



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL DIAZÓXIDO EN LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR EN  
MIOCITOS CARDIACOS DE RATAS ADULTAS”**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**PRESENTA:**

**Q.F.I. FUENTES AGUILAR ERIDANI YENELI**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA GARCÍA**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**DICIEMBRE 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios porque sin Él no lo hubiese logrado, gracias Padre por tu amor, tu guía, tu fidelidad, por estar siempre a mi lado y mostrarme el camino, sin ti esto no hubiese sido posible, gracias por usar esta etapa para llevarme a otro nivel de fe y por sostenerme durante todo este tiempo, por los momentos de angustia y por los momentos de felicidad, por las personas que pusiste en mi camino porque a través de ellos me mostraste tu mano, gracias, te amo Dios.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A mi mamá, por tu amor incondicional, por todo tu apoyo, tu soporte, por escucharme y por todos tus consejos y lecciones gracias por darme la oportunidad de culminar con esta meta y por caminarla a mi lado. Eres mi más grande tesoro.

A mi hermana por todos tus consejos y regaños que siempre me impulsaron y ayudaron a ver las cosas desde otra perspectiva y poder disfrutar cada día.

De manera muy importante y particular quiero agradecer a mi asesora la Dra. María del Carmen García García por todo su apoyo y soporte incluso antes de comenzar este proyecto, gracias Dra. por escucharme cuando lo necesité, por sus consejos, por brindarme su confianza, abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar a su lado, por ser ese refugio que me impulso a seguir adelante, su ayuda ha sido invaluable para mí y me la llevo en mi corazón, gracias por todo.

Al Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez por el apoyo y dedicación brindada para la elaboración de esta tesis, muchas gracias por su ayuda y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Alma Romero Díaz por impulsarme a tomar la decisión de estudiar una maestría, sabías que esto me llevaría a dar un paso importante en mi recuperación, gracias por estar siempre que te necesité, gracias por escucharme y por cada abrazo que le daban aliento a mi alma.

Gracias a Tere por todo su apoyo en la realización de los experimentos, gracias por enseñarme y siempre tener una buena actitud que hacía que los días fuesen más divertidos, gracias por cada tiempo compartido.

Gracias a mis compañeros de laboratorio 38, Raúl, Gayathri, Joice, Ivonne, Eshwar, Mikel, por todos los buenos momentos, por su apoyo y por las risas compartidas!

Gracias a todas las personas que estuvieron en mi camino durante este tiempo, Tecilli, Dra. Lety, Dra. Emma, Estefy, Dra. Queta, Dr. Pablo, Ludmyla, hermana Ludmyla, hermana Alba, hermano Shi Long, hermano Diego, Abraham, por todo su apoyo, su ayuda, su soporte, gracias por haber sido y ser una bendición para mi vida, hicieron que esta etapa fuese aún más especial y que cada momento difícil valiera más la pena.

Gracias a los doctores del departamento por todas sus enseñanzas.

Gracias por esta etapa que culmina, hoy puedo decir que ha sido de las mejores de mi vida.

# ÍNDICE

RESUMEN  
SUMMARY

Página

1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Dinámica del calcio en el cardiomiocito .....	3
1.2 Canales de calcio .....	5
1.2.1 Canales de calcio tipo L (LTCC).....	5
1.2.2 Receptores de Rianodina (RyRs).....	5
1.2.3 Receptores de IP3 (IP3Rs).....	6
1.2.4 Entrada de calcio operada por almacenamiento (SOCE).....	6
1.3 El balance de calcio y circuitos de retroalimentación negativa.....	7
1.3.1 Inactivación dependiente de $Ca^{2+}$ de los LTCCs.....	8
1.3.2 ATPasas o bombas de calcio.....	8
1.3.3 Bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA).....	8
1.3.4 Bomba de calcio del Retículo Sarco(Endo)plásmico (SERCA) .....	9
1.3.5 Intercambiadores de calcio.....	9
1.3.5.1 Intercambiador $Na^+/Ca^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX).....	9
1.4 La mitocondria como microdominio de calcio.....	10
1.4.1 Estructura y composición de las mitocondrias.....	10
1.4.2 Homeostasis del calcio mitocondrial.....	10
1.4.3 Papel del calcio en la mitocondria.....	11
1.4.4 Transporte de calcio en la mitocondria.....	12
1.4.5 Uniportador de calcio mitocondrial (MCU).....	13
1.4.6 Intercambiador $Na^+/Ca^{2+}$ mitocondrial (mNCX).....	13
1.4.7 Canal de potasio mitocondrial sensible a ATP (mKATP).....	13
1.5 Mitocondria y producción de especies de oxígeno reactivas (ROS).....	14
1.6 Acoplamiento Excitación-Constracción cardiaco (ECC).....	15
1.6.1 Fases durante el acoplamiento ECC.....	16
1.7 El calcio y enfermedades cardiacas.....	17
2.0 ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	18
3.0 JUSTIFICACIÓN.....	21
4.0 HIPÓTESIS.....	21
5.0 OBJETIVO GENERAL.....	22

6.0 OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Disociación de miocitos ventriculares.....	22
7.2 Protocolos de evaluación del efecto del diazóxido en cardiomiocitos disociados.....	23
7.2.1 Análisis de SOCE.....	24
7.3 Medición del calcio intracelular por métodos ópticos.....	25
8.0 RESULTADOS.....	27
8.1 Niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia y/o ausencia de diazóxido.....	27
8.2 Niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia y/o ausencia de diazóxido.....	28
8.3 Efecto del diazóxido en el contenido de calcio del retículo sarcoplásmico y la tasa de eliminación del calcio citosólico por NCX.....	28
8.4 Efecto del diazóxido en el sistema SOCE.....	30
8.5 Papel de los ROS en el efecto del diazóxido sobre el nivel de calcio basal.....	33
8.6 Papel de la apertura de los canales $mK_{ATP}$ en el efecto del diazóxido sobre el nivel de calcio basal.....	33
9.0 DISCUSIÓN.....	35
9.1 Niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia de diazóxido.....	35
9.2 Influencia del diazóxido en el contenido de calcio del RS.....	35
9.3 Efecto del diazóxido en la activación del sistema SOCE.....	36
9.4 Mecanismos que regulan el efecto del diazóxido sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales.....	40
10.0 CONCLUSIONES.....	42
11.0 BIBLIOGRAFÍA.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático de la organización del sarcómero de una miofibrilla.....	9
<b>Figura 2.</b> Microdominios de calcio en el cardiomiocito.....	11
<b>Figura 3.</b> Localización de las proteínas Orai1, STIM1 y SERCA en las uniones de la membrana plasmática y el Retículo Sarcoplásmico.....	14
<b>Figura 4.</b> Estructuras involucradas en la homeostasis celular de calcio.....	16
<b>Figura 5.</b> Captación mitocondrial de calcio. Representación esquemática de los canales y transportadores implicados en la regulación de calcio mitocondrial.....	19
<b>Figura 6.</b> Protocolos utilizados para la incubación de cardiomiocitos disociados para el análisis del nivel basal de $Ca^{2+}$ .....	31
<b>Figura 7.</b> Metodología experimental para el análisis del sistema SOCE.....	32
<b>Figura 8.</b> Transientes de calcio representativos obtenidos por estimulación eléctrica (0.2 Hz). Efecto del diazóxido en los niveles de calcio citoplasmáticos basales con respecto al tiempo.....	34
<b>Figura 9.</b> Niveles basales de calcio citoplasmático en presencia y ausencia de diazóxido.....	35
<b>Figura 10.</b> Efecto del diazóxido sobre las señales de $Ca^{2+}$ inducidos con cafeína en cardiomiocitos disociados. Registro representativo de las señales de calcio inducidos por la aplicación de 20 mM de cafeína en control y en células tratadas con diazóxido. Amplitud máxima de la señal de calcio inducida con cafeína. Respuesta de calcio integrada.....	36
<b>Figura 11.</b> Efecto del diazóxido sobre las señales de $Ca^{2+}$ inducidas con cafeína en cardiomiocitos disociados. Constante de tiempo de decaimiento de las señales de calcio inducidas con cafeína y curva representativa del ajuste exponencial a la fase de caída de la señal de calcio producida con cafeína.....	37
<b>Figura 12.</b> Señales representativas de la entrada de calcio por el sistema SOCE después de la depleción inducida con cafeína (Caff) y tapsigargina (Thap) del retículo sarcoplásmico.....	38
<b>Figura 13.</b> Efecto del diazóxido en la velocidad de cambio de fluorescencia (cociente 340/380) al activar la entrada de calcio después del vaciamiento del RS con tapsigargina y cafeína.....	39
<b>Figura 14.</b> Efecto del diazóxido en el incremento de la fluorescencia producida al activar los SOCs....	40
<b>Figura 15.</b> Efecto del NAC sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales en cardiomiocitos tratados con Dzx.....	40
<b>Figura 16.</b> Efecto del bloqueador específico de los canales $mKATP$ , el 5-HD sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales en cardiomiocitos tratados con Dzx.....	41

## RESUMEN

A lo largo de la evolución, el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dentro de las células se ha convertido en un importante mensajero que realiza gran cantidad de funciones fisiológicas fundamentales como son el acople excitación-contracción en las fibras musculares, la comunicación entre las células, la regulación de genes, la secreción, el crecimiento e inclusive la muerte celular.

El mantenimiento de la homeostasis del calcio es esencial para la vida, es por ello que un número de canales y transportadores de la membrana celular e intracelulares están involucrados en este proceso, un inadecuado manejo del calcio en la célula cardiaca puede desembocar en la generación de diversas patologías.

Un ejemplo de los agentes capaces de regular el manejo del calcio celular es el diazóxido, fármaco cuya efectividad como preconditionante farmacológico en casos de isquemia-reperfusión, ya ha sido descrito (González et al., 2010), debido a lo cual se evaluó su actividad sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales en cardiomiocitos de rata adulta.

Se utilizaron preparaciones de cardiomiocitos disociados enzimáticamente de ratas Wistar que fueron preincubados con diazóxido ( $100 \mu\text{M}$ ). En los cardiomiocitos disociados se midió, con indicadores fluorescentes, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, utilizando Fura2-AM. Se investigó el papel del retículo sarcoplásmico (RS) en el manejo del calcio citoplasmático basal en presencia del diazóxido para lo cual este almacén se vació utilizando una solución de cafeína  $20 \text{ mM}$ . También se determinó el papel del sistema de entrada de calcio operada por almacenamiento (SOCE) utilizando cafeína ( $10 \text{ mM}$ ) y tapsigargina ( $2 \mu\text{M}$ ) para depletar el RS y NMDG para bloquear al intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  en soluciones sin calcio para finalmente adicionar una solución con calcio ( $1.8 \text{ mM}$ ) y observar su entrada al citoplasma por medio de SOCE.

Se estudió la posible participación de ROS con N-acetil-L-cisteína (NAC) y del canal mitocondrial de potasio sensible a ATP ( $\text{mK}_{\text{ATP}}$ ) con el 5- ácido hidroxidecanoico (5-HD)

El diazóxido generó una rápida disminución en los niveles de calcio citoplasmáticos basales de un  $10.7 \pm 0.62\%$  que se mantuvo después de  $90 \text{ min}$  de incubación. El RS no intervino en el mecanismo de regulación del calcio citoplasmático en presencia del diazóxido a diferencia del sistema SOCE cuya entrada de calcio se observó disminuida en las células tratadas con diazóxido en un  $48.94 \pm 7.4\%$ . Estos efectos aparentemente no dependieron de la producción de ROS ni de la apertura del canal  $\text{mK}_{\text{ATP}}$ .

Todos estos resultados son novedosos en células excitables.

## SUMMARY

Throughout evolution, calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) within cells has become an important messenger that performs a large number of fundamental physiological functions such as excitation-contraction coupling in muscle fibers, communication between cells, gene regulation, secretion, growth and even cell death.

The maintenance of calcium homeostasis is essential for life, that is why a number of channels and cell membrane transporters and intracellular are involved in this process, an inadequate calcium management in the cardiac cell can lead to the generation of various pathologies.

An example of the agents capable of regulating cellular calcium management is diazoxide, a drug whose effectiveness as a pharmacological preconditioner in cases of ischemia-reperfusion, has already been described (González et al., 2010), due to which its activity on basal cytoplasmic calcium levels in adult rat cardiomyocytes was evaluated.

Preparations of enzymatically dissociated cardiomyocytes from Wistar rats that were preincubated with diazoxide (100  $\mu\text{M}$ ) were used. In the dissociated cardiomyocytes, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was measured with a fluorescent indicator, Fura2-AM. The role of sarcoplasmic reticulum (SR) in the management of basal cytoplasmic calcium in the presence of diazoxide was investigated emptying the SR with a 20 mM caffeine solution. The role of the storage-operated calcium entry system (SOCE) was also determined using caffeine (10 mM) and thapsigargin (2  $\mu\text{M}$ ) to deplete the SR and NMDG to block the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in calcium-free solutions to finally restoring calcium (1.8 mM) and measuring its entrance to the cytoplasm by means of SOCE.

The possible participation of ROS was studied using N-acetyl-L-cysteine (NAC), a ROS scavenger, and 5-hydrodecanoic acid (5-HD), a mKATP channel blocker, to analyze the channel participation.

Diazoxide produced a rapid decrease in basal cytoplasmic calcium levels in  $10.7 \pm 0.62\%$  that persisted after 90 min. The SR did not participate in the regulation of cytoplasmic calcium in the presence of diazoxide, unlike the SOCE system, whose calcium intake was decreased in the cells treated with diazoxide in  $48.94 \pm 7.4\%$ . These effects did not depend on ROS production, nor the opening of mKATP channel, apparently.

All these findings in excitable cells are original in the area.

## 1.0 INTRODUCCIÓN.

El corazón (del latín *cor*) es el órgano principal del aparato circulatorio. En los animales vertebrados, incluyendo el hombre, es un músculo hueco que funciona como una bomba aspirante e impelente que impulsa la sangre a través de las arterias para distribuirla por todo el cuerpo. El corazón humano tiene el tamaño de un puño y un peso de 300 gramos que equivale al 0.40% del peso corporal, está situado en el centro de la cavidad torácica flanqueado a ambos lados por los pulmones (Goodman y Gilman, 2011).

La función primordial de este órgano es el bombeo eficiente de sangre gracias a los ciclos de contracción-relajación, que de forma coordinada, ejecutan las células del músculo cardiaco denominados cardiomiocitos (Goodman y Gilman, 2011).

La mayoría de los cardiomiocitos de rata tienen un par de núcleos ovales y se caracterizan por la presencia de uniones terminales altamente especializadas, que se denominan discos intercalares. Los discos intercalares tienen porciones transversales, en las que abundan desmosomas, y uniones comunicantes o "gap junctions". Estas últimas permiten el acople eléctrico así como el paso de pequeñas moléculas (<1 kDa) y iones.

La membrana de los miocitos se denomina sarcolema y al citoplasma se le llama sarcoplasma. El sarcolema presenta invaginaciones hacia el sarcoplasma, que reciben el nombre de túbulos T o túbulos transversos. Los miocitos contienen los organelos típicos, destacándose la presencia de un sistema de retículo endoplasmático liso muy desarrollado que recibe el nombre de retículo sarcoplasmático (RS), en su interior se acumula gran cantidad de calcio (Goodman y Gilman, 2011).

Una de las principales características de estas células es la presencia de bandas, algunas oscuras y otras claras, que se repiten continuamente a lo largo de la miofibrilla y cuya unidad funcional se conoce con el nombre de sarcómero.

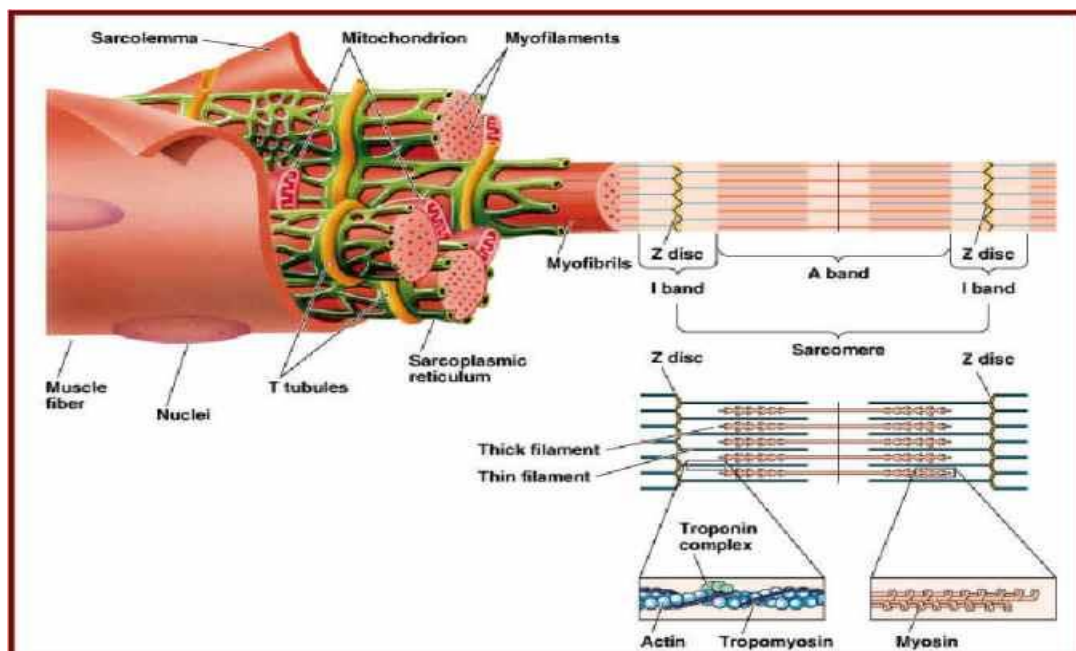
Un sarcómero está compuesto por diferentes tipos de filamentos (Figura 1):

1. Filamentos gruesos: compuestos por miosina. La miosina es una proteína formada por 6 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas ligeras esenciales, 2 cadenas ligeras reguladoras y 2 cadenas



pesadas, cuyos dominios amino-terminales forman una estructura globular, llamada cabeza de la miosina donde se unen las 4 cadenas ligeras.

2. Filamentos delgados: compuestos por 3 tipos de proteínas: la actina, que forma una doble hélice a partir de la actina G; la tropomiosina que también tiene forma de hebra y se asocia a cada uno de los monómeros de la actina y la troponina, que está constituida por tres subunidades distintas: la troponina T (TnT) que se une a la molécula de tropomiosina; la troponina I (TnI) que está unida a la actina, en una posición que bloquea los centros de unión que existen en la actina para la miosina y la troponina C (TnC), la cual tiene dos dominios: uno de ellos, sería el correspondiente a la terminal amino y el otro a la terminal carboxilo. En cada uno de los dominios existen dos centros de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 1.** Diagrama esquemático de la organización del sarcómero de una miofibrilla (Marieb, 2003)

A lo largo de la evolución, el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dentro de las células se ha convertido en un importante mensajero que realiza gran cantidad de funciones fisiológicas fundamentales como son el acople excitación-contracción en las fibras musculares, la comunicación entre las células, la regulación de genes, la secreción, el crecimiento e inclusive la muerte celular.

Evolutivamente, el papel primordial del calcio se ha desarrollado gracias a la aparición de una serie de proteínas en el interior de la célula, muchas de ellas con actividad enzimática, que son sensibles a los cambios en la concentración intracelular de este ión. Sin embargo, además de la aparición de esas

proteínas, también ha sido necesario el desarrollo de canales iónicos en las membranas celulares que permitan el ingreso del  $\text{Ca}^{2+}$  de acuerdo con su gradiente electroquímico, así como la presencia de almacenes que favorecen, ante determinadas circunstancias, su liberación y con ello el aumento de su concentración citosólica. Este incremento permite que el calcio interaccione con las proteínas encargadas de llevar a cabo diferentes funciones fisiológicas celulares (Kockskamper, y col., 2001).

En el caso específico del corazón, es importante comprender en detalle cuantitativo cómo es que el calcio se mueve alrededor de los diversos organelos de los cardiomiocitos con el fin de que pueda llevarse a cabo el acoplamiento excitación-contracción.

### **1.1 DINÁMICA DEL CALCIO EN EL CARDIOMIOCITO.**

Los cardiomiocitos contienen compartimentos subcelulares, o microdominios, donde los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  están regulados distintamente de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de cada compartimento se deciden así por la  $[\text{Ca}^{2+}]$  locales y las proteínas que responden a  $\text{Ca}^{2+}$  que están presentes en el compartimento. Los microdominios son importantes para localizar a los actores moleculares que orquestan la función cardíaca y en los cuáles el calcio juega un papel crucial (Aronsen y col., 2015).

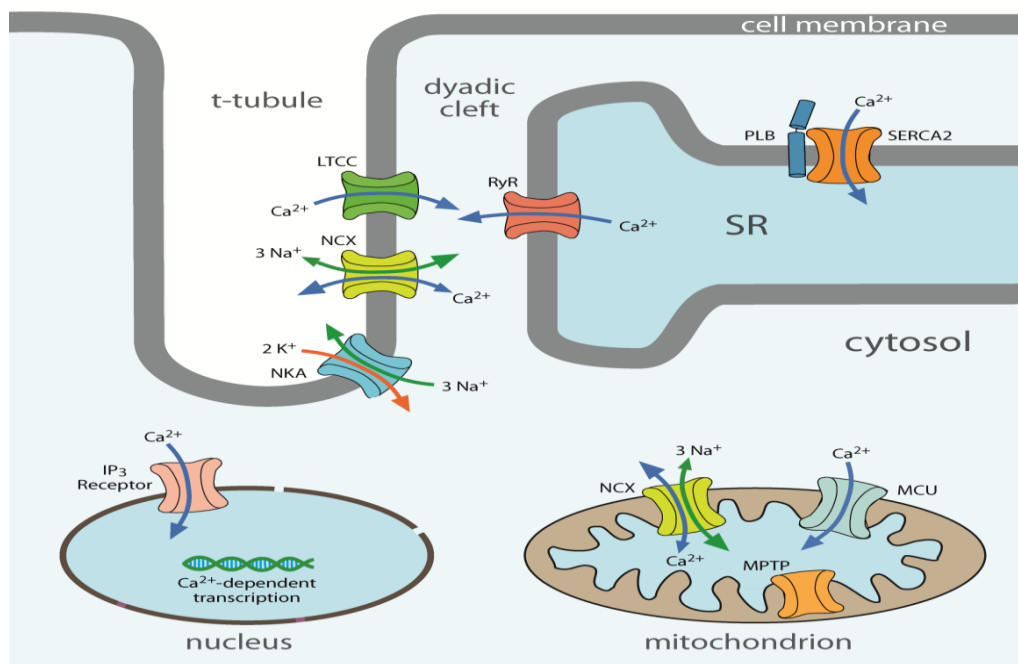
A partir de la comprensión de la distribución del calcio en la célula es posible definir que las diferentes proteínas encargadas de la dinámica del calcio intracelular controlan la función cardíaca determinando el equilibrio entre el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y el flujo de salida en cada compartimento.

Existen tres principales microdominios del  $\text{Ca}^{2+}$  que se sabe regulan la función del cardiomiocito (figura 2) (Aronsen y col., 2015):

- ❖ **Retículo sarcoplásmico:** el retículo sarcoplásmico (RS) es un almacén intracelular para calcio y principal fuente de este ión dentro de la célula. Una coordinada liberación de calcio a través del receptor de rianodina en la membrana del RS da lugar a la contracción del cardiomiocito al unirse el calcio a los miofilamentos. La ATPasa de calcio del RS (SERCA2) recicla el calcio liberado regresándolo a éste lo cual ayuda a mantener bajos niveles citosólicos de concentración de calcio en reposo (aproximadamente 100 nM) y alto contenido de calcio en el RS (aproximadamente 1 mM); por lo tanto existe un alto gradiente del retículo sarcoplásmico al citosol, lo cual es esencial para permitir una rápida liberación.
- ❖ **Hendidura diádica (diadas):** la liberación de calcio de los receptores de rianodina (RyR) ocurre en las uniones entre el sarcolema y las membranas del RS. Esas uniones físicas son llamadas

diadas, y ellas se encuentran en la superficie celular y en las invaginaciones de la membrana llamadas tubulos T. El microdominio diadídico sirve para regular la contractilidad cardiaca y señalización. Los niveles de calcio en la diada son además controlados por el influjo de calcio vía los canales de calcio tipo L (LTCCs) en los túbulos t y la remoción de calcio por el intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  (NCX) cercano.

- ❖ Mitocondria: la concentración de calcio en la mitocondria regula críticamente el metabolismo cardiaco. El calcio es primariamente tomado en las mitocondrias por el transportador de calcio mitocondrial (uniporter MCU) y es removido por un especializado NCX localizado en la membrana mitocondrial. La mayoría de los datos indican que la captación y remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es relativamente menor en las células sanas. Sin embargo, en condiciones patológicas la sobrecarga mitocondrial con  $\text{Ca}^{2+}$  puede desencadenar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial e inducir la muerte celular (Aronsen y col., 2015):



**Figura 2:** Microdominios de calcio en el cardiomiocito. Retículo sarcoplásmico (SR), unitransportador de calcio mitocondrial (MCU), poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) (Aronsen y col., 2015).

En reposo, la  $[Ca^{2+}]$  extracelular es del orden de 1-2 mM, mientras que en el interior de las células, la concentración se mantiene alrededor de 100 nM. Esta diferencia de concentración sumada a la diferencia de potencial de la membrana plasmática, impulsa la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular a favor de gradiente electroquímico, esto aunado a la liberación desde los depósitos intracelulares, como respuesta a un estímulo provoca un aumento rápido de la concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ), desencadenando una respuesta celular en un periodo breve de tiempo. Durante este proceso existe la intervención de la función de los diferentes microdominios, gran parte de este  $Ca^{2+}$  se une rápidamente a sistemas de tamponamiento citosólicos, o entra en la mitocondria; y el resto del  $Ca^{2+}$ , sale del citoplasma al medio extracelular o entra de nuevo al retículo sarcoplásmico (RS, para restablecer la situación de reposo, con el fin de que la célula sea capaz de responder adecuadamente ante nuevos estímulos, sin exceder los límites espaciales y temporales que pueden causar la muerte celular, para que dicho fin se realice la entrada y/o salida de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana plasmática se lleva a cabo por diferentes canales cuyos nombres indican sus propiedades de activación y desactivación: canales de calcio operados por voltaje (VOC) que se activan en respuesta a una despolarización de la células actuando como transductores de las señales eléctricas (Catterall, 2011); canales de calcio operados por depósitos intracelulares (SOC) que se activan en respuesta a una disminución del nivel de  $Ca^{2+}$  de los depósitos (Wu y col., 2006; Cahalan y col., 2009) y las bombas ATPasas de calcio que actúan en contra de un gradiente de concentración.

## **1.2 CANALES DE CALCIO.**

### **1.2.1 Canales de calcio tipo L (LTCC).**

El canal de  $Ca^{2+}$  tipo L es un canal dependiente de voltaje y es activado por la despolarización de la membrana. Está formado por un complejo de proteínas multiméricas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\alpha 2-\delta$ . La subunidad  $\alpha 1c$  es la subunidad principal del canal de calcio tipo L del corazón, ya que forma el poro del canal, contiene al sensor de voltaje y posee la mayoría de las regiones reguladas por vías dependientes de segundos mensajeros, toxinas y fármacos. El flujo de  $Ca^{2+}$  al interior del cardiomiocito por este canal es muy importante para la excitabilidad cardiaca y en el acople excitación-contracción, además este flujo de  $Ca^{2+}$  puede tener efectos moduladores muy importantes en otros procesos celulares como la excitación, transcripción de genes y el acople excitación-secreción (Catterall, 2000).

### **1.2.2 Receptores de Rianodina (RyRs).**

Los RyRs son los canales iónicos más grandes conocidos formados por homotetrámeros que existen como tres isoformas en mamíferos (RyR 1-3). Estas proteínas están reguladas por fosforilación y una

variedad de pequeñas proteínas y iones. El  $\text{Ca}^{2+}$  (citósólico y luminal) es un ligando fisiológico que desencadena la apertura de los RyRs, al igual que lo hacen la cafeína, el ATP o la heparina. En el músculo cardíaco, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, da lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular que activa los RyR2 iniciando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Lanner y col., 2010). La estimulación de estos receptores para la liberación de calcio del RS al citosol se basa en el reconocimiento de los iones de calcio en el lado citósólico de la membrana del RS a través de un sistema de retroalimentación positiva, es decir que, la concentración de iones de calcio cerca de los receptores de rianodina hace que se libere más calcio del RS por estos receptores por medio de un proceso que se conoce como *liberación de calcio inducida por calcio* o CICR por sus siglas en inglés. Después se produce una retroalimentación negativa donde la alta concentración de calcio inactiva a los RyR y así la liberación de calcio del RS (Fig. 4).

Existen una serie de moléculas y iones, como el  $\text{Mg}^{2+}$ , el rojo de rutenio o la ryanodina que actúan como inhibidores de estos canales (Meissner, 1986).

### **1.2.3 Receptores de IP3 (IP3Rs).**

Los IP3Rs constituyen una familia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  localizados predominantemente en el RE de todos los tipos de células, donde permiten la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los depósitos en respuesta a diversos estímulos que activan la fosfolipasa C (PLC); normalmente a través de receptores acoplados a proteínas G o tirosina quinasas. La PLC hidroliza lípidos de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en la membrana plasmática, generando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) (Berridge, 1993). Este segundo mensajero procedente de la cascada de señalización de receptores acoplados a proteínas G (*GPCRs*) difunde en el citoplasma y se une a su receptor IP3R modulando la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (Fig. 4). El IP3R no solo está regulado por IP3, también por otros ligandos, como el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma; así, el IP3R se induce por IP3 pero requiere  $\text{Ca}^{2+}$  como coagonista (Kaftan y col., 1997). Además, el IP3R integra señales de numerosas moléculas y proteínas incluyendo nucleótidos, quinasas, y fosfatasas, así como proteínas no enzimáticas (Patterson y col., 2004).

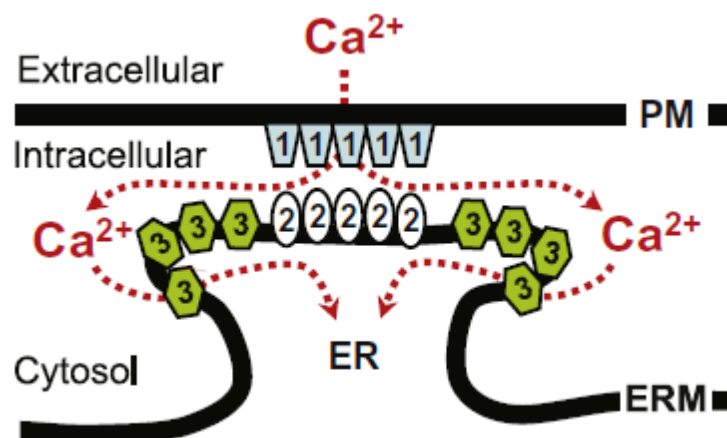
### **1.2.4 Entrada de calcio operada por el almacenamiento (SOCE).**

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo intracelular, cuya función es crítica para la sobrevivencia de la célula, éste es considerado como el principal compartimento de almacenamiento de calcio intracelular.

Para que el RE cumpla con todas sus funciones requiere mantener una concentración de calcio de aproximadamente 100-800  $\mu\text{M}$  en reposo, una sostenida depleción de los almacenes de calcio es

perjudicial para la célula, y puede llevar a que haya un estrés celular, inhibición de la síntesis de proteínas y apoptosis (Groenendyk y Michalak 2005). Por lo tanto, como se ha mencionado previamente, las células emplean un número de mecanismos para prevenir una prolongada depleción de los almacenes, usando proteínas de unión a calcio en el RE para amortiguar los niveles de calcio así como la bomba ATPasa sarcoplásmica (SERCA) para que activamente se recargue el almacén. Crucialmente, una reducción de la concentración de calcio en el RE activará la entrada de calcio operada por el almacenamiento (SOCE, por sus siglas en inglés) lo cual ocurre en las uniones entre el RE y la membrana plasmática (MP).

Dicho mecanismo es llevado a cabo por medio de la interacción directa entre las proteínas STIM y Orai. STIM es el sensor de calcio localizado en la membrana del RE, mientras que Orai es un componente formador del poro del canal (Fig. 3). El contacto cercano entre el RE y la MP es esencial para la interacción de STIM y Orai y la activación de SOCE. Esta localización se dice que favorece que la entrada de calcio a través de los canales Orai sea captada rápidamente por la bomba SERCA y así se lleve a cabo un almacenamiento rápido y eficaz en el RS (Alonso y col, 2012) (Fig. 3).



**Figura 3.** Localización de las proteínas Orai1 (1), STIM1 (2) y SERCA (3) en las uniones de la membrana plasmática y el Retículo Sarcoplásmico (Alonso y col., 2012).

### 1.3 EL BALANCE DE CALCIO Y CIRCUITOS DE RETROALIMENTACIÓN NEGATIVA.

Como se mencionó previamente, existen diversos mecanismos y estructuras celulares que permiten que exista una regulación del nivel basal del calcio citoplasmático de tal forma que sea posible mantener la funcionalidad del cardiomiocito. En este proceso participan las ATPasas de Ca<sup>2+</sup> que bombean Ca<sup>2+</sup> en contra de gradiente de concentración fuera de la célula o al interior de los depósitos y los

intercambiadores que contribuyen con las anteriores a mantener el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brini y Carafoli, 2011). Dentro de los mecanismos de retroalimentación negativa se encuentran:

### **1.3.1 Inactivación dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ de los LTCCs.**

Como los LTCCs y RyRs se co-localizan en la hendidura diádica, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de RyRs durante CICR aumenta rápidamente el  $\text{Ca}^{2+}$  local cerca de los LTCCs, desencadenando su inactivación. Esta respuesta se gradúa por la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del RS, creando un circuito de retroalimentación negativa localizada en el que una gran liberación de calcio en el citosol restringe más la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la LTCCs.

### **1.3.2 ATPasas o bombas de calcio**

El control de la concentración del calcio depende de la relación entre el calcio extracelular, el calcio citosólico y el calcio del interior de los orgánulos intracelulares. El medio extracelular contiene una concentración de calcio de alrededor de 1.8 mM. Algunos orgánulos celulares (retículo sarcoplásmico/endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, etc.) funcionan como reservorios de calcio y pueden contener altas concentraciones de este ión, en una concentración del rango milimolar. En el citosol de un cardiomiocito en reposo se encuentra solamente un 10% del calcio intracelular libre (50 nM de calcio libre en el citosol, sobre 500  $\mu\text{M}$  de calcio en los orgánulos), aunque la concentración de calcio incrementa a niveles de  $\mu\text{M}$  tras una estimulación que libere el calcio de los orgánulos intracelulares a través de los canales de calcio de estos orgánulos.

La energía para sacar  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, tiene su origen en la hidrólisis de ATP, ya que la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y la ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) son bombas del transporte activo primario que necesitan estar fosforiladas para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de gradiente de concentración (Fig. 4). Estas bombas tienen baja capacidad de transporte, pero sus afinidades por  $\text{Ca}^{2+}$  son altas, por lo que bombean bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  para completar el proceso de recuperación de los niveles de reposo.

### **1.3.3 Bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA)**

La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA) contribuye al mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transportando  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al espacio extracelular. La bomba opera con una estequiometría 1:1; transporta 1  $\text{Ca}^{2+}$  por ATP hidrolizado.

### 1.3.4 Bomba de calcio del Retículo Sarco(Endo)plásmico (SERCA)

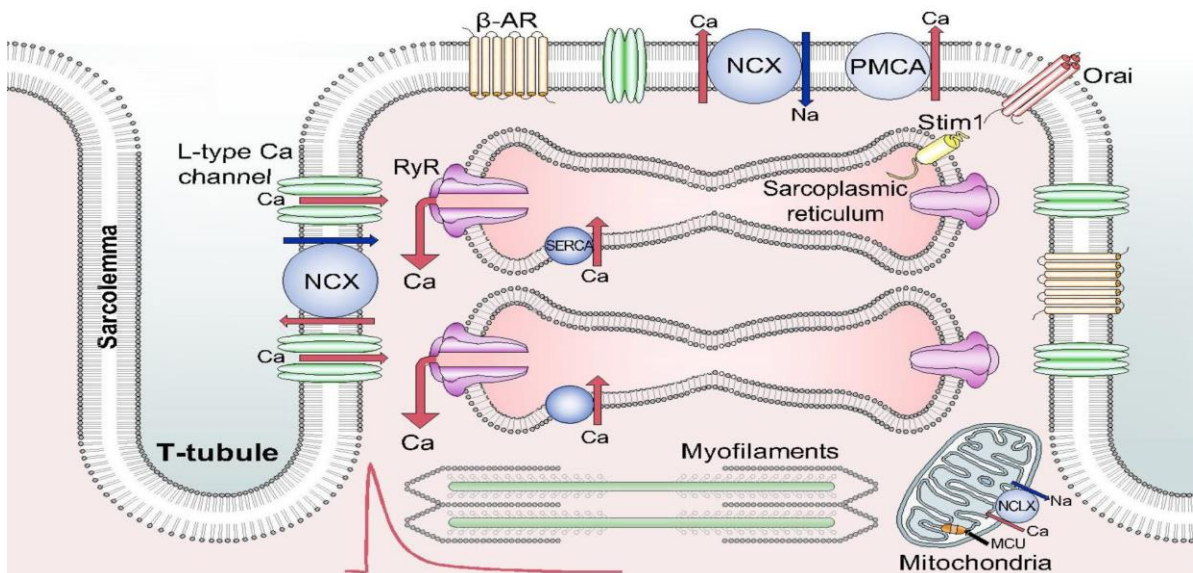
La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al interior del RE se realiza gracias a una bomba de calcio dependiente de ATP. Se localiza en la membrana del RS y bombea  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al interior de los depósitos. Esta bomba es más eficaz que la PMCA, ya que por cada ATP hidrolizado transporta dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  al RE.

### 1.3.5 Intercambiadores de calcio

Estas proteínas aprovechan la energía del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  (generado por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana plasmática) para sacar  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al medio extracelular (Fig. 4). Los intercambiadores tienen afinidades bajas por  $\text{Ca}^{2+}$ , pero capacidades de transporte muy altas, lo que les permite eliminar rápidamente grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol.

#### 1.3.5.1 Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX)

La función principal de los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (NCX) es controlar los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (Lyttton, 2007). En cada ciclo del intercambiador, tres iones  $\text{Na}^+$  entran a la célula y un ión  $\text{Ca}^{2+}$  sale en contra de su gradiente, siendo por tanto, un transporte electrogénico (Fig. 4).



**Figura. 4. Estructuras involucradas en la homeostasis celular de calcio.** Representación esquemática de los canales de calcio de la membrana plasmática (VOC, ROC, SOC) y de las endomembranas (el receptor a la rianodina (RyR)) (Eisner y col., 2017).



## **1.4 LA MITOCONDRIA COMO MICRODOMINIO DE CALCIO.**

### **1.4.1 Estructura y composición de las mitocondrias**

Las mitocondrias son orgánulos móviles y plásticos, que cambian constantemente de forma, fusionándose unos con otros y formando una red mitocondrial que se encuentra asociada permanentemente a la membrana del RE mediante conexiones físicas, en las que participan proteínas como IP3R, canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), uniportador de calcio mitocondrial (MCU) o RyR (Rizzuto y col., 1998; Csordás y col., 2010). Las mitocondrias, están limitadas por dos membranas altamente especializadas, que definen dos compartimentos diferentes, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa (MME) permite el paso de pequeñas moléculas e iones (< 10 KDa) al espacio intermembrana debido a la abundancia de canales acuosos (porinas) o al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC). Sin embargo, la mayoría de estas moléculas no pueden atravesar la membrana mitocondrial interna (MMI), que es impermeable a los iones. La MMI presenta numerosas invaginaciones o crestas mitocondriales donde se localiza la cadena de transporte de electrones, cuya actividad genera un gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) que, además de conducir el flujo de  $\text{H}^+$  a través de la ATP sintasa, permite la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial (Rimessi y col., 2008; Rizzuto y col., 2012) (Fig. 5).

### **1.4.2 Homeostasis del calcio mitocondrial**

En los años 60, Lehninger propuso que las mitocondrias acumulaban grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma de precipitados de fosfato cálcico, lo que las convertía en uno de los orgánulos intracelular identificados como depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lehninger., 1963). Posteriormente se comprobó que las mitocondrias apenas tienen  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de reposo; sin embargo, durante la estimulación celular, las mitocondrias captan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol llegando a alcanzar niveles de hasta 1 mM en la matriz mitocondrial; cuando la estimulación cesa, liberan el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado para recuperar los niveles de reposo (De la Fuente y col., 2012).

Recientemente, las investigaciones en diversos tejidos, incluyendo el músculo cardíaco y esquelético, las células del hígado y las neuronas, han planteado la posibilidad de que las mitocondrias también sirvan como grandes y dinámicos tampones fisiológicos para  $\text{Ca}^{2+}$  (Thayer SA., 1990, Drago I., 2012). Sin embargo, este punto ha sido debatido (O'Rourke; 2009), y obliga a la pregunta: ¿Cuánto  $\text{Ca}^{2+}$  entra y sale de las mitocondrias en condiciones normales?

Los datos sugieren que bajo condiciones fisiológicas, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias por litro de citosol es pequeño (especialmente en relación con otros mecanismos de extrusión citosólica) y es poco probable que altere  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Por otro lado, la evidencia hasta ahora sugiere que, aunque pueden existir otras vías de afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, la MCU es la dominante. La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial no está sólo limitada a procesos que ocurren dentro del orgánulo. Las mitocondrias actúan como amortiguadores de microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenando grandes cantidades del mismo desde el citosol, y evitando la inactivación de los canales que se inhiben por  $\text{Ca}^{2+}$  en la boca interna del canal (Rizzuto y Pozzan, 2006; Patron y col., 2013).

Las abundantes mitocondrias intermiofibrilares (IFM) están en estrecha proximidad al retículo sarcoplásmico (SR), el organelo de almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  primario intracelular, que libera  $\text{Ca}^{2+}$  con cada latido del corazón. A pesar de que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de la célula a escala global aumenta de 100 nM a ~ 500 nM con cada latido del corazón, el microdominio de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  cerca de los extremos de las IFM puede aumentar transitoriamente de 10-20  $\mu\text{M}$  durante la fase de liberación. Esta alta  $[\text{Ca}^{2+}]$  se produce localmente debido a la proximidad de los extremos mitocondriales a las unidades de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (CRU).

El corazón puede ser el lugar ideal para estudiar la captación de MCU, dado que las mitocondrias cardíacas son abundantes y se exponen a elevaciones regulares y repetitivas del  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial debido al ciclo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **1.4.3 Papel del calcio en la mitocondria**

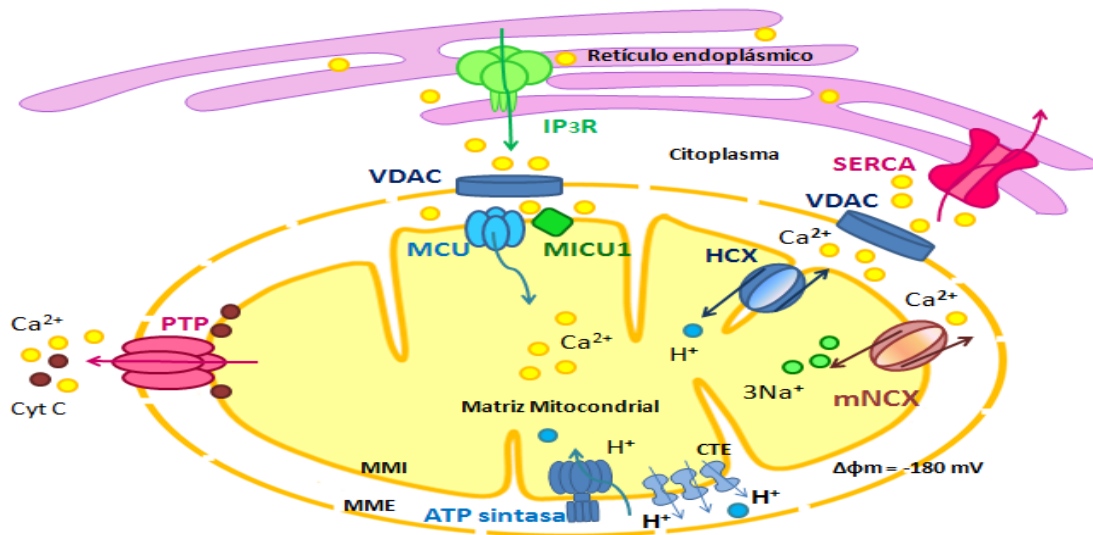
La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria regula funciones intrínsecas en el orgánulo, incluyendo la producción de ATP, por un proceso conocido como fosforilación oxidativa. En la matriz, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula la actividad de la ATP sintasa F1FO y tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs. La estimulación de estas últimas, aumenta la disponibilidad de NADH, y por tanto, el flujo de electrones en la cadena respiratoria, ajustando la síntesis de ATP a las necesidades celulares (McCormack y Denton, 1990; Hansford, 1994). Por otro lado, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  junto con la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) favorecen la liberación al citosol de factores mitocondriales, como el citocromo c o el factor inductor de apoptosis (AIF), que forman con las caspasas efectoras una maquinaria macromolecular (apoptosoma) que lleva a las células a la muerte celular apoptótica. La fragmentación e hinchamiento del orgánulo disparan la apertura de un canal mitocondrial de gran conductancia: el poro de transición de permeabilidad (PTP). Esto supone el colapso del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la muerte celular (Rizzuto y col., 2012; Patron y col., 2013).

#### 1.4.4 Transporte de calcio en la mitocondria

Bajo condiciones fisiológicas, la captación de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$  ocurre por un proceso electrogénico conducido por un potencial eléctrico (-150 a -180mV) a través de la MMI, generado por el bombeo de  $\text{H}^+$  de la cadena respiratoria y mediado por un canal iónico selectivo a  $\text{Ca}^{2+}$  llamado uniportador (Bernardi, 1999) (Fig. 5).

El corazón late repetitivamente generando elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este  $\text{Ca}^{2+}$  se retira del citosol a través de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (SERCA) del retículo sarcoplásmico y el intercambiador sarcolemal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCX), resultando en una reducción de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en 500 ms en toda la célula. Durante este tiempo, al encontrarse dentro de éste medio cambiante, las mitocondrias tienen la oportunidad de secuestrar  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol a través de MCU abiertas. (Williams y col., 2013).

Por otro lado, la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria se contrarresta por los intercambiadores mitocondriales  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mNCX) y  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mHCX) (Rimessi y col., 2008; Csordás y col., 2012) (Fig. 5).



**Figura. 5. Captación mitocondrial de calcio.** Representación esquemática de los canales y transportadores implicados en la regulación de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ . MME (Membrana mitocondrial externa), MMI (Membrana mitocondrial interna), Cyt c (Citocromo c), CTE (Cadena de transporte de electrones), IP3R (Receptor de IP3), RyR (Receptor de rianodina) (Arias del Val, 2013).

#### **1.4.5 Uniportador de calcio mitocondrial (MCU).**

En 2004, Kirichok y colaboradores demostraron mediante la técnica de *patch clamp* la existencia de un canal iónico altamente selectivo a  $\text{Ca}^{2+}$  que conduce una corriente rectificadora hacia el interior de la matriz mitocondrial, sensible a los inhibidores de la captación de calcio mitocondrial. Actualmente, se sabe que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria se realiza a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) localizado en la MMI.

#### **1.4.6 Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX)**

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (mNCX), fue identificado por el grupo de Sekler (Palty y col., 2010) mediante técnicas de imagen, demostrando que esta proteína se encuentra en la mitocondria (particularmente en células excitables) y que su sobreexpresión potencia el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{Na}^+$ , mientras que su silenciamiento bloquea la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **1.4.7 Canal de potasio mitocondrial sensible a ATP (mKATP).**

La membrana interna de las mitocondrias contiene los componentes esenciales de las proteínas de transporte de electrones, la F1F0-ATPasa y todos los portadores de intercambio que transfieren sustratos entre la matriz mitocondrial y el citosol. Estos orgánulos funcionan en un medio citosólico que contiene  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , que son transportados a través de la membrana interna. Las enzimas de fosforilación oxidativa deben estar en comunicación con el citosol, con el fin de recibir aquellas señales que indiquen que se requiere una mayor producción de ATP. Dichas señales así como diversos componentes necesarios para que haya una adecuada función mitocondrial deben pasar a través de la membrana interna mitocondrial. Los gradientes que impulsan la captación de las sales hacia la mitocondria son muy altos, y la membrana interna es altamente permeable al agua, estos factores aumentan considerablemente el peligro de excesiva inflamación y lisis osmótica, alterando la estructura vesicular esencial para la función mitocondrial. En base a ello y de manera particular, se han caracterizado algunas de las funciones desempeñadas por el ciclo mitocondrial de  $\text{K}^+$  en la fisiología celular, como son: (i) proporcionar homeostasis de volumen para prevenir un excesivo hinchamiento de la matriz; (ii) proporcionar regulación de volumen para evitar una contracción excesiva de la matriz, (iii) regular la producción de ROS mitocondrial involucrado en la señalización celular y (iv) desacoplar la cadena de transporte de electrones y por lo tanto acelerar la respiración llevando a la oxidación de los transportadores de electrones proximales lo que a su vez permite la extrusión de los iones  $\text{H}^+$  evitando

la depleción de fosfatos de alta energía creando un gradiente electroquímico más favorable para la síntesis de ATP.

El valor elevado del potencial de membrana requerido para la fosforilación oxidativa no sólo es una poderosa fuerza motriz para la captación de  $K^+$ , sino que también asegura que la difusión de  $K^+$  será altamente sensible a las fluctuaciones fisiológicas del mismo. Así, el flujo *in vivo* es esencial para mantener la integridad estructural y funcional necesaria para la fosforilación oxidativa.

Cuando las mitocondrias están sintetizando ATP a tasas muy altas, el potencial de membrana disminuye. El desequilibrio transitorio entre la afluencia y el eflujo hace que el volumen de la matriz se contraiga a un volumen de estado estacionario más bajo. Dado que la contracción de la matriz interfiere con las transferencias energéticas eficientes de las mitocondrias al citosol, se ha propuesto que las señales endógenas se encargan de abrir el mito-KATP de modo que el flujo de  $K^+$  y el volumen de la matriz se mantengan frente a una fuerza motriz inferior.

Como se mencionó, otro papel que juega el mitoKATP en la fisiología celular es que cuando éste se abre en el estado de reposo de alto potencial de membrana, el flujo de  $K^+$  resultante induce un aumento moderado en la producción mitocondrial de ROS. A su vez, los niveles incrementados de ROS activan una variedad de quinasas implicadas en las vías de señalización de la cardioprotección contra la lesión por isquemia-reperfusión y en las vías que conducen a la transcripción de genes y al crecimiento celular (Garlid y col., 2003).

## **1.5 MITOCONDRIA Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS (ROS)**

Las mitocondrias están especializadas en la conversión de energía oxidativa a energía química, mediante el sistema enzimático que configuran la cadena respiratoria y la ATPsintasa.

Este sistema consta de cinco complejos multiproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna y organizados según su potencial redox. Durante la respiración, los electrones cedidos a la cadena respiratoria por moléculas reductoras producidas durante el metabolismo oxidativo ( $NADH$  y  $FADH_2$ ) se transfieren de un complejo a otro adyacente, con potencial redox superior:

- ❖ Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH-deshidrogenasa
- ❖ Complejo II o Succinato-deshidrogenasa
- ❖ Complejo III o Ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa
- ❖ Complejo IV o Citocromo Oxidasa

La transferencia de electrones va acompañada de liberación de energía, esta energía es utilizada por tres de los diferentes complejos para expulsar protones de la matriz al espacio intermembranal y el proceso finaliza con la reducción de oxígeno a agua. Debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, se crea una diferencia de potencial electroquímico de protones o fuerza protomotriz que es utilizada por la ATP sintasa (Complejo V) en un proceso denominado fosforilación oxidativa (Cámara Navarro, 2005) por medio de la cual, dicho complejo acopla la difusión facilitada de los  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna para la síntesis de ATP. Este fenómeno denominado acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la oxidación de substratos, asegura la coordinación entre las necesidades de ATP celular con la formación y consumo de dichos substratos.

Bajo condiciones fisiológicas la mitocondria puede ser capaz de generar moléculas citotóxicas potencialmente inestables llamadas radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales comprenden todas las moléculas derivadas del oxígeno. Aquellas ROS que pueden existir de forma independiente y que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales son además llamados radicales libres (Bergamini y col., 2004).

Existen diversos tipos de ROS, los más estudiados son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el óxido nítrico (NO), el radical peroxilo ( $ROO^\cdot$ ) y moléculas aldehído reactivas (ROCH), éstas moléculas alcanzan un estado de energía estable al atacar a otras moléculas celulares con el fin de aparear sus electrones desapareados a través de reacciones de oxidación (Padurariu, y col., 2013).

Históricamente, se ha considerado a los ROS como subproductos tóxicos del metabolismo y han sido relacionados con numerosos procesos patológicos y con elevada capacidad para dañar proteínas, DNA y lípidos celulares. Hoy en día diversos estudios demuestran que los ROS, además de su función oxidante, también podrían tener un papel como segundos mensajeros implicados en la activación de cinasas, regulación génica y cascadas de transducción de señal con finalidades fisiológicas (Allen and Tresini, 2000).

## **1.6 ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO.**

Uno de los mecanismos cruciales para el adecuado funcionamiento del sistema cardiovascular y que mejor ejemplifican el correcto manejo de los niveles de calcio en el cardiomiocito es el acoplamiento excitación-contracción-relajación (ECR).

El acoplamiento excitación-contracción-relajación (ECR) es la base fisiológica para que se lleve a cabo el latido cardiaco. El segundo mensajero  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial en la actividad eléctrica cardiaca y es el activador directo de los miofilamentos, que causan la contracción. El acoplamiento ECR emplea este ion para unir el potencial de acción a la activación mecánica de los cardiomiocitos y a su vez la contracción coordinada de los cardiomiocitos en la arteria y ventrículos resulta en la eyección de la sangre de esas cámaras.

### 1.6.1 Fases durante el acoplamiento EC

- **Excitación:** la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje inicia el potencial de acción en los cardiomiocitos, lo cual rápidamente despolariza la membrana celular de su potencial de membrana en reposo. Los LTCCs son abiertos como resultado de la despolarización de la membrana, lo cual permite la entrada de calcio del espacio extracelular al citoplasma, la cual forma parte también del potencial de acción. La entrada de calcio persiste hasta que los LTCCs se cierran, lo cual ocurre principalmente en una manera de retroalimentación negativa debido a la resultante concentración de calcio elevada en la hendidura diádica.

-**Liberación de calcio inducida por calcio:** el calcio que ingresa desde el exterior celular a través de los LTCCs difunde a través de la hendidura diádica e interactúa con los grupos y/o “clusters” de los receptores a rianodina o RyRs induciendo su apertura y la liberación adicional de calcio. Este proceso es determinado como la liberación de calcio inducida por calcio (CICR, por sus siglas en inglés). La liberación de calcio por los RyRs rápidamente incrementa la concentración de calcio en la hendidura diádica, lo cual dentro de 10 milisegundos difunde dentro del resto del citoplasma y lleva a un incremento en la concentración de calcio intracelular promedio. Este aumento temporal en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  general se conoce como transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ .

-**Movimiento de los miofilamentos:** un incremento en la concentración de calcio cerca de los miofilamentos resulta en la unión de calcio a la troponina C. El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ - troponina produce el desplazamiento de la tropomiosina del surco de la actina en que estaba ubicada. Ese desplazamiento deja descubiertos los sitios de la actina a los cuales se unen las cabezas de la miosina (puentes cruzados).

La interacción entre la actina y las cabezas de miosina permite que ocurra el ciclo de los puentes cruzados y de esa manera se produzca el acortamiento, es decir, la contracción. Para que se dé este ciclo, es necesario que se hidrolice el ATP.

La sensibilidad al calcio de los miofilamentos describe la relación entre el calcio intracelular y la generación de la fuerza resultante y el efecto inotrópico puede en principio ser incrementado ya sea por incrementar la concentración de calcio intracelular o por incrementar la sensibilidad al calcio de los miofilamentos.

**-Remoción de calcio:** siguiendo el influjo de calcio y su liberación, la concentración de calcio intracelular debe ser devuelta a su nivel de reposo para permitir la relajación del cardiomiocito.

Cuando cesan los potenciales de acción que recorren el sarcolema, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico comienza a disminuir, provocando que la tropomiosina cubra nuevamente los sitios de la actina que interaccionan con los puentes cruzados. Al cubrirse los sitios de interacción, cesa el deslizamiento y el sarcómero recupera la longitud que tenía antes de la contracción, es decir, ocurre la relajación muscular; esto requiere a su vez que el calcio sea transportado fuera del citosol por cuatro vías principales que involucran la ATPasa de calcio en el RS, el intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  del sarcolema, la ATPasa de Ca del sarcolema o membrana plasmática de las células cardiacas, y/o el uniporte de calcio mitocondrial.

Como el transiente de calcio predominantemente resulta de la liberación del calcio del RS, el reciclamiento del calcio dentro del RS por la bomba SERCA es el principal determinante de la remoción del calcio citosólico.

## 1.7 EL CALCIO Y ENFERMEDADES CARDIACAS

Las enfermedades cardiacas cuentan como una de las principales causas de muerte en el mundo por lo que la creación y/o descubrimiento de fármacos que sean capaces de contrarrestarlas y/o detener su progreso se ha convertido en un tema central dentro de la farmacología. Aunque se pueden prevenir, este conjunto de afecciones cobra la vida de 109 mil 297 pacientes al año en México.

La alteración de los flujos así como el manejo inadecuado del  $\text{Ca}^{2+}$  por los miocitos juegan un papel primario en una variedad de enfermedades cardiacas incluyendo las taquiarritmias, enfermedad isquémica del corazón, hipertrofia y falla cardiacas por lo que dichos eventos puede servir como un blanco clave para futuras terapias, es por ello que la mayoría de los agentes actualmente usados para tratar las enfermedades del corazón crónicas alteran los flujos de calcio del cardiomiocito ya sea directa o indirectamente.

Un ejemplo de éstos agentes es el diazóxido. El diazóxido es un derivado de benzotiadiazina con actividades antihipertensivas e hiperglucémicas. El diazóxido aumenta la permeabilidad de la membrana a los iones de potasio en el músculo liso vascular, esto interrumpe la actividad de los canales de iones



de calcio controlados por voltaje, evitando el flujo de calcio a través del sarcolema y la activación del aparato contráctil evitando la contracción del músculo liso vascular; esto da como resultado una vasodilatación y una disminución de la resistencia vascular periférica. Este agente también inhibe la liberación de insulina al interactuar con los canales de potasio sensibles al ATP de las células beta de los islotes pancreáticos.

El principal efecto cardioprotector del diazóxido se ha descrito a partir de la actividad que éste ejerce sobre los canales de potasio sensibles a ATP que se encuentran en la mitocondria, éstos realizan una multitud de funciones, pero debido a su sensibilidad a las concentraciones de ATP y ADP, estos canales a menudo están vinculados a cambios en los estados metabólicos celulares como isquemia e hipoxia (Rodrigo y Standen, 2005).

Los agentes farmacológicos que afectan la activación (apertura, como el caso del diazóxido) y la inhibición (cierre) de los canales se utilizan clínicamente para tratar una multitud de trastornos, tales como la hipertensión, isquemia miocárdica, asma bronquial, incontinencia urinaria, hiperinsulinismo, angina de pecho y algunas formas de miopatías del músculo esquelético (Hibino et al., 2010).

## **2.0 ANTECEDENTES INMEDIATOS**

Como se ha mencionado, el diazóxido es un compuesto que se ha considerado como un importante cardioprotector debido, principalmente, al efecto que éste ejerce sobre los canales de potasio sensibles a ATP.

De manera particular, existe un consenso emergente en que se ha establecido que la apertura del canal de potasio sensible a ATP mitocondrial protege el corazón contra ciertas patologías como el daño durante la isquemia-reperfusión, y que por lo tanto los abridores de dichos canales protegen el corazón de la misma forma. Sin embargo, hay opiniones ampliamente divergentes sobre los efectos de los abridores del canal como el diazóxido, ya que no es claro el mecanismo por el cual éstos pueden estar actuando.

Se ha propuesto que la apertura del canal  $mK_{ATP}$  permite la entrada de  $K^+$  a la matriz de la mitocondria, modificando el potencial de la membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y aumentando la actividad del intercambiador  $K^+/H^+$ , lo que provocaría que se pierda el gradiente de protones y una disminución de la producción de ATP por un desacople de la función de la  $F_1F_0$ -ATPasa (Yellon y Downey 2003). Por otra parte la entrada de  $K^+$  implica la entrada de  $H_2O$  aumentando el volumen de la mitocondria, esto se ha asociado con un aumento de la fosforilación oxidativa (O'Rourke, 2000). Hasta el momento se han

propuesto varias hipótesis de cómo el canal  $mK_{ATP}$  puede estar protegiendo al corazón, sin embargo ninguna ha sido concluyente.

Kowaltowski y col., (2001), mostraron que la apertura y el cierre de los canales  $mK_{ATP}$  causan cambios significativos en el volumen de la matriz, secundarios a la entrada de agua osmóticamente obligada al acompañar al flujo neto de potasio ( $K^+$ ) y aniones. Garlid y col., en el 2003 propusieron que los canales mitocondriales  $K_{ATP}$  están principalmente involucrados en el mecanismo de regulación de volumen y que los efectos bioenergéticos directos de la apertura de los canales mitocondriales  $K_{ATP}$  podrían considerarse poco significativos.

Se ha descrito que la apertura del canal  $mK_{ATP}$  con el diazóxido aumenta el volumen de la matriz mitocondrial (Lim y col., 2002). La contracción de la matriz mitocondrial (aproximadamente 30%) y el aumento del espacio entre la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria en el periodo de isquemia, bloquea el transporte de electrones, el transporte de nucleótidos de adenina y a la creatinina cinasa mitocondrial. El aumento del volumen de la matriz mitocondrial por la apertura del canal de  $mK_{ATP}$  previene la contracción de la membrana interna mitocondrial reduciendo el aumento del espacio intermembranal, lo que preserva el contacto y la estructura funcional de las proteínas de la membrana interna y externa de la mitocondria, (Zaugg y col., 2003; Ardehali y O'Rourke, 2005). Dicho aumento del volumen de la matriz de la mitocondria estimula la fosforilación oxidativa, principalmente la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Hanley y Daut, 2005).

Kato y col., (2002) describieron en miocitos ventriculares de rata que el diazóxido incrementa los transientes de calcio y la frecuencia de las chispas de calcio sin causar significativos cambios en el potencial de membrana, es decir, que aunque la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP mitocondriales pueden estar involucrados, la despolarización del potencial de membrana no fue correlacionado con el incremento observado en los transitorios de calcio (CaTs). Ellos también demostraron que ninguno de los cambios en el influjo y/o salida de calcio por el sarcolema podrían contribuir al incremento en los CaTs.

Lawrence y col., en el 2001 encontraron en miocitos cardiacos de ratas adultas que concentraciones de diazóxido entre 100-200  $\mu\text{mol/L}$  no cambiaron el potencial de membrana mitocondrial pero protegieron a los miocitos de la inhibición metabólica.

En contraposición a los hallazgos previamente mencionados, varios reportes parecen contradecir esta predicción al mostrar una amplia disminución en el potencial de membrana mitocondrial después del tratamiento con una variedad de abridores de los canales de potasio sensibles a ATP. Así, Liu y col., en

el 2001, utilizando un ensayo indirecto, describieron un desacoplamiento profundo así como despolarización de las mitocondrias en cardiomiocitos después de la administración de altas dosis de diazóxido y pinacidilo y propusieron que este desacoplamiento media la cardioprotección al reducir la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias; evitando así la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial lo cual interrumpiría las funciones de la mitocondria y permitiría la entrada de sustancias hacia la matriz, así como la liberación de compuestos de la matriz hacia el medio intracelular, lo que provocaría a su vez la destrucción de la mitocondria y la activación de vías de apoptosis (Yellon y Downey, 2003).

Así mismo, Holmuhamedov y col., en 1999, habían demostrado la despolarización de la membrana y la inhibición de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de abridores de canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocondriales en mitocondrias aisladas de corazón de rata adulta.

Bajo este mismo mecanismo, en el caso particular de la isquemia, se propone que la apertura del canal  $\text{mK}_{\text{ATP}}$ , disminuye la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria. Esta disminución de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser provocada por una despolarización parcial del potencial de membrana ( $\Delta\Psi\text{m}$ ), debido a la apertura del canal  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  (Wang y Ashraf, 1999; Wang y col., 2001), la reducción de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  contrarresta la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el periodo de isquemia-reperfusión, lo que a su vez también atenúa la apertura del PTPM (Murata y col., 2001).

En este mismo trabajo Wang and col., demostraron que el pretratamiento con diazóxido (100 mM) por 5 minutos seguido de 10 min de lavado antes de 30 min de isquemia y 2 h de perfusión redujo significativamente el tamaño del infarto indicando un papel de los canales de potasio sensibles a ATP mitocondriales como disparadores de la protección, identificaron además que dicha protección fue bloqueada por la coadministración de bloqueadores del canal de calcio tipo L como la nifedipina (100 nM) y del canal mitocondrial de potasio sensible a ATP como el 5-ácido hidroxidecanoico (5-HD, 50 mM). Sus resultados mostraron que el diazóxido no afecta las corrientes de calcio tipo L en miocitos ventriculares de conejo y que cuando los niveles de calcio intracelular fueron medidos mostraron una elevación significativa del pico de calcio intracelular durante la contracción celular, sin embargo, el nivel en reposo del calcio intracelular no fue modificado significativamente. En base a ello postularon que el pico de concentración elevada de Ca en el citosol durante una contracción es causado por la activación de los canales  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  y posterior despolarización de la membrana mitocondrial. Durante la sístole cuando el calcio del citosol está elevado, la mitocondria despolarizada absorbería menos  $\text{Ca}^{2+}$ , dando como resultado unos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólicos más altos.

De igual forma el papel cardioprotector del Diazóxido a través de su acción sobre los canales de potasio fue probado en el estudio de Pain y col., (2000) en el cual 5 min de tratamiento con diazóxido redujo la zona de infarto miocárdial incluso cuando el diazóxido fue lavado por hasta 30 min antes de los 30 min de isquemia letal.

Otro de los mecanismos de protección que se han descrito para el diazóxido es la relación que existe entre la apertura del canal  $mK_{ATP}$  con la modulación de la producción de ROS, ya que varios estudios muestran que la apertura del canal  $mK_{ATP}$  aumenta la producción de ROS. Forbes y col., en el 2001 reportaron que el diazóxido y pinacidil aumentaron significativamente la producción de ROS en miocitos cardíacos y que esta producción fue notablemente atenuada por 5-hidroxidecanoato (5-HD), así como por algunos antioxidantes, dichos resultados son consistentes con los hallazgos de Pain y col., (2000) que demostraron que los antioxidantes bloquean la reducción inducida por el diazóxido en el tamaño del infarto cuando se administran durante el tratamiento con este agente.

### **3.0 JUSTIFICACIÓN**

Los cambios en la homeostasis de calcio juegan un papel primario en una variedad de enfermedades cardíacas incluyendo las taquiarritmias, la enfermedad isquémica del corazón, la hipertrofia y las fallas cardíacas, por lo que los mecanismos involucrados en dichos eventos pueden servir como un blanco clave para futuras terapias, es por ello que la mayoría de los agentes actualmente usados para tratar las enfermedades del corazón crónicas alteran los flujos de calcio del cardiomiocito ya sea directa o indirectamente.

Un ejemplo de dichos agentes es el diazóxido un derivado de benzotiadiazina del cual se han descrito sus propiedades cardioprotectoras debido al efecto que ejerce sobre la apertura de los canales mitocondriales de potasio dependientes de ATP, pero cuyo efecto sobre los niveles de calcio intracelular han sido poco estudiados.

Diversos estudios clínicos sustentan el uso prometedor de este tipo de fármacos encargados de la apertura de los canales de potasio mitocondriales pudiendo ser una nueva arma terapéutica contra la enfermedad isquémica y sus consecuencias, es por ello que el estudio de sus efectos en el manejo del calcio de las células cardíacas es importante.

### **4.0 HIPOTESIS**

El diazóxido disminuye el calcio intracelular en reposo, ya sea por una acumulación en el retículo sarcoplásmico, o por inhibición de su entrada a la célula.

## **5.0 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia del diazóxido sobre los niveles basales citoplasmáticos del calcio intracelular en miocitos cardiacos de ratas adultas y analizar los posibles mecanismos involucrados en los cambios obtenidos.

## **6.0 OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Evaluar el efecto del diazóxido sobre los niveles citoplasmáticos basales del calcio intracelular, así como el curso temporal del efecto.
- ❖ Evaluar el papel que desempeña el retículo sarcoplásmico en el manejo del calcio intracelular en presencia del diazóxido.
- ❖ Evaluar el papel que desempeñan los canales encargados de la entrada de calcio operada por almacenamiento (SOCE por sus siglas en inglés) en el manejo del calcio intracelular en presencia del diazóxido.
- ❖ Evaluar el efecto específico que juega el canal de potasio mitocondrial sensible a ATP en el manejo del calcio intracelular utilizando inhibidores de dicho canal como el 5-hidroxidecanoato (5-HD)
- ❖ Analizar si el efecto del diazóxido sobre el calcio en reposo está mediado por las ROS utilizando atrapadores de ROS como la N-acetil cisteína (NAC).

## **7.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Disociación de miocitos ventriculares.**

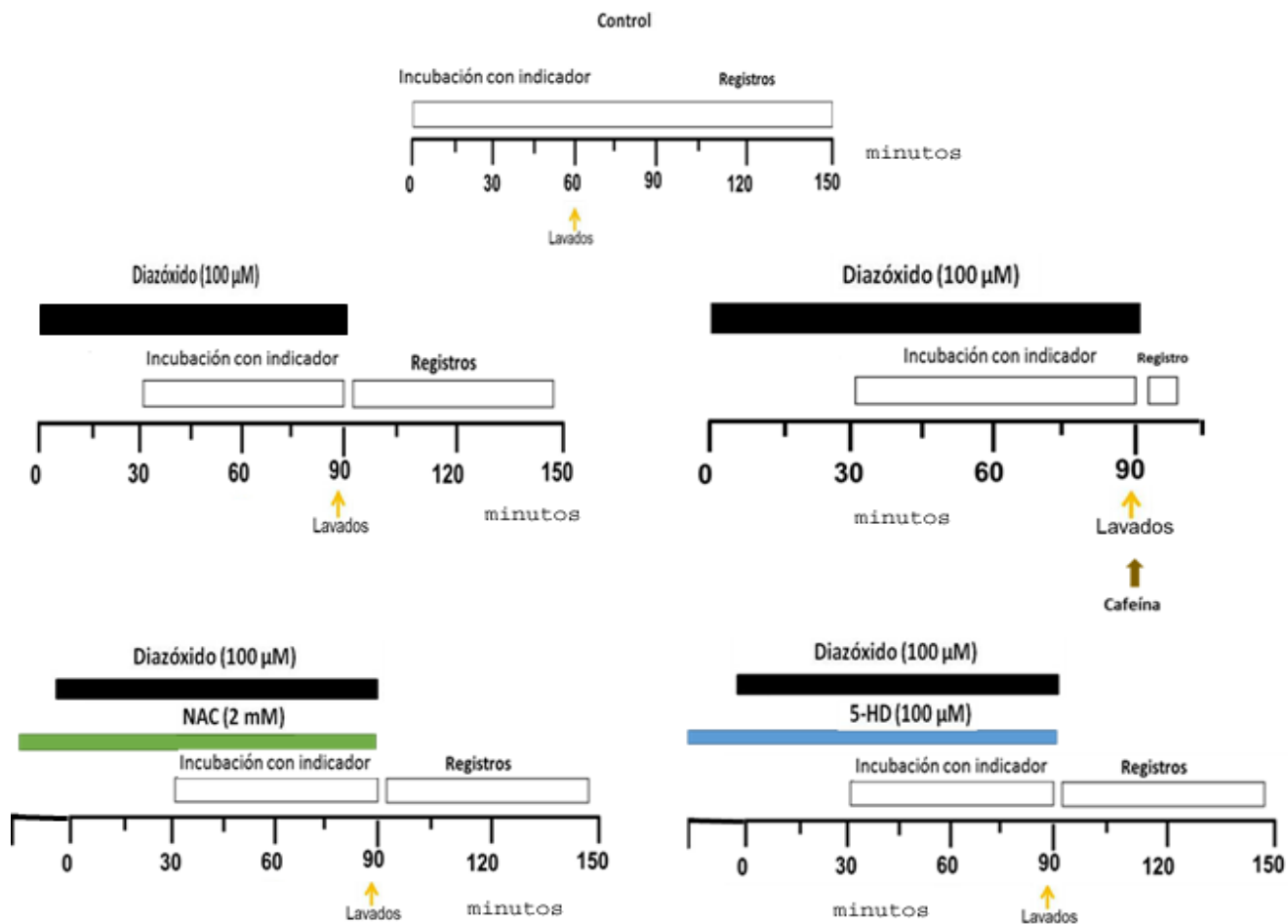
Los miocitos ventriculares se obtuvieron de corazones de ratas adultas Wistar macho con un peso entre 200 y 250 gr. Las ratas fueron anestesiadas con 50 mg/Kg de pentobarbital (Pfizer), vía intraperitoneal, al mismo tiempo se les administró 200 UI/Kg heparina sódica (Pissa), para evitar la formación de trombos durante la intervención. Una vez anestesiadas se prosiguió a retirar el corazón realizando una incisión en el abdomen para exponer la cavidad torácica. El tórax fue abierto al realizar dos incisiones a lo largo de cada costado, una vez expuesto el corazón se identificó la arteria aorta y el corazón se levantó suavemente con los dedos para evitar dañarlo, se realizó la incisión de la arteria aorta, la vena cava y las venas pulmonares. Posteriormente a la escisión del corazón éste se colocó en solución de perfusión

y rápidamente se colocó la arteria aorta en el sistema de perfusión de Langendorff, en donde se fija con un hilo de seda para llevar a cabo la perfusión retrógrada.

Una vez que los corazones son rápidamente perfundidos por 5 min con solución Tyrode sin  $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo (en mM): 136 NaCl (Merck), 5.4 KCl (Merck), 1  $\text{MgCl}_2$  (Sigma), 10 HEPES (Sigma), and 11 glucosa (Sigma). Posteriormente los corazones se recirculan por 60-90 min con solución Tyrode con 20-40 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Sigma), 0.13 mg/mL de colagenasa tipo II (Worthington) y 0.02 mg/ mL de proteasa tipo XIV (Sigma). Una vez transcurrido el tiempo necesario para que las enzimas actúen, el corazón se desmontó y se cortó en trozos pequeños y se agito con  $\approx$  10 mL de la misma solución Tyrode de 3 a 4 veces a 45 r.p.m. por 5-10 min. Las células desprendidas son filtradas con un colador (100 mm nylon BD Falcon) y centrifugadas a 800 g por 2 min. La pastilla formada se re-suspendió con solución Tyrode con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 1% de BSA. Se dejó estabilizar por 15 min y una vez transcurrido el tiempo se aumentó la concentración de  $\text{CaCl}_2$  a 500  $\mu\text{M}$ , dejando nuevamente estabilizar por 15 min y aumentando la concentración de  $\text{CaCl}_2$  a 1 mM. Las células se dejaron estabilizar por al menos 10 min en esta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de ser utilizadas.

## **7.2 Protocolos de evaluación del efecto del diazóxido en cardiomiocitos disociados.**

Los cardiomiocitos fueron incubados en solución Tyrode con y sin diazóxido (100  $\mu\text{M}$ ) por 90min. Por otra parte, otros grupos de cardiomiocitos se incubaron con solución Tyrode conteniendo N-acetil cisteína (NAC) (2 mM) o ácido 5 hidroxidecanoico (5-HD) (100  $\mu\text{M}$ , Sigma), (100  $\mu\text{M}$ , un inhibidor de proteasas) en presencia o ausencia de diazóxido (100  $\mu\text{M}$ ). Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con los tiempos que se muestran en la figura 6.



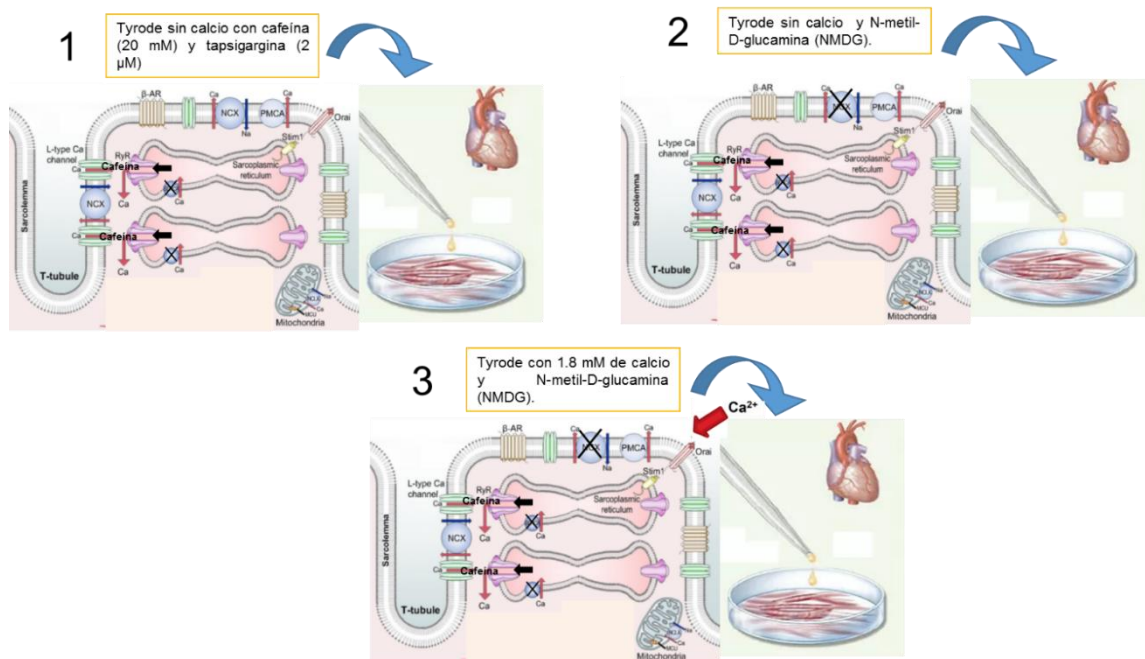
**Figura 6.** Protocolos utilizados para la incubación de cardiomiocitos disociados para el análisis del nivel basal de  $Ca^{2+}$  (véase punto 7.3). Los fármacos y las concentraciones a las que se utilizaron se indican en la figura.

### 7.2.1 Análisis de SOCE.

Para determinar el papel que desempeña el mecanismo SOCE en los niveles de calcio citoplasmáticos en la presencia de diazóxido se siguió la siguiente metodología (ver Fig. 7):

- ❖ Los cardiomiocitos ventriculares aislados se incubaron por 60min en solución de Tyrode con 1 mM de calcio con el indicador fura 2-AM y posteriormente se fijaron sobre cubreobjetos con laminina.
- ❖ Después se cambiaron a una solución libre de calcio que contenía 10 mM de cafeína y 2  $\mu$ M de tapsigargina (Tg).

- ❖ Enseguida se les colocó una solución como la anterior pero adicionada con 135 mM de N-metil-D-glucamina (NMDG) en lugar de sodio.
- ❖ Finalmente se colocaron en una solución de 1.8 mM de calcio y se midieron los niveles de calcio citoplasmáticos dependientes de SOCE.
- ❖ La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de SOCE se midió después de la adición de una solución con 1.8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . El análisis de los datos se realizó utilizando el software ImageWorkbench (IW) y SigmaPlot 10 (Systat Software Inc.).
- ❖ Las amplitudes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se midieron restando los valores del cociente (340/380) justo antes de la re-adición de  $\text{Ca}^{2+}$  de aquel valor máximo del cociente y por lo tanto de la entrada máxima de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ❖ Las tasas de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se estimaron ajustando una recta a partir del incremento de las relaciones de fluorescencia de Fura-2 (cambios en el cociente / s) después de la re-adición de  $\text{Ca}^{2+}$ , hasta el valor máximo obtenido y se tomó la pendiente del aumento, los valores fueron normalizados respecto a su control.



**Figura 7.** Metodología experimental para el análisis del sistema SOCE.

### 7.3 Medición del calcio intracelular por métodos ópticos.

Para medir los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se utilizaron cardiomiocitos disociados cargados con el indicador fluorescente Fura-2 AM (Molecular Probes). Este indicador puede permear la membrana, pero no es sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  hasta que es hidrolizado por esterasas. Al unir  $\text{Ca}^{2+}$  el Fura-2 presenta un



cambio en sus propiedades de absorción que se observa favorablemente excitando entre 300 y 400 nm y midiendo la fluorescencia de emisión a 510 nm aproximadamente.

Cuando se excita con longitudes de onda menores a 360 nm, la fluorescencia emitida (y medida) a 510 nm aumenta, mientras que cuando se excita a longitudes mayores de 360 nm, la fluorescencia disminuye. Este corrimiento hacia el azul en el espectro de excitación es aprovechado para excitar el compuesto de manera alterna con dos longitudes de onda, usualmente 340 y 380 y obtener la relación entre las cantidades de luz emitida a las dos longitudes de onda. Este método denominado fraccional o de cociente permite obtener señales de calcio que son independientes de la cantidad de colorante y de las propiedades ópticas pasivas de la preparación, lo cual facilita las calibraciones de las señales en término de concentración de calcio.

El Fura-2 es un indicador de alta afinidad para el calcio y por lo tanto muy útil en detectar y reportar cambios pequeños en un rango bajo de concentraciones de calcio (Caputo 2011).

El protocolo seguido fue el siguiente:

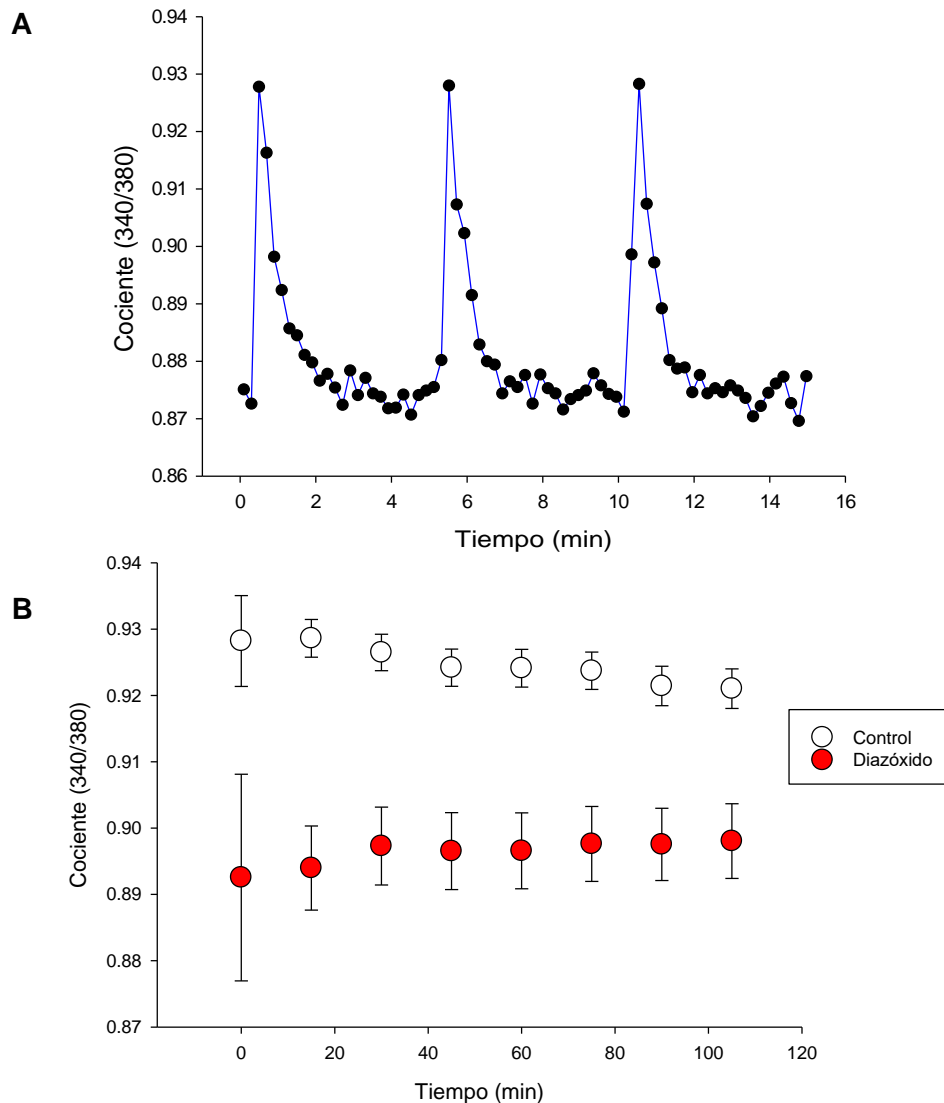
- ❖ Los cardiomiocitos disociados se cargan con 12.5 mM de Fura-2 AM en solución Tyrode con o sin fármaco (Figura 6) por 60 min en oscuridad y a temperatura ambiente.
- ❖ Posteriormente se lava el indicador con Tyrode y las células se incuban por 30 min para permitir que el indicador se convierta en su forma sensible al  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ❖ Las células cargadas se colocan dentro de una cámara de registro la cual se encuentra sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon). Las células son iluminadas durante 100 ms con una luz monocromática de manera alterna entre dos longitudes de onda (340 y 380 nm) y la luz emitida se filtra para obtener la longitud de onda de emisión de 510 nm la cual es detectada con una video cámara acoplada al microscopio.
- ❖ Para verificar que las células a utilizar son fisiológicamente adecuadas para trabajar se registran señales de calcio que se inducen mediante estímulos eléctricos a 0.2 Hz, a través de electrodos de platino colocados dentro de la cámara de registro.
- ❖ Los datos fueron analizados utilizando los programas ImageWorkbench (IW) y SigmaPlot 10 (Systat Software Inc.).
- ❖ En los experimentos en los cuales los cardiomiocitos disociados se incubaban con diversos fármacos éstos se aplicaron como se indica en la figura 6.

## 8.0 RESULTADOS.

### 8.1 Niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia y/o ausencia de Diazóxido.

Aunque se han establecido los efectos que tiene el diazóxido en el manejo del calcio bajo diversos modelos experimentales de diferentes patologías poco se ha descrito respecto a su efecto en los niveles basales en cardiomicitos adultos, es por ello que como primer análisis se determinaron los niveles citoplasmáticos basales de calcio en presencia y ausencia de diazóxido durante un tiempo de 90 min después de la adición de diazóxido. Antes de cada determinación se midieron las señales de calcio bajo estimulación eléctrica (0.2 Hz) con el fin de asegurar que las células respondían correctamente y eran funcionalmente adecuadas para realizar los experimentos.

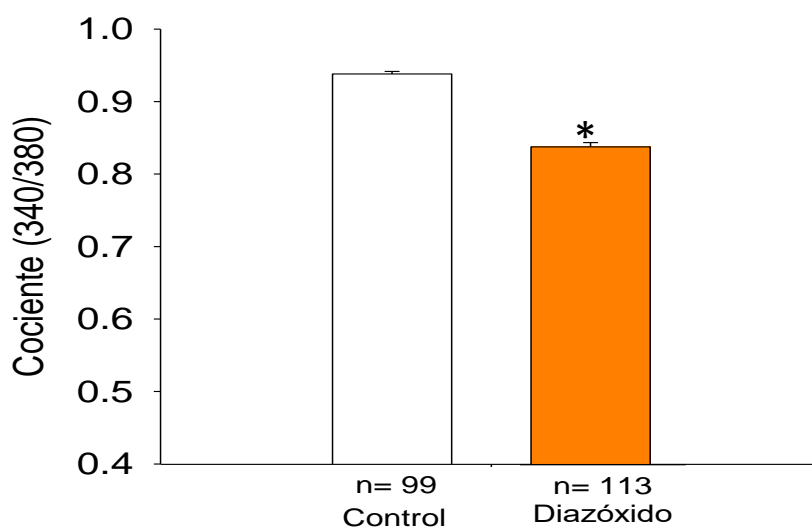
A continuación se muestra un ejemplo de las señales de calcio obtenidas:



**Figura 8.** Transientes de calcio representativos obtenidos por estimulación eléctrica (0.2 Hz) **(A)**. Efecto del Diazóxido en los niveles de calcio citoplasmáticos basales con respecto al tiempo **(B)**. (\*P<0.05 contra el control).

### 8.2 Niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia y/o ausencia de Diazóxido.

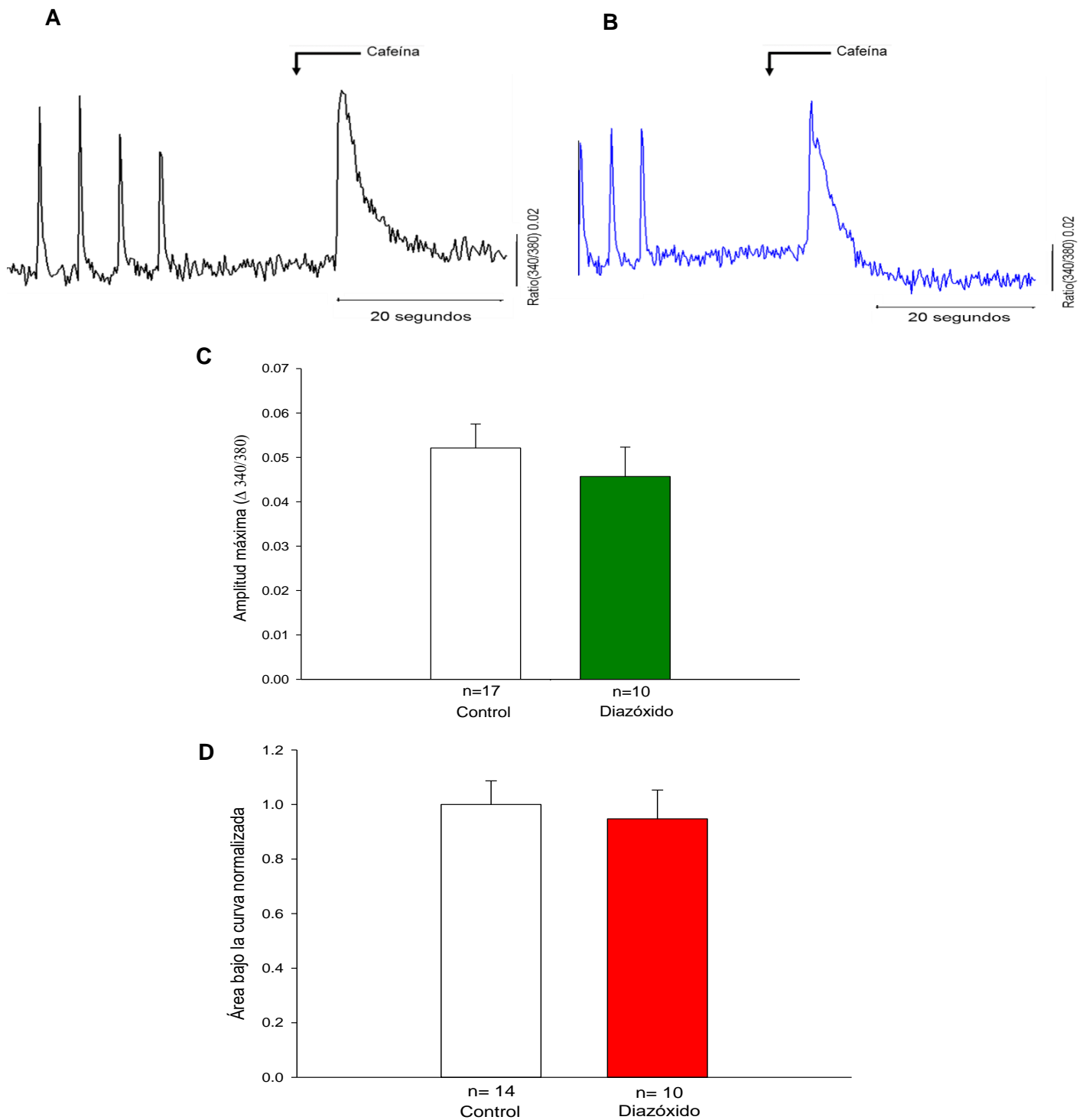
Durante 110 min los niveles de calcio citoplasmáticos no se modificaron y se encontraron por debajo de los niveles obtenidos en las células control, se decidió confirmar este comportamiento al incubar cardiomiocitos con y sin diazóxido por un periodo de 90 min, al final del cual los niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia de diazóxido también se encontraron por debajo de las células control. Los resultados que se muestran son de tres experimentos independientes (Figura 9).



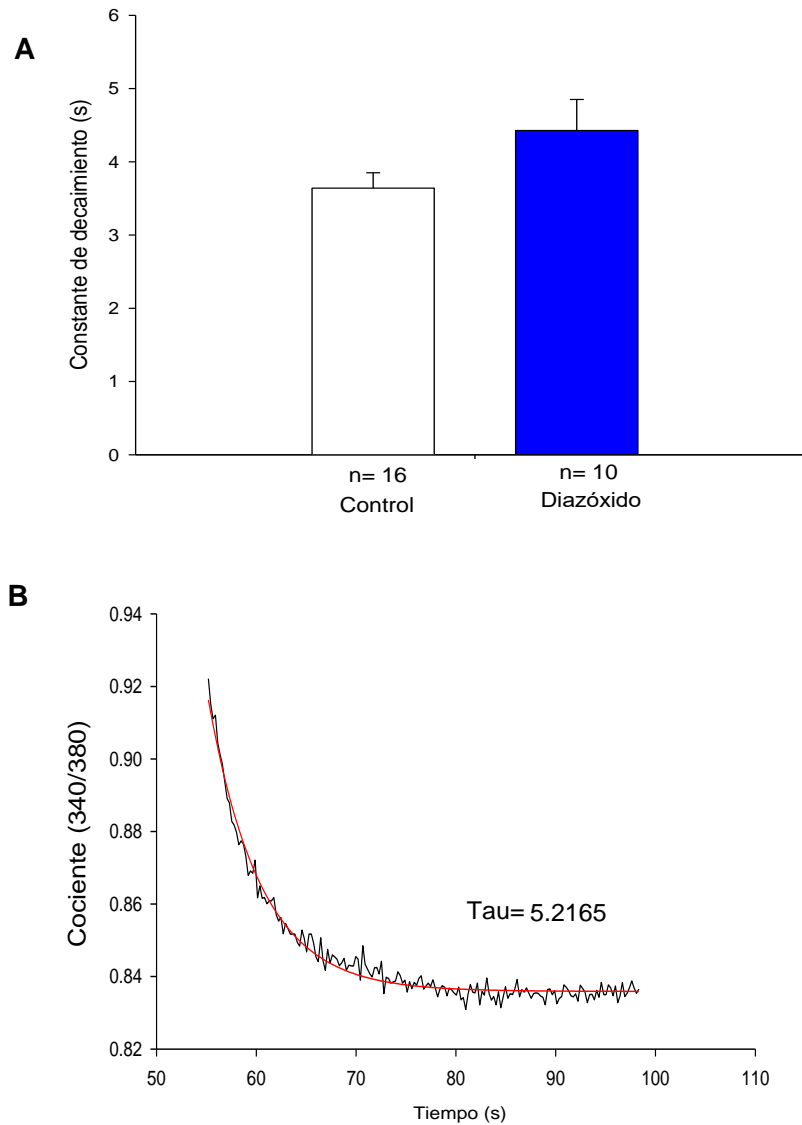
**Figura 9.** Niveles basales de calcio citoplasmático en presencia y ausencia de diazóxido, promedio de tres experimentos independientes. n= número de células para cada condición, (\*P<0.05 contra el control)

### 8.3 Efecto del Diazóxido en el contenido de calcio del retículo sarcoplásmico y la tasa de eliminación del calcio citosólico por NCX.

La disminución del calcio citoplasmico basal en presencia de diazóxido podría deberse a que está siendo capturado por alguno de los diferentes compartimentos celulares que se encargan de almacenarlo. Siendo el retículo sarcoplásmico el principal almacén de calcio en la célula cardiaca evaluamos la posibilidad de que en éste hubiese una mayor recaptura de calcio en células tratadas con diazóxido. Para lo cual se utilizó una solución de cafeína (20 mM), la cual actúa como un agonista de los canales de calcio conocidos como receptores a la rianodina induciendo su apertura. El contenido de calcio del retículo sarcoplásmico fue evaluado midiendo la amplitud de los cambios en la señal de fluorescencia inmediatamente después de la exposición a la solución con cafeína.



**Figura 10.** Efecto del diazóxido sobre las señales de  $Ca^{2+}$  inducidos con cafeína en cardiomiocitos disociados. Registro representativo de las señales de calcio inducidos por la aplicación de 20 mM de cafeína en control (A) y en células tratadas con diazóxido (B). Amplitud máxima de la señal de calcio inducida con cafeína (C). Respuesta de calcio integrada (D), (\* $P < 0.05$  contra el control).

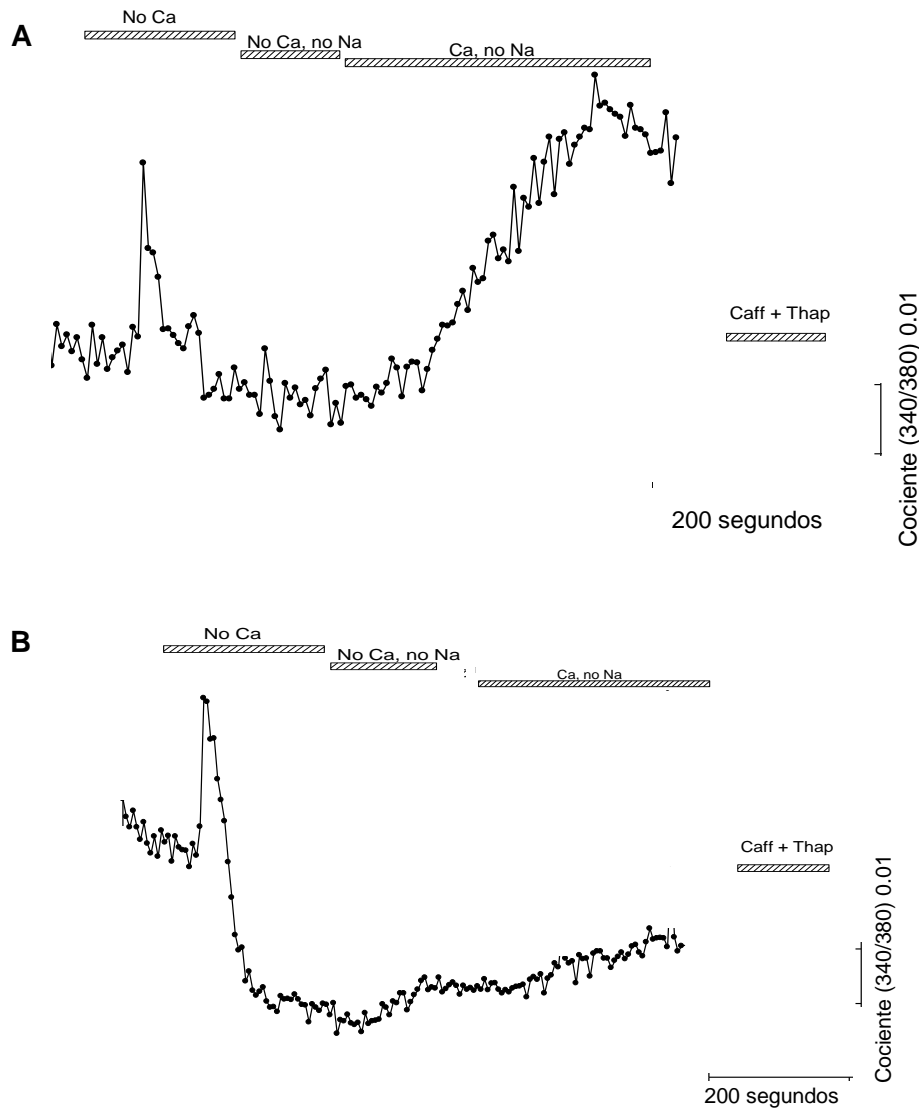


**Figura 11.** Efecto del diazóxido sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos con cafeína en cardiomiocitos disociados. Constante de tiempo de decaimiento de las señales de calcio inducidas con cafeína (A). La disminución de las señales de calcio fue ajustada por una sola función exponencial y se calcularon las constantes de caída (s). Curva representativa del ajuste exponencial a la fase de caída de la señal de calcio producida con cafeína (B) (\* $P < 0.05$  contra el control).

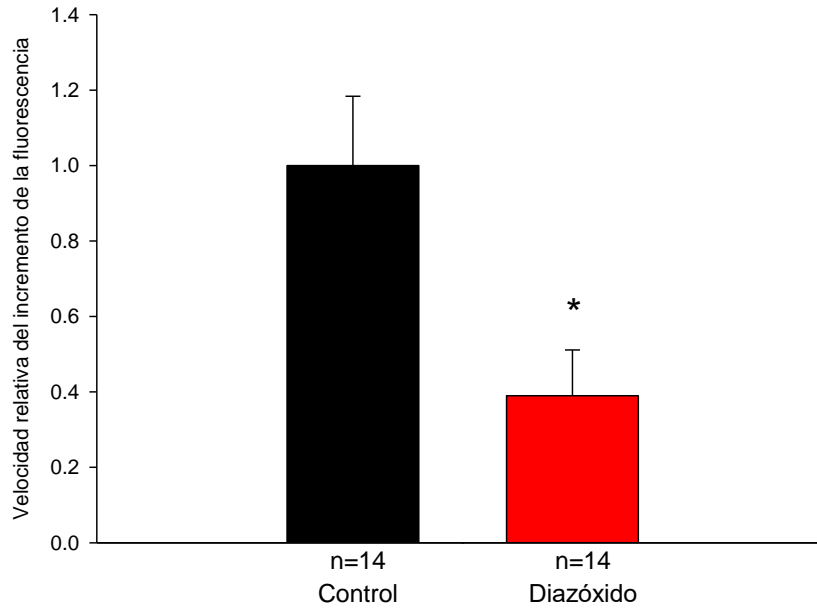
#### 8.4 Efecto del diazóxido en el sistema SOCE.

Uno de los sistemas involucrados en el mantenimiento de los niveles de calcio dentro del retículo sarcoplásmico y, por lo tanto, de la homeostasis del calcio intracelular es el sistema denominado: “entrada de calcio operada por almacenamiento” (store operated calcium entry, SOCE), por lo que se

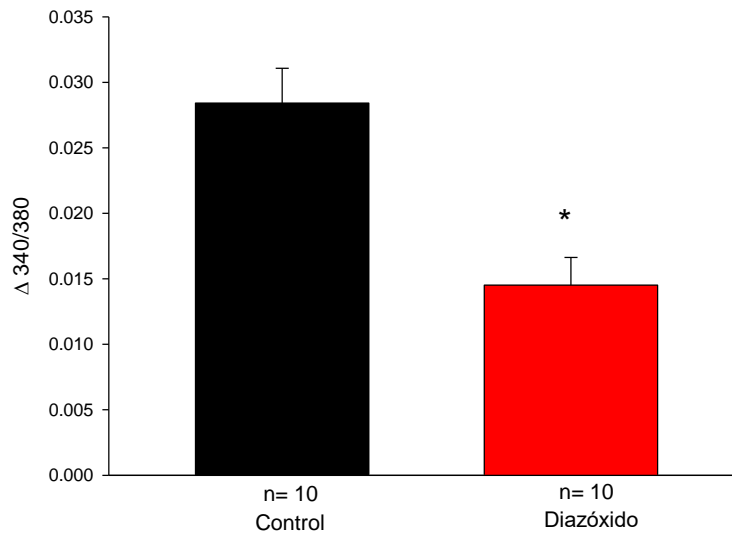
decidió investigar el efecto del diazóxido en la tasa de readmisión de calcio en cardiomiocitos intactos después de la depleción del RS con tapsigargina (inhibidor no competitivo de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoendoplásmico) y cafeína en células cargadas con Fura 2-AM. La entrada de calcio resultó en un rápido incremento en la concentración de calcio citosólico en las células control. Esto fue substancialmente reducido en las células incubadas previamente con diazóxido.



**Figura 12.** Señales representativas de la entrada de calcio por el sistema SOCE después de la depleción inducida con cafeína (Caff) y tapsigargina (Thap) del retículo sarcoplásmico para las células control (A) y con diazóxido (B). No Ca= solución sin calcio, No Ca, no Na= solución sin calcio y sin sodio, Ca, no Na= solución con calcio y sin sodio.



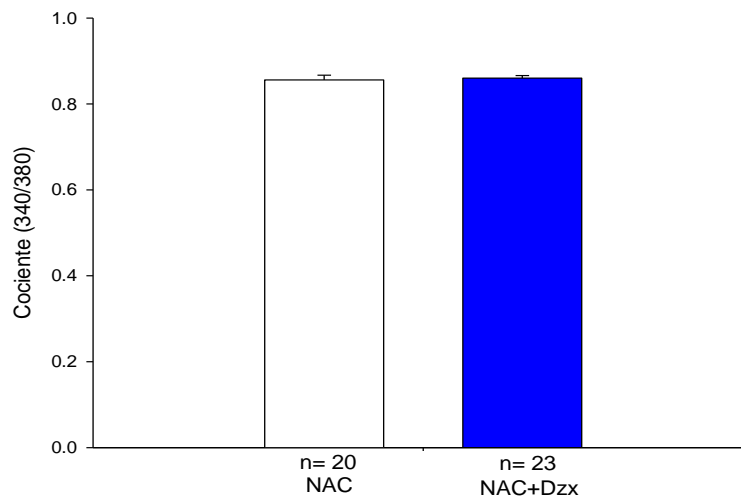
**Figura 13.** Efecto del diazóxido en la velocidad de cambio de la fluorescencia (cociente 340/380) al activar la entrada de calcio después del vaciamiento del RS con tapsigargina y cafeína. La pendiente se normalizó con respecto a las condiciones control. En negro en células control la velocidad relativa del incremento de la fluorescencia y en rojo en células incubadas previamente con diazóxido. \*P<0.05 contra el control.



**Figura 14.** Efecto del diazóxido en el incremento de la fluorescencia producida al activar los SOC's (\*P<0.05 contra el control).

### 8.5 Papel de los ROS en el efecto del diazóxido sobre el nivel de calcio basal.

El efecto cardioprotector del diazóxido se ha relacionado con la producción indirecta de ROS (Forbes y col., 2001; Murphy y Steenbergen, 2008). Los cardiomiocitos incubados con diazóxido presentan una mayor producción de ROS en comparación con los cardiomiocitos incubados con solución Tyrode, (González y col., 2010). Debido a ello se exploró la posibilidad de que el efecto del diazóxido sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales estuviese mediado por la producción de ROS. Para tal efecto se incubaron con NAC cardiomiocitos aislados, un “atrapador” de ROS previamente a la aplicación del diazóxido de acuerdo al protocolo que se muestra en la figura 6. El tratamiento con NAC no parece evitar el efecto de diazóxido sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales, (Fig. 15).



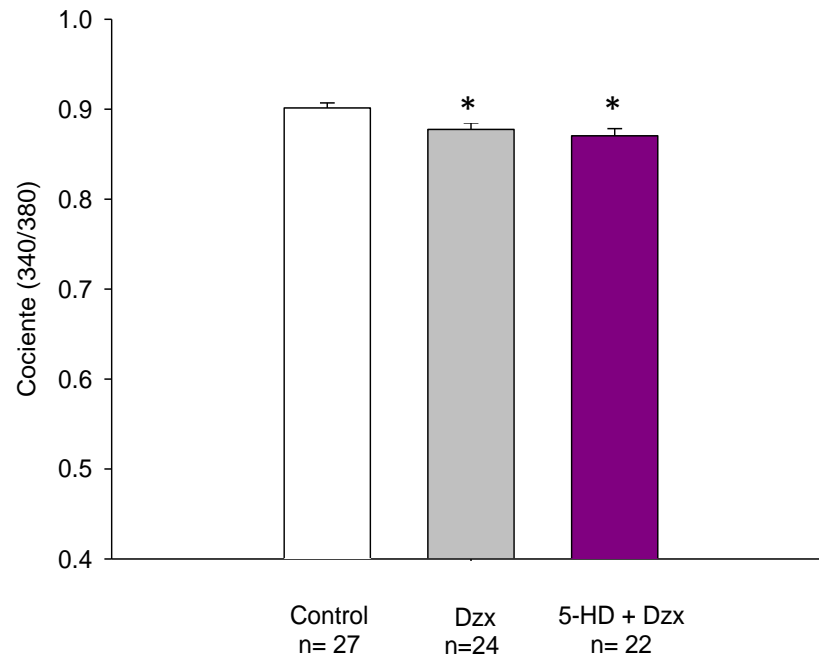
**Figura 15.** Efecto del NAC sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales en cardiomiocitos tratados con Dzx. Valores promedios ( $\pm$  EE) del cociente (340/380) después de incubar las células con NAC durante 100 min ( $*P < 0.05$  contra el control), n= número de células analizadas para cada condición.

### 8.6 Papel de la apertura de los canales mKATP en el efecto del diazóxido sobre el nivel de calcio basal.

En algunas investigaciones se ha establecido que el diazóxido es un abridor selectivo de los canales mKATP y este efecto se ha considerado como la primera etapa en su efecto cardioprotector, por lo que es posible que este mecanismo estuviese relacionado con la acción del diazóxido en el manejo del calcio citoplasmático basal, por ello y con el fin de ver el efecto específico sobre el canal, se incubaron cardiomiocitos disociados, con el 5-HD, bloqueador específico de estos canales, de acuerdo al protocolo que se muestra en la figura 6. El tratamiento con 5-HD parece no evitar el efecto de diazóxido sobre los



niveles de calcio citoplasmáticos basales, tanto en las células incubadas con solo Dzx y las células en las que se colocó 5-HD y Dzx se observa una disminución modesta que es significativamente diferente con el control (\*P<0.05), (Figura 15).



**Figura 16.** Efecto del bloqueador específico de los canales mKATP, el 5-HD sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales en cardiomiocitos tratados con Dzx. Valores promedios ( $\pm$  EE) del cociente (340/380) después de incubar las células con 5-HD durante 100 min (\*P<0.05 contra el control), n= número de células analizadas para cada condición.

## **9.0 DISCUSIÓN**

### **9.1 Niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia de Diazóxido.**

El mantenimiento de la homeostasis del calcio es esencial para la vida, en el corazón el calcio juega un papel integral en varios procesos celulares incluyendo la iniciación y mantenimiento de la contracción, es por ello que un número de canales y transportadores de la membrana celular e intracelulares están involucrados en este proceso, un inadecuado manejo del calcio en la célula cardíaca puede desembocar en la generación de diversas patologías.

Un ejemplo de aquellos agentes capaces de regular el manejo del calcio celular es el diazóxido, fármaco que induce la apertura del canal de  $K_{ATP}$  mitocondrial y cuya efectividad como preconditionante farmacológico en casos de isquemia-reperfusión, ya ha sido descrito (González et al., 2010). Se encontró que en corazón de rata el diazóxido fue capaz de atenuar el daño celular producido como resultado de la isquemia debido al incremento intracelular del  $Ca^{2+}$ , disminuyendo el ingreso de éste al citosol.

Debido al impacto observado de este compuesto en situaciones patológicas y la importancia de su efecto cardioprotector, se evaluó su actividad sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales, observando que el diazóxido disminuyó los niveles de calcio en reposo (Figura 8), dicho efecto no había sido descrito en células de músculo cardíaco, sin embargo, coincide con lo que ya se había descrito en células Jurkat, (Holmuhamedov y col., 2002) que al ser tratadas con diazóxido los niveles de calcio citoplasmáticos se redujeron en un  $66 \pm 7\%$ , respecto a sus controles, así como en modelos de cultivo celular de oligodendrocitos en los que se encontró que en presencia de diazóxido los niveles de calcio citoplasmáticos basales se redujeron significativamente (Fogal y col., 2010).

Los resultados obtenidos respecto a los niveles de calcio citoplasmáticos inicialmente los observamos después de un tiempo de incubación con el compuesto de 90 min, con el fin de conocer de manera más específica el efecto del diazóxido se evaluaron los niveles de calcio citoplasmáticos con respecto al tiempo, observando que el diazóxido redujo los niveles de calcio citoplasmáticos prácticamente de manera inmediata y con diferencia significativa respecto al control, efecto que además se mantuvo en el tiempo (Figura 9).

### **9.2 Influencia del diazóxido en el contenido de calcio del RS.**

Un adecuado funcionamiento celular requiere que el ambiente osmótico se mantenga, la célula siempre trata de mantener dentro de cierto rango los niveles de las concentraciones de los diferentes iones, por lo que el efecto del diazóxido reduciendo los niveles basales de calcio podría deberse a cambios en varias de las vías de entrada y/o salida de este ión.

Es bien sabido que el RS generalmente mantiene concentraciones de calcio mucho más elevadas que las del citosol, esto implica un equilibrio complejo y altamente regulado de almacenamiento, liberación y recaptura de calcio coordinado por la actividad y las interacciones entre un conjunto diverso de proteínas reguladoras de calcio del RS, por lo que es considerado como el principal almacén de calcio intracelular, en base a ello, se decidió evaluar el contenido de calcio en el RS en presencia y ausencia de diazóxido. Se observó que en ambos casos el contenido de calcio en el retículo sarcoplásmico no presentó diferencia significativa, medida tanto por la amplitud máxima de la liberación producida por la cafeína, como integrando la señal obtenida en esas condiciones (Fig. 11). Debido a que con concentraciones altas de cafeína se libera la mayor parte del contenido de calcio del RS el intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  se activa y dicha actividad se refleja en la fase de caída de la señal fluorescente obtenida con la cafeína por lo que su análisis nos indica, de manera indirecta, la actividad del co-transportador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ . Esta fase tiene en buena parte de ella una caída de tipo exponencial, por lo que al analizarla matemáticamente podemos obtener una cuantificación de posibles cambios en la actividad del intercambiador. En nuestros experimentos encontramos que la constante de tiempo de dicha fase no se modificó con el tratamiento con diazóxido por lo que podemos sugerir que no se produjeron cambios en la actividad del intercambiador en esas condiciones.

### **9.3 Efecto del diazóxido en la activación del sistema SOCE.**

Una de las vías involucradas, y mayormente reconocidas, en el manejo del calcio celular es la entrada de calcio a través del canal de calcio tipo L, la cual es crucial en el acople excitación-contracción. En estudios realizados en nuestro laboratorio, en los que farmacológicamente se preconditionaron miocitos disociados de corazones de rata adulta con diazóxido, se observó que dicho preconditionamiento produjo una disminución de la subunidad alfa-1c del canal de calcio tipo L, analizada por técnicas de Western blot (González y col., 2010). La regulación negativa implicó una mayor degradación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que a su vez redujo el influjo de dicho ión. Este efecto puede atenuar la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperfusión y con ello aumentar la sobrevivencia de la célula. Este mecanismo se tradujo en señales de calcio, producidas a través de potenciales de acción, disminuidas en amplitud. En esta tesis, trabajando con un indicador de calcio de cociente encontramos que el diazóxido produjo una disminución en los niveles de calcio en condiciones de reposo, en estas condiciones la probabilidad de apertura de estos canales es muy baja por lo que la reducción del calcio intracelular en condiciones basales que produce el diazóxido debe explicarse de otra manera.

Otro de los sistemas que se encargan del manejo del calcio intracelular es el denominado como la entrada de calcio operada por almacenamiento o SOCE (por sus siglas en inglés). El vaciado de las reservas de calcio del RS induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular por el sistema SOCE al abrir

los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOCs) de la membrana plasmática sin la intervención de un potencial de acción. Por lo tanto, se consideró un sistema viable de ser evaluado con el fin de conocer su comportamiento bajo el tratamiento con diazóxido.

Se produjo la depleción del RS utilizando una solución con cafeína y tapsigargina y el bloqueo del intercambiador de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  con NMDG (en ausencia de calcio). Al añadir una solución con calcio (1.8 mM) se observó un incremento en la fluorescencia, y por lo tanto, en los niveles de calcio citoplasmáticos. Las células que fueron tratadas con Diazóxido presentaron un menor ingreso de calcio por el sistema SOCE respecto a las células control en las que la subsecuente re-admisión de calcio generó una señal de calcio significativamente mayor.

Para cuantificar este proceso y debido a que el incremento es lineal en una buena parte del mismo, medimos la tasa de aumento de la señal de calcio (pendiente inicial) ya que este parámetro es un indicador indirecto del número de canales SOCE abiertos. Encontramos que la tasa de ingreso de calcio en presencia del diazóxido disminuyó significativamente respecto al control (Fig. 13). Aunado a ello, se midió el gradiente entre el inicio del incremento en la fluorescencia hasta el valor máximo obtenido como otro indicador de la tasa máxima de entrada de calcio. Al igual que la pendiente, este parámetro fue significativamente reducido en presencia del diazóxido. El mecanismo por el cual el diazóxido está provocando el efecto previamente mencionado no ha sido descrito en preparaciones de miocitos cardiacos, sin embargo si se cuenta con cierta información que nos puede ayudar a entender el efecto observado.

Como se mencionó previamente, el diazóxido actúa sobre los canales de potasio sensibles a ATP, promoviendo su apertura, la cual, se ha descrito, conduce a la entrada de iones de potasio en las mitocondrias y tiende a disipar el potencial de membrana establecido por la bomba de protones. Por otro lado, diversos grupos han establecido que el diazóxido reduce la concentración de calcio en las mitocondrias de miocitos neonatales mientras que el 5-HD inhibe esta reducción lo que indica que este mecanismo es mediado por la apertura del canal de potasio sensible a ATP (Holmuhamedov y col., 1998; Holmuhamedov, Wang y Terzic, 1999).

Así también, Wang y Ashraf en 1999 describieron en corazones de ratas adultas que la apertura del canal  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  disminuyó la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria, la cual se atribuyó a una despolarización parcial (aproximadamente de 10 a 24 mV) del potencial de membrana mitocondrial.

Por su parte, Holmuhamedov y col., 1999 en un modelo de mitocondrias cardiacas aisladas, demostraron que la despolarización de la membrana mitocondrial causaba la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias.

En base a estos hallazgos se ha sugerido (Korotkov y col., 2005) que la inhibición de la respiración de las mitocondrias aunado a un aumento de la permeabilidad de la membrana interna en presencia de diazóxido induce la despolarización parcial de la membrana mitocondrial y, por lo tanto, disminuye marcadamente la acumulación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz, protegiendo las mitocondrias de la sobrecarga de calcio. Esta disminución en la entrada de calcio se explica por el hecho de que la recaptura de calcio mitocondrial es llevada a cabo a través del uniportador de calcio impulsada por el potencial de la membrana interna mitocondrial.

Los trabajos iniciales sobre la biología mitocondrial (Carafoli y col., 1971, Williams y col., 2013) sugirieron que el calcio es un factor importante que regula la función mitocondrial. Investigaciones en diversos tejidos incluyendo musculo cardíaco, han apoyado la posibilidad de que la mitocondria también actúe como un importante y dinámico amortiguador fisiológico para calcio.

Se ha demostrado que las mitocondrias son centrales en la señalización del calcio celular y contribuyen a la dinámica del calcio intracelular en virtud de su capacidad amortiguadora de calcio dependiente del potencial de membrana y su proximidad física a los sitios de liberación de calcio del RS (Holmuhamedov y col., 2002). Por todo esto, la mitocondria se ha descrito como activador o desactivador de canales de la membrana plasmática que son regulados por cambios en las concentraciones de calcio que tiene como consecuencia restringir las señales de calcio a dominios celulares específicos.

Parekh (1998) propuso que existen varios mecanismos reguladores que sirven para controlar la actividad del canal activado por la liberación de calcio o mejor conocido como el sistema SOCE, en los que la mitocondria juega un papel importante; ya sea por cambiar el potencial de membrana; así la hiperpolarización incrementa el gradiente eléctrico favoreciendo el influjo de calcio, mientras que la despolarización disminuye la fuerza conductora y por lo tanto reduce la entrada de calcio. Por otro lado, se ha mencionado que los SOCE son fuertemente inactivados por calcio de modo que la extensión y duración de SOCE depende de la habilidad de las mitocondrias cercanas y de otros sistemas de extrusión para remover los microdominios de calcio alrededor de los SOCs y evitar así la inactivación por retroalimentación negativa del mismo calcio entrante. La conveniencia de que las mitocondrias estén cerca de la PM para esta regulación de los SOCs se vio respaldada por datos que muestran que la reubicación de las mitocondrias lejos de la PM en las células Hela redujo significativamente la SOCE (Demaurex y col., 2009).

En linfocitos T, Holmuhamedov y col., (2002) demostraron que la apertura del sistema SOCE así como la tasa y magnitud del influjo de calcio a través de esos canales de calcio operados por almacenamiento son determinados por el status mitocondrial, concluyendo así que una absorción de calcio dependiente

de las mitocondrias energizadas reduce el calcio citosólico en la proximidad de los canales de calcio que forman parte del sistema SOCE, promoviendo la apertura del canal. Por otra parte, en células con mitocondria de-energizada se observó una reducida recaptura de calcio mitocondrial promoviendo una elevación de la concentración de calcio libre manteniendo con ello cerrados a los canales operados por almacenamiento debido a la inactivación dependiente de calcio de la corriente de calcio que ingresa por dichos canales.

El estudio de Valero y col. (2008) demostró el control de SOCE por la mitocondria en diversos tipos de células incluyendo las células de carcinoma de colon y las Jurkat. Ellos observaron que la despolarización mitocondrial inducida por un desacoplador de la cadena de transporte de electrones como el salicilato, inhibió la recaptura de calcio por la mitocondria, así como la entrada de calcio por el sistema SOCE, lo cual demostró una fuerte dependencia de la recaptura del calcio mitocondrial y de SOCE con los pequeños cambios en el potencial de membrana mitocondrial, concluyendo que la falta de recaptura de calcio mitocondrial lleva a una inactivación dependiente de calcio de SOCE.

En otra línea celular endotelial (EA.hy926), las mitocondrias impidieron la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  justo debajo de la membrana plasmática. Al mantener una baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos sitios, Parekh y col., (2005) sugirieron que las mitocondrias mantienen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS evitando la inactivación de los canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho, la despolarización mitocondrial con protonóforos como el FCCP o antimicina A redujo sustancialmente el tamaño de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmica después de la re-admisión de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células tal y como se observó en el presente trabajo.

El canal de calcio asociado al uniportador de calcio mitocondrial se ha considerado como un rectificador entrante, haciendo esto especialmente efectivo para la recaptura de calcio dentro de la mitocondria energizada (Valero y col., 2008). Esto es posible gracias al enorme potencial de membrana mitocondrial y debido a que el calcio es un catión divalente presente a extremadamente bajas concentraciones (100 nM) en la mitocondria en reposo, por lo tanto, es termodinámicamente posible que incluso pequeñas caídas en el potencial de membrana pueden influenciar dramáticamente el incremento de la concentración de calcio mitocondrial alcanzado durante la estimulación celular. Es por ello que al ser despolarizada la membrana mitocondrial por exposición al diazóxido después de la depleción del almacén, la subsecuente re-admisión de calcio generó una señal de calcio más pequeña, como se observa en las figuras 12 y 13.

Por otro lado, los mecanismos de manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  de diferentes organelos subcelulares están estrechamente relacionados entre sí y están sujetos a que exista un entrecruzamiento.

Según esta visión, no sería sorprendente que STIM1 pudiera interactuar con las mitocondrias para transmitir información sobre el estado de llenado de calcio del RS (Alonso y col., 2012), aunque eso sólo puede formularse como una posible hipótesis, lo que sí se sabe es que hay un contacto cercano entre mitocondrias y RS donde el  $\text{Ca}^{2+}$  podría reciclarse entre ambos orgánulos (Arnaudeau y col., 2001; Csordas y col., 2010; Rizzuto y col., 2009, 1998).

La recaptura de calcio en mitocondrias cardiacas puede ser importante en controlar el balance entre demanda-oferta de energía (vía activación de deshidrogenasas) protegiendo a los miocitos de la sobrecarga de calcio y mediar las vías de muerte celular (necrosis o apoptosis), por lo que, cuando existe un desajuste en el potencial de la membrana interna mitocondrial, como sucede en presencia del diazóxido, la mitocondria se protege de ser sometida a una sobrecarga de calcio que no sería capaz de manejar evitando de esta forma su entrada a la célula.

#### **9.4 Mecanismos que regulan el efecto del diazóxido sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales.**

Trabajos previos muestran que el diazóxido y otros abridores del canal  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  aumentan la producción de ROS por las mitocondrias y que éstos a su vez activan la proteína quinasa C (Korotrov y col., 2006, Forbes y col., 2001; Oldenburg y col., 2003; Pasdois y col., 2008). El aumento moderado de la producción de ROS se ha relacionado con efectos protectores durante el preconditionamiento farmacológico (Murphy y Steenbergen, 2008). La aplicación de “atrapadores” de ROS durante el pre-condicionamiento evita el efecto protector contra la isquemia (Forbes y col., 2001; Halestrap y col., 2007). Los niveles de calcio citoplasmáticos basales en presencia de diazóxido y NAC no mostraron diferencia significativa con respecto a sus controles. Esto puede deberse a que los ROS no sean los mediadores de estos efectos, o también a que el efecto sea mediado por cierto tipo de ROS como el superóxido y se requiera de atrapadores de ROS específicos como el Tiron, ya que el NAC actúa fundamentalmente sobre el peróxido.

Por otro lado, estudios previos (Garlid y col., 2003) han demostrado que el diazóxido es un abridor selectivo de los canales  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  por lo que varios de los efectos cardioprotectores del diazóxido son atribuidos a la apertura del mismo. Nuestros resultados, en relación al manejo del calcio citoplasmático basal, no se modificaron en presencia de 5-HD, el bloqueador selectivo del  $\text{mK}_{\text{ATP}}$ . Para este resultado negativo con el 5HD no tenemos una explicación directa, sin embargo, existe un desacuerdo sobre si el diazóxido ejerce o no sus efectos a través de la apertura del canal  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  o mediante algún mecanismo alternativo (Garlid y col., 2012). Se ha demostrado que el diazóxido y otros muchos abridores de canales  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  tienen efectos no específicos sobre las mitocondrias, incluyendo desacoplamiento e inhibición de

componentes de la cadena respiratoria, especialmente de la succinato deshidrogenasa (Garlid y col., 2012). Así mismo, otros grupos de investigación tampoco han encontrado un efecto inhibitor del 5-HD sobre el efecto del diazóxido, especialmente cuando el rendimiento hemodinámico del corazón se usa para evaluar la recuperación en estudios de isquemia / reperfusión (Lim y col., 2002). En segundo lugar, al realizar la medición del volumen de la matriz de las mitocondrias aisladas de los corazones tratados con 5-HD se observó que el 5-HD aumentó, en lugar de disminuir, el volumen, lo contrario de lo que podría esperarse para un bloqueador de canales mitoK<sub>ATP</sub> (Lim y col., 2002). En tercer lugar, la especificidad de 5-HD para el canal mitoK<sub>ATP</sub> sobre el canal K<sub>ATP</sub> sarcolemal es controvertida y el fármaco podría estar ejerciendo efectos a través de la inhibición de este último.

En síntesis, los efectos de agentes como el diazóxido se podrían explicar alternativamente por su capacidad para inhibir la succinato deshidrogenasa y posiblemente otros componentes de la cadena respiratoria (Kowaltowski y col., 2001, Lim y col., 2002), lo que también podría estar generando un desacople mitocondrial.



## 10.0 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

- El diazóxido (100uM) produjo una disminución significativa del calcio intracelular en miocitos cardíacos adultos. Este resultado es novedoso en la literatura del área.
- El diazóxido genera una disminución de los niveles de calcio citoplasmáticos de manera casi inmediata la cual se mantiene en al menos un lapso de 90 min.
- El diazóxido no modifica los niveles de calcio almacenados en el retículo sarcoplásmico ni la velocidad de extrusión del calcio citoplasmático por el intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ .
- El calcio que entra al citoplasma después de la activación de SOCE disminuye significativamente en células incubadas con diazóxido, así como la tasa de entrada del mismo. Este resultado es novedoso en células excitables.
- El efecto del diazóxido sobre los niveles de calcio citoplasmáticos basales no fue inhibido por el NAC ni por el 5HD.

## 11.0 BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ Alonso M. T., Manjarrés I. M., y García-Sancho J. 2012. Privileged Coupling between Ca (2+) Entry through Plasma Membrane Store-Operated Ca(2+) Channels and the Endoplasmic Reticulum Ca(2+) Pump. *Molecular and Cellular Endocrinology* 353 (1-2):37-44.
- ❖ Allen R. G. and Tresini M. 2000. Oxidative Stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28(3): 463-99.
- ❖ Parekh A.B. 1998. Slow Feedback Inhibition of Calcium Release-activated Calcium Current by Calcium Entry. *The Journal of biological chemistry.* 273 (24):14925–14932
- ❖ Ardehali,H. and O'Rourke,B. 2005. Mitochondrial K (ATP) channels in cell survival and death. *J. Mol. Cell Cardiol.* 39(1):7-16.
- ❖ Arias del Val Jessica. Regulación de la homeostasis del calcio celular por MCU, 2013.
- ❖ Aronsen JM, Louch WE, Sjaastad I. 2015. Cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics: Clinical perspectives. *Scandinavian Cardiovascular Journal.* 50(2):65-77.
- ❖ Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV Jr, Demaurex N. 2001. Mitochondria recycle Ca<sup>2+</sup> to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J. Biol. Chem.* 276 (31): 29430–29439.
- ❖ Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A and Cervellati C. 2004. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des,* 10(14):1611-1626.
- ❖ Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 79 (4):1127–1155.
- ❖ Berridge MJ. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature.* 361(6410):315-325.
- ❖ Brini M, Carafoli E. 2011. The Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (2):41-68.
- ❖ Cahalan MD. 2009. STIMulating store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Nat.Cell Biol.* 11 (6):669-677.
- ❖ Cámara Navarro Y. 2005. "Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno", 1-67.
- ❖ Carafoli E, Lehninger AL.1971. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem J* 122(5):681–690.
- ❖ Catterall WA. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(8):39-47.
- ❖ Csordás G, Várnai P, Golenár T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnóczky G. 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell.* 39 (1): 121-132.

- ❖ Csordás G, Várnai P, Golenár T, Sheu SS, Hajnóczky G. 2012. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol.* 353 (1-2):109-113.
- ❖ De la Fuente S, Fonteriz RI, de la Cruz PJ, Montero M, Alvarez J. 2012. Mitochondrial free  $[Ca^{2+}]$  dynamics measured with a novel low- $Ca^{2+}$  affinity aequorin probe. *Biochem J.* 445(3):371-376.
- ❖ Demaurex N, Poburko D, Frieden M. 2009. Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1787 (11):1383–1394.
- ❖ Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. 2012. Mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake contributes to buffering cytoplasmic  $Ca^{2+}$  peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(32):12986–12991.
- ❖ Marieb E.N. 2003. Essentials of human anatomy and physiology. San Francisco Benjamin Cummings, 7° edición, 1237.
- ❖ Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. 2017. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research.* 121(2):181-195.
- ❖ Fogal B, McClaskey C, Yan S, Yan H, Rivkees SA. 2010. Diazoxide Promotes Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Myelination. *PLoS One.* 5(5), e10906.
- ❖ Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. 2001. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88(8):802–809.
- ❖ Garlid KD. 2000. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol.* 95(4):275-9.
- ❖ Garlid KD and Halestrap AP. 2012. The mitochondrial K(ATP) channel--fact or fiction? *J Mol Cell Cardiol.* 52(3):578-83.
- ❖ Garlid KD, Paucek P. 2003. Mitochondrial potassium transport: the  $K^+$  cycle. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1606(1-3): 23– 41.
- ❖ González G, Zaldívar D, Carrillo ED, Hernández A, García MC, and Sánchez JA. 2010. Pharmacological preconditioning by diazoxide downregulates cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Br J Pharmacol.* 161(5):1172–1185.
- ❖ Goodman y Gilman 2011. The pharmacological basis of therapeutics. Treatment of myocardial ischemia. McGraw-Hill, 12° edición, 823-844.
- ❖ Groenedyk J., Michalak M. 2005. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim pol.* 52(2):381-95.
- ❖ Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. 2007. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1767(8): 1007–1031.

- ❖ Hansford RG. 1994. Physiological role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport. *J Bioenerg Biomembr.* 26 (5): 495-508.
- ❖ Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90: 291e366.
- ❖ Holmuhamedov, E.L., Wang, L., and Terzic, A. 1999. ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel openers prevent  $\text{Ca}^{2+}$  overload in rat cardiac mitochondria. *J. Physiol* 519 Pt 2:347-360.
- ❖ Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, Holmuhamedova M, Jahangir A, Terzic A. 2002. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *The FASEB Journal.* 16(9):1010-6.
- ❖ Holmuhamedov E, Jovanovic S., Dzeja P. P., Jovanovic, A., and Terzic A. 1998. Mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels modulate cardiac mitochondrial function. *American Journal of Physiology*, 275 (5 Pt 2):1567–1576.
- ❖ Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 89(7):1145–1153.
- ❖ Kaftan EJ, Ehrlich BE, Watras J. 1997. Inositol 1,4,5-Trisphosphate (InsP3) and Calcium Interact to Increase the Dynamic Range of InsP3 Receptor-dependent Calcium Signaling. *J Gen Physiol.* 110 (5): 529–538.
- ❖ Katoh H, Nishigaki N, Hayashi H. 2002. Diazoxide opens the mitochondrial permeability transition pore and alters  $\text{Ca}^{2+}$  transients in rat ventricular myocytes. *Circulation.* 105(22):2666-71.
- ❖ Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham D.E. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 427 (6972):360–364.
- ❖ Kockskamper J., Sheehan K. A., Bare D. J., Lipsius S.L., Mignery G.A., Blatter L.A. 2001. Activation and propagation of  $\text{Ca}^{2+}$  release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J*, 81(5): 2590-605.
- ❖ Korotkov S.M., Nesterov V.P., Ryabchikov N.N. 2005. Study of the mechanism of action of diazoxide on rat heart mitochondria under calcium loading. *Biochemistry and Biophysics.* 408:133–137.
- ❖ Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. 2001. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:649–657.
- ❖ Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (11):39-96.

- ❖ Lawrence CL, Billups B, Rodrigo GC and Standen NB. 2001. The KATP channel opener diazoxide protects cardiac myocytes during metabolic inhibition without causing mitochondrial depolarization or flavoprotein oxidation. *Br J Pharmacol.*134(3): 535-42.
- ❖ Lehninger AL, Rossi CS, Greenawalt JW. 1963. Respiration-dependent accumulation of inorganic phosphate and Ca ions by rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 10: 444–448.
- ❖ Lim K.H., Javadov S.A., Das M., Clarke S.J., Suleiman M.S., and Halestrap A.P. 2002. The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *J. Physiol* 545:961-974.
- ❖ Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J. 2001. Pharmacological comparison of native mitochondrial K (ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol.* 59:225-30.
- ❖ Lytton J. 2007. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem J.* 406 (3): 365–382.
- ❖ Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL, Stefanescu C, Chirita R. 2013. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatria Danubina.* 25 (4):401-409.
- ❖ McCormack JG and Denton RM. 1990. The role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and matrix Ca<sup>2+</sup> in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1018 (2-3):287-291.
- ❖ Meissner G. 1986. Ryanodine activation and inhibition of the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 261 (14):6300-6306.
- ❖ Murata M., Akao M., O'Rourke B., and Marban E. 2001. *Circ. Res.* 89:891–898.
- ❖ Murphy E, Steenbergen C. 2008. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88(2):581-609.
- ❖ Oldenburg O, Yang XM, Krieg T, Garlid KD, Cohen MV, Grover GJ et al. 2003. P1075 opens mitochondrial KATP channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 35, 1035–1042.
- ❖ O'Rourke B, Blatter LA. 2009. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake: Tortoise or hare? *J Mol Cell Cardiol* 46(6):767–774.
- ❖ Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. 2000. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 87: 460–466.
- ❖ Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D, Sekler I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange. *PNAS.* 107(1):436–441.
- ❖ Parekh AB, Putney JW Jr. 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 85(2):757–810.

- ❖ Pasdois P, Beauvoit B, Tariosse L, Vinassa B, Bonoron-Adele S, Dos Santos P. 2008. Effect of diazoxide on flavoprotein oxidation and reactive oxygen species generation during ischemia-reperfusion: a study on Langendorff-perfused rat hearts using optic fibers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294: H2088–H2097.
- ❖ Patron M, Raffaello A, Granatiero V, Tosatto A, Merli G, De Stefani D, Wright L, Pallafacchina G, Terrin A, Mammucari C, Rizzuto R. 2013. The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *J Biol Chem.* 288 (15): 10750-10758.
- ❖ Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. 2004. Inositol 1,4,5- trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem.* 73:437–465.
- ❖ Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. 2008. The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1777 (7-8):808-816.
- ❖ Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science.* 280 (5370):1763–1766.
- ❖ Rizzuto R, Pozzan T. 2006. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 86 (1):369–408.
- ❖ Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiari P., Bononi A., De Stefani D., Giorgi C., Leo S., Rimessi A., Siviero R., Zecchini E., Pinton P.2009. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria when how and why. *Biochim. Biophys. Acta.*
- ❖ Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C.2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev Mol Cell Biol.* 13 (9):566-578.
- ❖ Thayer SA, Miller RJ.1990. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J Physiol* 425:85–115.
- ❖ Valero RA, Senovilla L, Núñez L, Villalobos C. 2008. The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium.* 44(3):259—269.
- ❖ Wang,Y. and Ashraf,M. 1999. Role of protein kinase C in mitochondrial KATP channel mediated protection against Ca<sup>2+</sup> overload injury in rat myocardium. *Circ. Res.* 84:1156- 1165.
- ❖ Williams GS, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ.2013. Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(26):10479-86.
- ❖ Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS.2006. Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol.* 174 (6):803–813.
- ❖ Zaugg M., Lucchinetti E., Uecker M., Pasch T., and Schaub M.C. 2003. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br. J. Anaesth.* 91:551-565.