{2+} transmembranal mediado por los canales tipo L. Es posible que la disminución de las arritmias observada en ratas sometidas a la perfusión post-isquémica, previamente tratadas con dantrolene, sea producto de la inactivación del canal liberador de Ca^{2+} y con ello la disminución de la inestabilidad eléctrica del retículo sarcoplásmico debida a la sobrecarga de calcio.²⁹

EL PAPEL DE LA BOMBA DE Ca^{2+} ATPasa EN EL RETICULO

SARCOPLÁSMICO

Hasta el momento se han identificado 3 genes involucrados en la síntesis de la Ca^{2+} ATPasa del RS, SERCA 1, SERCA 2, SERCA 3.^{30, 31} La mayoría de la proteína Ca^{2+} ATPasa del miocardio está codificada por el gen SERCA 2, localizado en el

cromosoma 12³² Recientemente se logró aislar el gen SERCA3 en el miocardio humano, este se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p 13.3)³³ El gen SERCA 2, puede expresar dos tipos de proteínas, SERCA2a y SERCA2b, la primera se expresa exclusivamente en el corazón y el segundo en riñón, cerebro e intestino^{34,35} La regulación de la función de SERCA2a está estrechamente relacionada al fosfolambano (FLB), proteína membranar de 52 aminoácidos, que regula la velocidad de transporte de Ca^{2+} a través de SERCA2a. Este control se ejerce mediante la fosforilación de FLB realizada por la proteína-quinasa dependiente de AMP-cíclico, el cual se eleva durante la estimulación adrenérgica^{36,37} Estudios recientes han sugerido que ambas proteínas son parte de un solo canal selectivo de Ca^{2+} , o al menos son parte de un sistema de regulación proteína-proteína, y se ha propuesto que el aminoácido hidrofóbico 28 C-terminal del FLB, el cual “ancla” la proteína a la membrana, podría ser el sitio de interacción intramembranal entre ambas proteínas^{38,39} El estudio de la relación FLB-SERCA 2a se ha enriquecido con el desarrollo de un modelo de rata deficiente de FLB, con el que se ha demostrado que el FLB tiene efectos inhibitorios sobre el SERCA 2a, y que la fosforilación de el FLB es el estímulo que suprime esta función inhibitoria de recaptura de Ca^{2+} hacia el RS. Es por ello, que en estas ratas transgénicas, se observa una función cardíaca hiperdinámica, caracterizada por un aumento del inotropismo positivo y por una relajación acelerada^{40, 41} Este modelo experimental ha ampliado enormemente el conocimiento de las funciones de estas dos proteínas, sobre todo de la estrecha relación entre el lusitropismo con el inotropismo.

Se considera que el efecto de la activación de SERCA 2a en la función cardíaca es crítica para la relajación miocárdica, y en cuanto a la proporción que ésta ocupa en el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RS, se sabe representa el 80% de la proteína integral y ocupa un tercio del área total del RS ⁴²

Estos hallazgos, han permitido saber que la función de SERCA 2a tiene un papel importante en la función contráctil, ya que proporciona al RS las cantidades suficientes de Ca^{2+} para la liberación en el siguiente latido cardiaco. Debido a ello, se ha propuesto a la activación de SERCA 2a mediado por FLB como el componente mayor de la respuesta inotrópica positiva inducido por la estimulación adrenérgica.⁴¹ SERCA representa a nivel subcelular, la proteína que proporciona al miocito la propiedad de diástole (lusitropismo), por lo que su función es fundamental para el desarrollo de la fuerza de contracción, y da por lo tanto, el sustento molecular a la ley de Frank-Starling. En este sentido, existen estudios en ratas que han propuesto que la disminución de la recaptura de Ca^{2+} por el SERCA 2a hacia el RS, sería la responsable de la respuesta inotrópica positiva disminuida en las ratas diabéticas ⁴³

Además de estos hallazgos, se ha propuesto que existe un mecanismo de retroalimentación positiva, el cual señala que la disminución de la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS es compensada por una disminución de la liberación de Ca^{2+} del RS. ⁴⁴

Recientemente, se ha demostrado una relación positiva entre el grado de expresión de RNAm de SERCA 2a y la función contráctil de miocardio de perros con insuficiencia cardiaca inducida con frecuencias ventriculares rápidas, y se ha observado que la thapsigargina y el ácido ciclopiazónico, conocidos inhibidores de SERCA 2a, deprimen la función contráctil del miocardio y aumentan la duración de la $[Ca^{2+}]_i$ transitoria ⁴⁵ En el mismo sentido Hajjar et al ⁴⁶ demostraron, mediante la infección-transfección de SERCA en miocitos de ratas recién nacidas, un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ máxima y un aumento en el acortamiento del miocito. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que

el SERCA 2a puede ser un modulador importante de la contracción miocárdica y que su regulación podría ser benéfica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la reperfusión post-isquémica, y toda la gran gama de entidades que cursan con alteraciones del gradiente subcelular de catión

LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE Ca^{2+} EN SITUACIONES DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN

La lesión por especies reactivas de oxígeno es característica durante la isquemia y la reperfusión

El RS juega un papel central en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, durante la isquemia-reperfusión esta función se ve alterada y se presenta un aumento en la liberación y disminución de la recaptura de calcio hacia este organelo ⁴⁷⁻
⁵⁰ La sobrecarga de calcio durante la isquemia-reperfusión implica un deterioro agudo y progresivo de la función de los canales y las bombas iónicas. Diversos mecanismos se han propuesto para explicar el daño a estas proteínas, entre ellas la activación de proteasas y el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) Sobre estas últimas se han inclinado las evidencias que explican la alteración de su función Como es conocido, la producción de ERO durante la isquemia se ve aumentada, pero no es sino hasta la fase de reperfusión que existe un aumento desproporcionado en sus concentraciones, mismas que se han relacionado con taquiarritmias y disfunción contráctil ^{51, 52}

Se conocen al menos 5 vías metabólicas que producen ERO

- 1) sistema xantina/ xantina oxidasa, X/XO
- 2) sistema metabólico de la vía de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico

el SERCA 2a puede ser un modulador importante de la contracción miocárdica y que su regulación podría ser benéfica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la reperfusión post-isquémica, y toda la gran gama de entidades que cursan con alteraciones del gradiente subcelular de catión

LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE Ca^{2+} EN SITUACIONES DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN

La lesión por especies reactivas de oxígeno es característica durante la isquemia y la reperfusión

El RS juega un papel central en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, durante la isquemia-reperfusión esta función se ve alterada y se presenta un aumento en la liberación y disminución de la recaptura de calcio hacia este organelo ⁴⁷⁻
⁵⁰ La sobrecarga de calcio durante la isquemia-reperfusión implica un deterioro agudo y progresivo de la función de los canales y las bombas iónicas. Diversos mecanismos se han propuesto para explicar el daño a estas proteínas, entre ellas la activación de proteasas y el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) Sobre estas últimas se han inclinado las evidencias que explican la alteración de su función Como es conocido, la producción de ERO durante la isquemia se ve aumentada, pero no es sino hasta la fase de reperfusión que existe un aumento desproporcionado en sus concentraciones, mismas que se han relacionado con taquiarritmias y disfunción contráctil ^{51, 52}

Se conocen al menos 5 vías metabólicas que producen ERO

- 1) sistema xantina/ xantina oxidasa, X/XO
- 2) sistema metabólico de la vía de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico

Efectos de las ERO sobre el potencial de acción y la apertura de los canales de Ca^{2+} del RS.

El aumento de la producción de ERO, producto de la respuesta temprana al estrés oxidativo, induce cambios en la polaridad de la membrana, y cambios en las características del potencial de acción. Utilizando el sistema X/XO para producir ERO, en el miocardio ventricular de cobayo, se ha observado una despolarización espontánea de la membrana, disminución en la amplitud y la tasa máxima de elevación del potencial de acción.⁵³ Existen estudios que han reportado actividad de post-potenciales tempranos y post-potenciales tardíos en miocardio expuesto a diversas ERO, estos hallazgos toman importancia ya que estas alteraciones de la repolarización se relacionan a actividad eléctrica desencadenada, involucrada en la aparición de la taquicardia ventricular polimórfica o *torsades de pointes* y taquicardia ventricular monomórfica, taquiarritmias predominantes en el período de reperfusión^{54, 55}. La despolarización de la membrana inducida por ERO se ha atribuido a la inhibición de la corriente de Na^+ , a una corriente hacia el interior de K^+ y a un aumento del Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$. Esta última, también se ha propuesto, esta implicada en las alteraciones de la repolarización que induce taquiarritmias⁵⁶.

Recientemente, Tokube et al⁵⁷ al exponer miocardio de cobayos a ERO, reportaron cambios bifásicos en la duración del potencial de acción, con un prolongamiento inicial del potencial de acción debido a un decremento rápido de la corriente total de K^+ , y posteriormente un acortamiento del potencial debido a un decremento del influjo total de Ca^{2+} y al incremento de la salida de K^+ sensible al ATP. A continuación mostraremos ejemplos de las alteraciones encontradas en el potencial transmembranal cuando se somete miocitos a ERO.



En cuanto a los cambios morfológicos y funcionales que inducen las ERO sobre el canal liberador de Ca^{2+} , se ha observado que provocan, en un periodo inicial, un incremento en la probabilidad de que se mantenga un estado de apertura del canal (P_0) que es seguido por la pérdida irreversible de la función del canal ⁵⁸ Así mismo, en el RS de miocardio de ovejas, el H_2O_2 , (3-5 mM) modifica directamente el estímulo de activación del canal liberador de Ca^{2+} , causando un incremento en el P_0 , sin afectar la conductancia o la modulación del canal con ATP, cafeína, Mg^{2+} o ryanodina ⁵⁹ Sin embargo, a pesar de estas alteraciones, otros estudios han sugerido que el calcio, es el factor primordial sobre la P_0 , en este sentido Cheng et al, ⁶⁰ en miocardio de rata demostraron que la probabilidad de la apertura del canal liberador de Ca^{2+} es proporcional al cuadrado de la concentración intracelular de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Si tenemos en cuenta que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo se encuentra al doble en aquellas células que muestran signos de sobrecarga de Ca^{2+} como reportaron Wier et al ⁶¹, la afección de las proteínas del RS, podría ser causa de un mecanismo combinado entre las ERO y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En cuanto a las alteraciones de los canales de recaptura, SERCA y PMCA, existen diversos estudios que demuestran que las ERO inducen una disminución de su actividad e inhibición, respectivamente. ⁶²⁻⁶⁶ El mecanismo propuesto para producir este efecto, se basa en el hecho que el H_2O_2 y el O_2^- desacoplan e inhiben la reacción hidrolítica de la bomba PMCA y SERCA, respectivamente ⁶⁷ Además, se ha observado que la fuga de electrones del sistema de transporte de electrones de la mitocondria produce efectos deletéreos cuando interactúan con proteínas subcelulares encargadas del transporte de iones. Los canales iónicos que se cree son los objetivos primarios de las ERO incluyen al canal liberador de Ca^{2+} de 106-kDa, los canales de tipo L, y el canal liberador de Ca^{2+}

o RyR y los canales de K^+ . Se ha propuesto que la forma en que las ERO causan alteraciones funcionales, está relacionada con el incremento de las concentraciones intracitoplasmáticas de Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$,^{68, 69} Se ha considerado que en este fenómeno se encuentran directamente involucradas, la depresión de Ca^{2+} -ATPasa del sarcolema (PMCA), la inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa del RS (SERCA2a), la modificación del “gatillo” del canal liberador de Ca^{2+} , cambios en el intercambiador Na^+/H^+ o mediante la filtración inespecífica de calcio a través de las membranas. Ante la pregunta ¿cuales son las proteínas iónicas que son más susceptibles a daño por ERO que desencadenan sobrecarga de calcio? los datos sugieren que las bombas de Ca^{2+} son más sensibles a las ERO que los canales de Ca^{2+} . Un hallazgo que apoya esta afirmación, se basa en que las ERO inducen disminución de la actividad de forma irreversible del canal de Ca^{2+} sensible al voltaje o de tipo L, y por ello es poco probable que exista un aumento de la corriente de Ca^{2+} y con ello la activación del canal liberador de Ca^{2+} , por lo que la sobrecarga de Ca^{2+} durante la reperfusión quizás sea producto de la afeción sobre SERCA2a.⁷⁰

Se han propuesto otros mecanismos para explicar la alteración de la homeostasis del calcio vía las ERO, entre ellas, el aumento en la producción de óxido nítrico y alteraciones en la sensibilidad al IP3. (ver detalles en la referencia 61)

A continuación presentamos los efectos generales de las ERO en la producción del daño celular, como se señala en la Figura II, el aumento en la producción de ERO no es exclusiva de la isquemia-reperfusión. Este esquema, propone una secuencia progresiva de los eventos fisiopatogénicos involucrados en el daño celular (*Ver figura 2*)

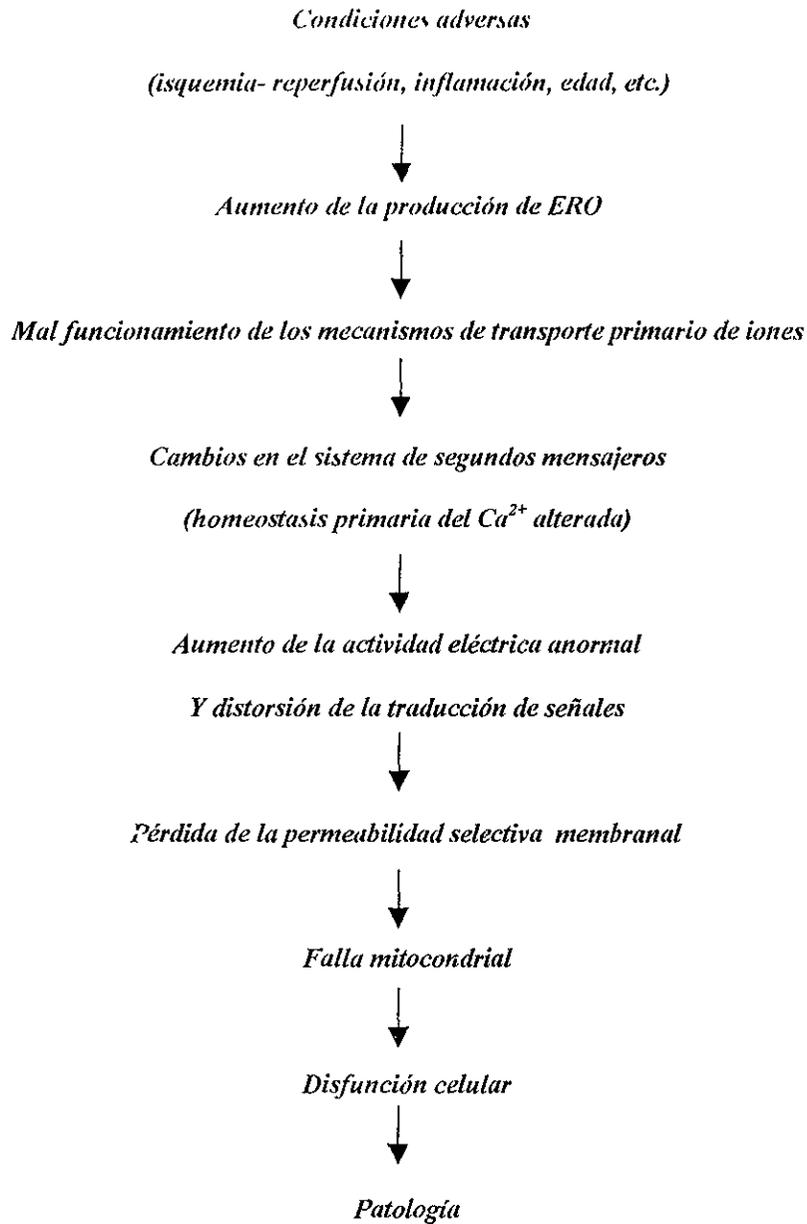


Figura 2. Diagrama de flujo de los efectos fisiopatogénicos relacionados con el aumento de la producción de ERO.

La oxidación de las proteínas iónicas en la isquemia-reperfusión provocan un aumento de su proteólisis

Además de las alteraciones observadas en el funcionamiento de las proteínas transportadoras de iones, se ha demostrado que la mayoría de las proteínas parcialmente oxidadas y las proteínas desnaturalizadas son más susceptibles al ataque proteolítico. Incluso se ha señalado que estas proteínas oxidadas constituyen “marcadores” o “señales” para la rápida degradación y remoción proteolítica en las células. Diversos estudios han demostrado, que los sistemas de oxidación catalizados por metales, producen alteraciones sobre los residuos de histidina. Los grados limitados de oxidación producen aumento de la hidrofiliidad, en cambio, grados mayores de oxidación producen aumento de la hidrofobicidad, la modificación de al menos dos subunidades de histidina producen aumento de la susceptibilidad a la proteólisis ⁷¹ A continuación mostramos el diagrama de flujo hipotético de la inducción de esta proteólisis-mediada por ERO (Ver figura 3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

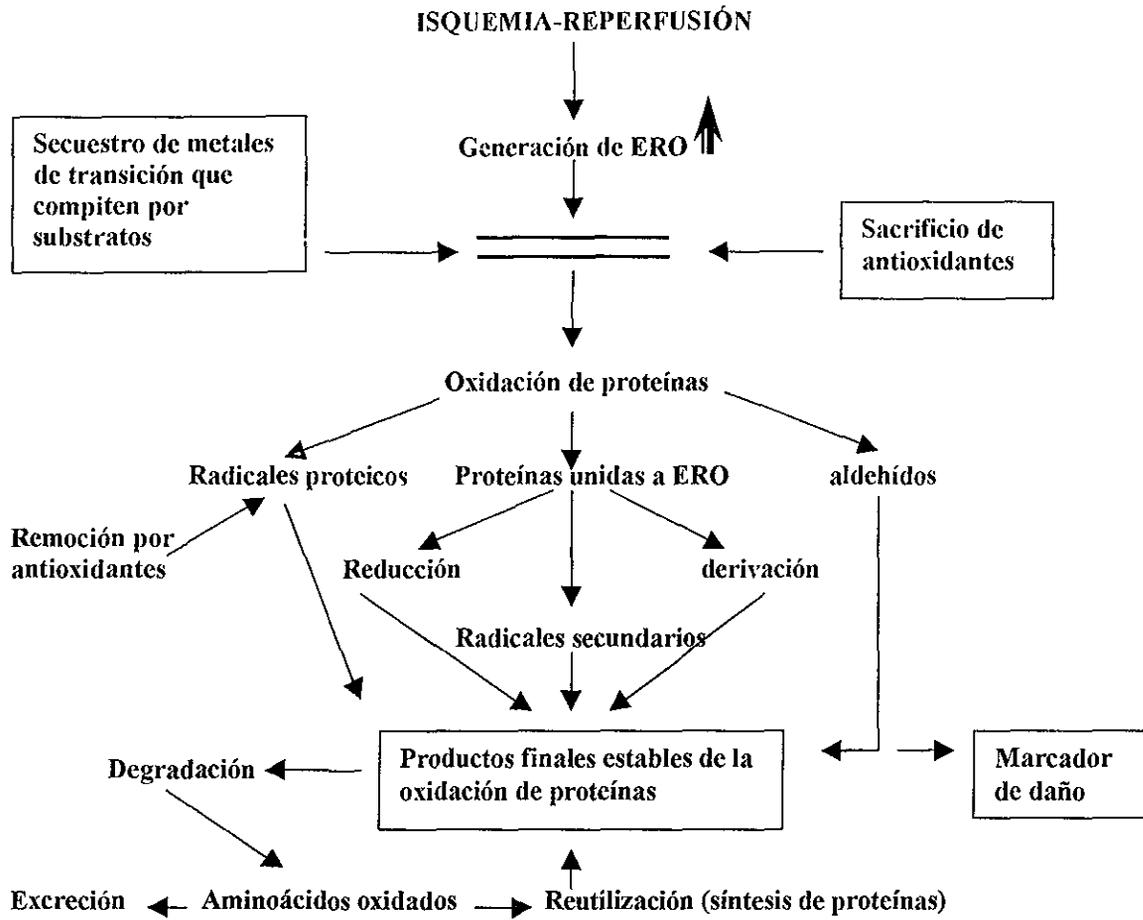
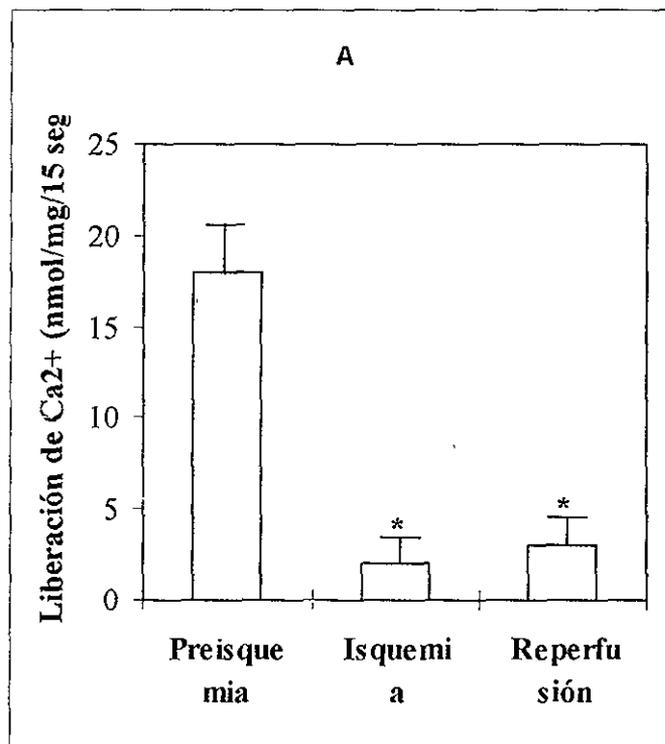


Figura 3. Mecanismos postulados para la oxidación de proteínas in vivo. (De Ref. 54)

Son diversos los estudios que han demostrado un aumento de la proteólisis posterior a un evento de isquemia y reperfusión, entre estos los realizados por Holmberg⁴⁸ y Yoshida⁵⁰, quienes han reportado un aumento en la degradación de las proteínas del RS durante la reperfusión, entre las que se encuentra el canal liberador de Ca^{2+} y las bombas de Ca^{2+} ATPasa. Osada et al⁷² sometieron a ratas a reperfusión post-isquémica y demostraron que los miocardios durante la fase isquémica presentaron una disminución significativa de la actividad de liberación y captura de calcio en ratas sometidas a reperfusión post-isquémica (Ver figura 4)



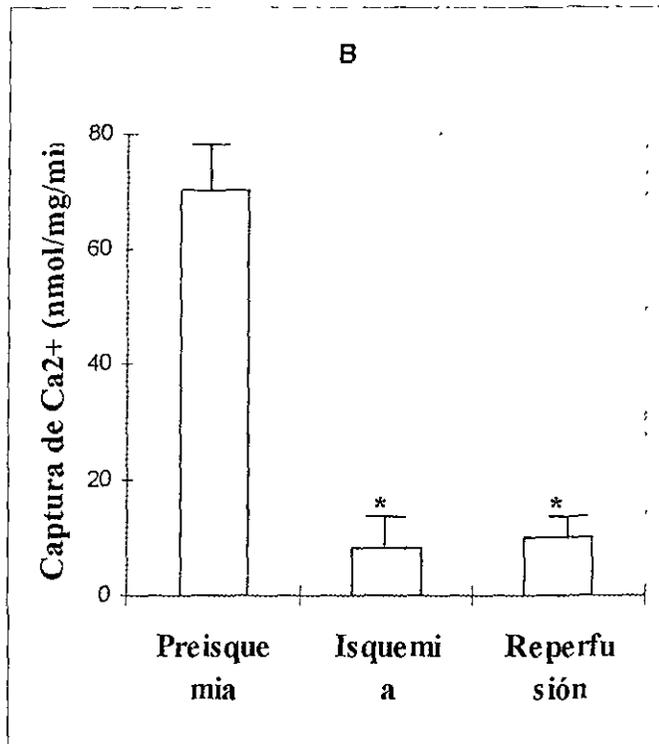
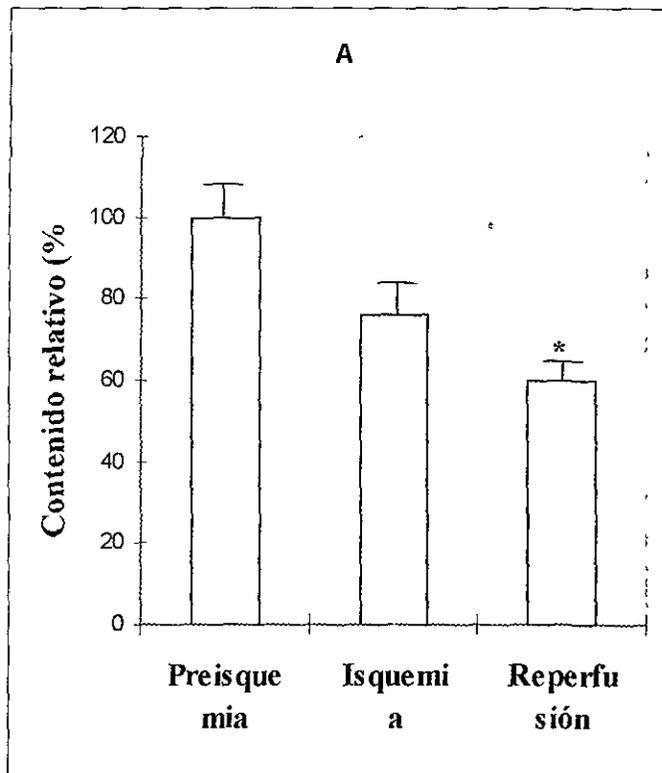


Figura 4. Actividad de liberación y captura de Ca^{2+} en corazón de rata sometidas a isquemia y reperfusión. (A) Liberación de Ca^{2+} de vesículas de retículo sarcoplásmico. (B) Captura de Ca^{2+} en vesículas de retículo sarcoplásmico. * $P=0.05$ respecto al estado de preisquemia.

También fue interesante observar la disminución del 47% del contenido de SERCA, sin que se presentaran cambios en el canal liberador de Ca^{2+} , después de la fase de reperfusión la degradación de proteínas fue más intensa en estas ratas en donde se observó un decremento del 40 y 51% en el contenido del canal liberador y en el SERCA, respectivamente (Ver figura 5)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

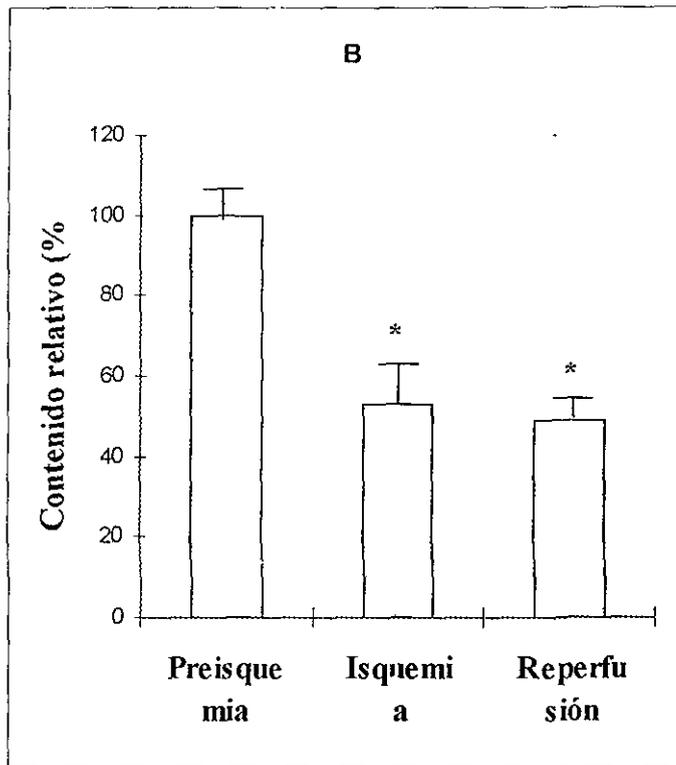


Figura 5. Contenido relativo de proteína del retículo sarcoplásmico. (A) Canal liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. (B) Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico SERCA. * $P= 0.05$ respecto al estado de preisquemia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es de llamar la atención, que el contenido y la actividad de FLB en el RS no sufrió modificaciones en los miocardios sometidos a isquemia-reperfusión. Previamente, se había demostrado que la tasa de fosforilación de FLB por proteína cinasa dependiente de AMPc (PC-AMPc), tampoco sufre cambios significativos en miocardio de cerdo sometido a isquemia-reperfusión⁷³

Es interesante observar que la fosforilación del canal liberador, SERCA y FLB mediado por proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina estuvo significativamente disminuida en la fase isquémica en 93, 74 y 33%, respectivamente, y se observó que durante la fase de perfusión la fosforilación de FLB se mantiene a niveles similares previos a la isquemia, no así la fosforilación del canal liberador de Ca^{2+} y SERCA.

La importancia combinada de la disminución de la cantidad de proteínas, de la fosforilación y de la actividad de los canales de captura y liberación de calcio del RS en un evento de isquemia-reperfusión, reside, en que proporcionalmente existe una disminución significativa en la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, en la tasa máxima de relajación y contracción⁷². En este sentido, se ha investigado el papel que juegan estas proteínas transportadoras de iones en la enfermedad que por definición presenta alteraciones importantes de la relajación-contracción, la insuficiencia cardíaca. La importancia se ha centrado en las alteraciones en el tránsito de Ca^{2+} (aumento del tiempo de tránsito) observadas en la diástole, misma que es característica en la miocardiopatía dilatada e isquémica. Es común en ambas, que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, sea producto de disminución de la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS. Son diversos los estudios que han determinado que en estas enfermedades existe una disminución de la actividad de SERCA2a y de la expresión de RNAm de SERCA2a y FLB.⁷⁴⁻⁷⁶ En la

miocardiopatía isquémica, los niveles de RNAm del canal liberador de Ca^{2+} y del canal de tipo L, se encuentra disminuido de forma significativa, respecto a la miocardiopatía dilatada y los controles.⁷⁷ Las alteraciones encontradas en la expresión de los canales, relacionados a la homeostasis del Ca^{2+} , se han relacionado con las alteraciones en la función sistólica y diastólica que caracterizan a esta entidad clínica.⁷⁷⁻⁷⁹ Se considera que las anormalidades en el acoplamiento de la excitación-contracción, específicamente el manejo alterado del Ca^{2+} por el RS, es el mecanismo responsable de mayor importancia en la disfunción contráctil de los corazones insuficientes.⁸⁰⁻⁸³

Calcio intracelular elevado como fenómeno resultante.

El aumento progresivo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que como anteriormente hemos documentado, resultado de las alteraciones sobre las proteínas del RS, se encuentra relacionado a eventos de suma importancia como las arritmias y la disfunción diastólica (stunned heart) durante el episodio de reperfusión post-isquémica

El aumento del calcio intracelular se explica, entonces, por 4 fenómenos cruciales 1) paso de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en reversa, en respuesta a concentraciones elevadas de Na^+ intracelular, provocado por la lesión sobre la Na^+/K^+ ATPasa, 2) disminución de la actividad de las bombas de Ca^{2+} ATPasa (PMCA y SERCA) producida por ERO y proteasas, 3) La liberación de Ca^{2+} del RS inducido por incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, conocidos como “fenómenos de liberación espontáneos” 4) Apertura del megacanal mitocondrial o poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) Este último fenómeno se ha propuesto como crítico en el paso de la lesión reversible a irreversible en las lesiones por isquemia y reperfusión.⁸⁴ A este respecto, se ha señalado que el flujo de Ca^{2+} mitocondrial durante la TPM está

relacionado con el daño al sarcolema, y fármacos como el dithiothreitol y ciclosporina inhiben este daño, al disminuir este eflujo^{85,86}

Existen al menos dos mecanismos hipotéticos conocidos que disminuyen la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} . El primero, es la exposición del tejido a niveles altos de catecolaminas producidas por la isquemia,⁷⁷ este mecanismo a la vista, podría inducir un aumento de AMPc, y el segundo mecanismo es, el aumento de proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina producido por las concentraciones aumentadas de Ca^{2+} intracelular. En conjunto estos dos eventos estimularían la fosforilación de la troponina I, que tiene la capacidad intrínseca de disminuir la sensibilidad del Ca^{2+} a las miofibrillas.⁸⁷ Un estudio ha señalado que este efecto podría estar relacionado por la inhibición de las fosfatasa inducidas por la acidosis.⁸⁸ Sin embargo, los efectos lesivos de los segundos mensajeros están sometidos aún, a intensa investigación, y no existen todavía datos que sean definitivos.

En cuanto al problema de las arritmias, se propone que el aumento de Ca^{2+} en las triadas de conjunción facilita la activación del canal liberador de Ca^{2+} , y además, se ha observado que las probabilidades de que el canal de tipo L induzca activación del canal liberador de Ca^{2+} es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ local.⁸⁹ Otro fenómeno involucrado en las arritmias de reperfusión es la inestabilidad eléctrica que induce las “liberación espontánea de Ca^{2+} del RS”, fenómeno que es independiente del voltaje. La importancia de este fenómeno radica en que las “ondas de Ca^{2+} ” producen una corriente despolarizante de membrana que resulta en la aparición de las arritmias.^{28,90} Dado que este artículo no pretende dar una explicación amplia de la disfunción contráctil y las arritmias, no ahondaremos en esta ocasión en ellos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En resumen, las proteínas localizadas en el retículo sarcoplásmico juegan un papel de suma importancia para la función miocárdica, la isquemia-reperfusión representa una entidad que, de forma característica, provoca alteraciones en su funcionamiento. Los hallazgos hasta ahora reportados, apuntan que son las especies reactivas de oxígeno las involucradas en el deterioro de su función, sin embargo, la sobrecarga de Ca^{2+} subyace como una condición *sine qua non* para que se produzcan las alteraciones de la excitación-contracción-relajación.

PERSPECTIVAS CLÍNICAS

Las evidencias presentadas en este documento, señalan que las proteínas transportadoras de iones del RS son un objetivo primario de las ERO y las proteasas, y también son responsables de que se produzcan alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular. Este conocimiento ha motivado el interés en el diseño de intervenciones terapéuticas para proteger al miocardio de la sobrecarga de calcio. Para mencionar alguna, tenemos la utilización de nuevas drogas como el etomoxir, un factor transcripcional que aumenta la expresión de SERCA2a, que ha demostrado experimentalmente mejorar la función de miocardios hipertróficos sin afectar el flujo sanguíneo; y por otro lado, el hecho que la glucosa y la hormona tiroidea pueden modular la expresión de esta proteína, es motivo de ardua investigación. La gran cantidad de conocimientos en la última década, permite una comprensión en detalle de los mecanismos fisiopatogénicos que provocan la sobrecarga de Ca^{2+} , misma que es la regla en una amplia gama de enfermedades cardiovasculares, entre ellas la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, el daño por isquemia-reperfusión, la aterosclerosis, etc. Los conocimientos derivados de esta ardua investigación permitirá el nacimiento

En resumen, las proteínas localizadas en el retículo sarcoplásmico juegan un papel de suma importancia para la función miocárdica, la isquemia-reperfusión representa una entidad que, de forma característica, provoca alteraciones en su funcionamiento. Los hallazgos hasta ahora reportados, apuntan que son las especies reactivas de oxígeno las involucradas en el deterioro de su función, sin embargo, la sobrecarga de Ca^{2+} subyace como una condición *sine qua non* para que se produzcan las alteraciones de la excitación-contracción-relajación.

PERSPECTIVAS CLÍNICAS

Las evidencias presentadas en este documento, señalan que las proteínas transportadoras de iones del RS son un objetivo primario de las ERO y las proteasas, y también son responsables de que se produzcan alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular. Este conocimiento ha motivado el interés en el diseño de intervenciones terapéuticas para proteger al miocardio de la sobrecarga de calcio. Para mencionar alguna, tenemos la utilización de nuevas drogas como el etomoxir, un factor transcripcional que aumenta la expresión de SERCA2a, que ha demostrado experimentalmente mejorar la función de miocardios hipertróficos sin afectar el flujo sanguíneo; y por otro lado, el hecho que la glucosa y la hormona tiroidea pueden modular la expresión de esta proteína, es motivo de ardua investigación. La gran cantidad de conocimientos en la última década, permite una comprensión en detalle de los mecanismos fisiopatogénicos que provocan la sobrecarga de Ca^{2+} , misma que es la regla en una amplia gama de enfermedades cardiovasculares, entre ellas la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, el daño por isquemia-reperfusión, la aterosclerosis, etc. Los conocimientos derivados de esta ardua investigación permitirá el nacimiento

de nuevas medidas terapéuticas útiles en el tratamiento de estas enfermedades, que son de suma importancia en el campo de la cardiología

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ESTA TESIS NO ES UN
DE LA BIBLIOTECA

Bibliografia

1. Fierari R, Currello S, Cargnoni A, Condorelli F, Belloni S, Albertini A, Vistoli O. Metabolic changes during post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 119-133.
2. Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935; 112: 351-361.
3. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, post-ischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66 (6): 1146-1149.
4. Fibrinolytic Therapy Trialists (FTT) Collaborative Group: Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: Collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more 1,000 patients. *Lancet* 1994; 343: 311-322.
5. Kilgore KS, Lucchesia BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem* 1993; 26: 359-370.
6. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 1986; 548: 47-63
7. Silverman HS. Mitochondria free calcium regulation in hypoxic and reoxygenation relation to cellular injury. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 483-494.
8. Kusuoka H, Marban E. Cellular mechanisms of myocardial stunning. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 243-256.
9. Tam M. Mechanism of Ca²⁺ overload in reperfused ischaemic myocardium. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 543-559.
10. Brooks W, Conrad CH, Morgan J. Reperfusion induced arrhythmias following ischaemia in intact rat heart: role of intracellular calcium. *Cardiovascular research* 1995; 29: 536-542
11. Katz AM. Protein families that mediated Ca²⁺ signaling in the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 1996; 78 (suppl 9):2-6.
12. Chapman RA. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 1979; 35: 1-52.
13. Rouquier S, Batzer MA, Giorgi D. Application of bacterial artificial chromosomes to the generation of contiguous physical maps: a pilot study of human ryanodine receptor gene (RYR1) region. *Anal Biochem* 1994 mar; 217 (2):205-209
14. Moroni, Gonano EF, Comi GP, Tegazzin V, Prella A, Bordini A. Ryanodine receptor gene point mutation and malignant hyperthermia susceptibility. *J Neurol* 1995; 242 (3): 127-133.
15. Phillips MS, Fujii J, Khanna VK, De Leon S, Yokobata K. The structural organization of the human skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Genomics.* 1996; 34 (1): 24-41.
16. Treves S, Larini F, Menegazzi P, Sreimberg TH, Koval M, Vilsen B. Alteration of intracellular Ca²⁺ transient in Cos 7 cells transfected with the cDNA encoding skeletal muscle ryanodine receptor carrying a mutation associated with malignant hyperthermia. *Biochem J* 1994; 301 (pt3): 661-665.
17. Quane KA, Keating KE, Manning BM, Healy JM, Monsieurs K. Detection of a novel common mutation in the ryanodine receptor gene in malignant

- hiperthermia: implications for a diagnosis and heterogeneity Studies. *Human Mol Genet* 1994; 3 (3). 471-476.
18. Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Duff C, De Leon S, Khanna VK: Polymorphism and deduced aminoacids substitutions in the coding sequence of the ryanodine receptor (RYR1) gene in individuals with malignant hyperthermia. *Genomics* 1992; 13 (4). 1247-1254
 19. Phillips MS, Khanna VK, De Leon S, Frodis W: The substitution of Arg for Gly 2433 in the human skeletal muscle ryanodine receptor is associated with malignant hyperthermia. *Hum Mol Genet* 1994; 3 (12): 2181-2186.
 20. Claphan DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; 80: 259-268.
 21. Fabiato A Calcium -induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245: C1-C14.
 22. Huxley AF The links between excitation and contraction. *Proc R Soc Lond Ser B* 1962; 160. 286-288.
 23. Wagenknecht T, Radermacher M. Three dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS-Lett* 1995; 369 (1): 43-46.
 24. Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Amstrong C: Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1988; 107 (6 Pt 2): 2587-2600.
 25. Takekura H, Bennet L, Tanabe T, Bean KG, Franzini- Amstrong C. Restoration of junctional tetrads in disgenic myotubules by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys J* 1995; 67 (2): 793-803.
 26. Meissner G, Rios E, Tripathy A, Pasek DA: Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. *J Biol Chem* 1997; 272 (3):1628-1638
 27. Berlin JR, Cannell MB, Lederer WJ: I_{T1} in single rat cardiac ventricular cells: relations to fluctuations in intracellular Ca^{2+} . *Circ Res* 1989; 65: 115-126.
 28. Ferrier GR, Howlett SE. Contractions in guinea-pig ventricular myocytes triggered by a calcium-release mechanism separate from Na^+ and L-currents. *J Physiol (Lond)* 1995; 484. 107-122
 29. Balam EO, Carvajal K, Cruz D: Efecto protector del dantrolene en las lesiones miocárdicas producidas por la reperfusión post-isquémica. *Arch Inst Cardiol Méx* 1999; 69: 311-319.
 30. Burk SE, Lytton J, MacLennan DH, Shull GE. CDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pumps. *J Biol Chem* 1989; 264: 18561-18568.
 31. Genteski-Hamblin AM, Greeb J, Shull GE. A novel Ca^{2+} pump expressed in brain, kidney and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca -ATPase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 15032-15040.
 32. Ohno Y, Matsuo K, Suzuki H, Tanase H, Serikawa T, Takano T: Genetic linkage of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 gene to intracellular Ca^{2+} concentration in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227 (3). 789-793.
 33. Mountian I, Attard M, Town M, Casteels R: Structure of the human sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 3 gene. Promoter analysis and

- alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem* 1998; 273 (22): 13982-94.
- 34 Anger M, Samuel JL, Marotte F, Whytack F, Rappaport L, Lompe AM In situ mRNA distribution of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoforms during ontogeny in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 539-550
- 35 Schwartz K, Boholer KR, De la Bastie D, Lompre A, Mecardier J. Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. *Am J Physiol* 1992; 262: R364-R369.
- 36 Tada M, Katz AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 1982; 44:401-423.
- 37 Wegener AD, Simmerman HK: Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles: Generation of a low resolution model of phospholamban structure. *J Biol Chem* 1986; 261: 5154-5159.
- 38 Ludlam CF, Arkam IT, Liu XM. Fourier transform infrared spectroscopy and site-directed isotope labeling as a probe of local secondary structure in the transmembrane domain of phospholamban. *Biophys J* 1996; 70 (4): 1728-1736.
- 39 Kimura Y, Kurzydłowski K, Tada M. Phospholamban regulates the Ca²⁺-ATPase through intramembrane interactions. *J Biol Chem* 1996; 271 (36):21726-21731.
- 40 Chu G, Luo W, Slack JP, Tilgmann C, Sweet WE, Spindler M, Saupe KW, et al. Compensatory mechanism associated with the hyperdynamic function of phospholamban-deficient mouse heart. *Circ Res* 1996; 78: 1064-1076.
41. Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulatory of myocardial contractility. *Circ Res* 1996; 79: 1059-1063
42. Strayer L. *Bioquímica. Tercera edición. Barcelona, 1990. Cap 36-37.*
43. Tamada A, Hattori Y, Houzan H, Yamada Y, Sakuma I, Kitabatake A, et al. Effects of b-adrenoceptor stimulation on contractility, [Ca²⁺]_i, and Ca²⁺ current in diabetic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1998; 274: H1849-H1857.
44. Lopaschuk GD, Tahiliani AG, Vadlamudi RV, Katz S, McNeill JH. Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine-treated diabetic rats. *Am J Physiol* 1983; 245: H969-H976.
45. Saito KI, Tsutsui H, Yamamoto S, Takahashi M, Kinugawa S, Tagawa H, et al. Role of SR Ca²⁺-ATPase in tachycardia-induced heart failure. *Am J Physiol* 1998; 275: H31-H44
46. Hajar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, Rosenzweig A. Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 1997; 95: 423-429.
47. Dhalla NS, Panagia V, Singal PK, Makino N, Dixon MI, Eyołfson A. Alterations in heart membrane calcium transport during development of ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20 (suppl 2): 3-13.
48. Holmberg SR, Williams AJ. The calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum: function in the failing and acutely ischaemic heart. *Basic Res Cardiol* 1992; 87 (suppl 1):255-268.
- 49 Rapundalo ST, Briggs FN, Feher JJ. Effects of ischemia on isolated and function of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 1986; 18: 837-851.
- 50: Yoshida Y, Shiga T, Imai S. Degradation of sarcoplasmic reticulum calcium-pumping ATPase in ischemic-reperfused myocardium: role of calcium-activated neutral proteases. *Basic Res Cardiol* 1990, 85: 494-507.

51. Bolli R Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990; 82 (3): 723-738.
52. Hearse DJ "Stunning": A radical re-view. *Cardiovascular Drugs and therapy* 1991; 5 853-876.
53. Pallandi RT, Perry MA, Campbell. Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion-induced arrhythmias. *Circ Res* 1987; 61:50-54
54. Barrington PL: Interactions of H₂O₂, EGTA and patch pipette recording methods in feline ventricular myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1994; 26: 557-568.
55. Barrington PL, Meier CF, Weglicki WB: Abnormal electrical activity induced by free radical generating systems in isolated cardiocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1998; 20: 1163-1178.
56. Matsuda H, Noma A, Kurachi Y, Irisawa H. Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. Calcium mediated membrane potential fluctuations. *Circ Res* 1982; 51:142-151.
57. Tokube K, Kiyosue T y Arita M. Opening of cardiac K_{ATP} channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am J Physiol* 1996, 271: H478-H489.
58. Holmberg SR, Cumming MD, Kusama Y, Hearse DJ, Poole-Wilson PA, Shattock MJ. Reactive oxygen especies modify the structure and function of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Cardioscience* 1991; 2: 19-25.
59. Boraso A, Williams J. Modification of the gating cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel by H₂O₂ and dithiothreitol. *Am J Physiol* 1994; 267: H1010-H1016.
60. Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannel MB. Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1996; 270: C148-C156.
61. Wier WG, Cannel MB, Berlin JR, Marban E, Lederer WJ. Cellular and subcellular heterogeneity of [Ca²⁺]_i in single heart cells revealed by fura-2. *Science Wash DC* 1987; 235. 325-328.
62. Grover AK, Samsom SE. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am J Physiol* 1988; 255. C297-C233.
63. Grover AK, Samsom SE, Fomin VP Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol* 1992, 263: H537-H543.
64. Grover AK, Samsom SE, Fomin VP, Werstuck ES. Effects of peroxide and superoxide on coronary artery: Ang II, response and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *Am J Physiol* 1995; 269: C546-C553.
65. Lee C, Okabe E Hydroxyl radical-mediated reduction Ca²⁺ ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Jpn J Pharmacol* 1995; 67: 729-734
66. Rowe GT, Manson NH, Caplan M, Hess ML. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leucocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 1983; 53 584-591.
67. Kukreja RC, Kearns AA, Zweier JL, Kuppusan P, Hess ML. Singlet oxygen interaction with Ca²⁺ ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 1991; 69: 1003-1012.
68. Burton KP, Morris AG, Massey KD, Buja LM, Hagler HK. Free radicals alter ionic levels and membrane phospholipids in cultured rat ventricular myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1990; 22 1035 1047

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

- 69 Hayashi H, Miyata H, Watanabe H, Kobayashi A, Yamazaki N. Effects of hydrogen peroxide on action potential and intracellular Ca^{2+} concentration of guinea pig heart. *Cardiol Vasc Res* 1989; 23: 167-773.
- 70 Kourie JJ. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanism. *Am J Physiol* 1998; 275: C1-C24
- 71 Dean RT, Shanlin L, Stocker R, Davies M. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18
- 72 Osada M, Netticadan T, Tamura K, Dhalla NS. Modification of ischemia-reperfusion-induced changes in cardiac sarcoplasmic reticulum by preconditioning. *Am J Physiol* 1998; 274: H2025-H2034
- 73 Lamers JM, Duncker DJ, Bezstarostk K, McFalls EO, Sassen MA, Verdouw PD. Increased activity of the sarcoplasmic reticular calcium pump in porcine stunned myocardium. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 520-524.
74. Kuhn C, Reigner F, Bohm M: Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end stage heart failure due to ischaemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 1996; 74 (6): 321-332.
- 75 Linck B, Boknik P, Eschenhagen T: Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR Ca^{2+} ATPase in failing and non failing human heart. *Cardiovasc Res* 1996, 31 (4): 625-32.
- 76 Schwinger RH, Bohm M, Schmidt U: Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca^{2+} ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 1995; 92 (11): 3220-3228
- 77 Brillantes AM, Allen P, Takahashi T, Izumo S, Marks AR: Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in the myocardium from patients with end stage heart failure causes by ischaemic versus dilated cardiomyopathy. *Circulation research* 1992, 71 (1): 18-26.
78. Mercadier J, Lompre A, Duc P, Boholer K, Frayssse J, Wisnewsky C, et al: Altered sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1990, 85: 305-309.
79. Takahashi T, Allen P, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, et al: Altered expression of genes encoding the Ca^{2+} regulatory proteins in the myocardium of patients with end-stage heart failure: Correlation with expression of the Ca^{2+} -ATPase gene. *Circ Res* 1992; 71:1357-1365
80. Morgan JP. Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N Engl J Med* 1991, 325: 625-632.
81. Smit V, Katz A: Inotropic and lusitropic abnormalities in the genesis of the heart failure. *Euro Heart J* 1983; 4 (suppl A):7-17.
82. Gwathamey JK, Copelas L, Mackinnon R, Schoen F, Feldman M, Grossman W, et al: Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 1987; 61:70-76.
83. Morgan JP: Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N Engl J Med* 1991, 325: 625-632.
84. Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE Mitochondrial calcium transport: Physiological and pathological relevance. *Am J physiol* 1994, 267: C313-C339.

85. Korge P, Langer GA. Mitochondrial Ca^{2+} uptake, efflux, and sarcolemmal damage in Ca^{2+} -overload cultured rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1998; 274: H2085-H2093.
86. Arteaga D, Odor A, López RM, Contreras G, Pichardo J, Chávez E: Impairment by ciclosporina A of reperfusion-induced arritmias. *Life Sci* 1992; 51: 1127-1134
87. Shindo T, Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I. Regional myocardial interstitial norepinephrine kinetics during coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1996; 270: H245-H251.
88. Venema RC, Kuo JF. Protein Kinase C-mediated phosphorylation of troponin I and C protein in isolated myocardial cells is associated with inhibition of myofibrillar actomyosin MgATPase. *J Biol Chem* 1993; 268: 2705-2711.
89. Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Cingolani HE, Orchard CH. Effects of acidosis on phosphorylation of phospholamban and troponin I in rat cardiac muscle. *Am J Physiol* 1996; 270: C107-C114.
90. Santana LF, Cheng H, Gomez AM, Cannel MB, Lederer WJ. Relation between the sarcolemmal Ca^{2+} current and Ca^{2+} sparks and local theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res* 1996; 78: 166-171.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN