

## **IV.RESULTADOS**

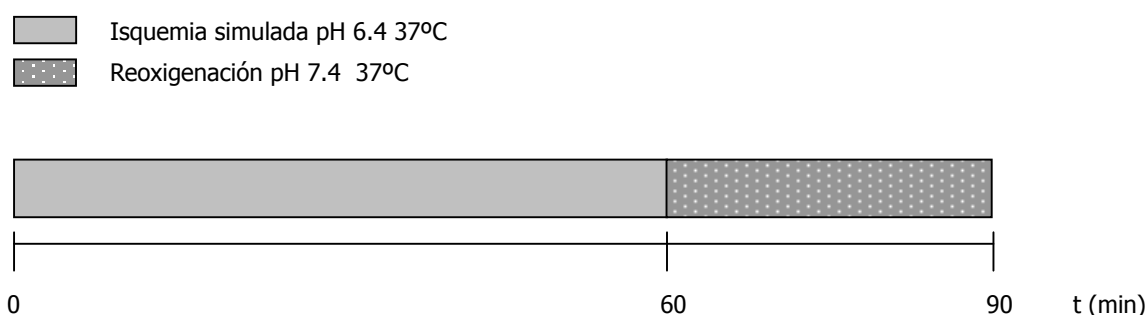


## IV. RESULTADOS

### A. ESTUDIOS CON CARDIOMIOCITOS HL-1

#### 1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ISQUEMIA SIMULADA Y POSTERIOR REOXIGENACIÓN

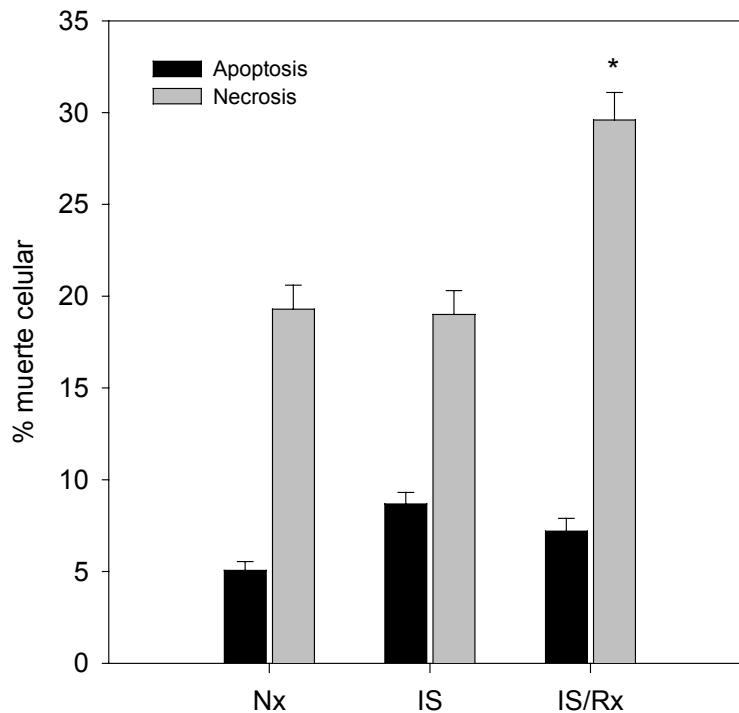
Todos los grupos estudiados en este apartado se sometieron al mismo protocolo: 60 minutos de isquemia simulada (IS) y 30 minutos de reoxigenación (Rx). La muerte celular se determinó mediante citometría de flujo y tinción con PI. Los resultados se representan como el % de células muertas respecto al total de células.



*Esquema del protocolo experimental*

##### 1.1. NECROSIS Y APOPTOSIS

La IS no indujo un aumento detectable de la muerte celular: la proporción de células necróticas (células PI+) fue similar a la observada en el grupo en condiciones normóxicas (figura 9). Sin embargo, la Rx se asoció a un abrupto aumento del número de células muertas. La muerte celular asociada a la Rx ocurrió durante los primeros minutos de Rx y se produjo por necrosis, ya que se apreció rotura del sarcolema. (células PI+). Cuando el período de Rx se prolongó hasta 2 horas el número de células necróticas no aumentó (datos no presentados). La apoptosis parece no contribuir significativamente a la muerte celular en este modelo: el número de células Anx+/PI- se mantuvo bajo y estable a lo largo de todo el protocolo experimental de IS/Rx.



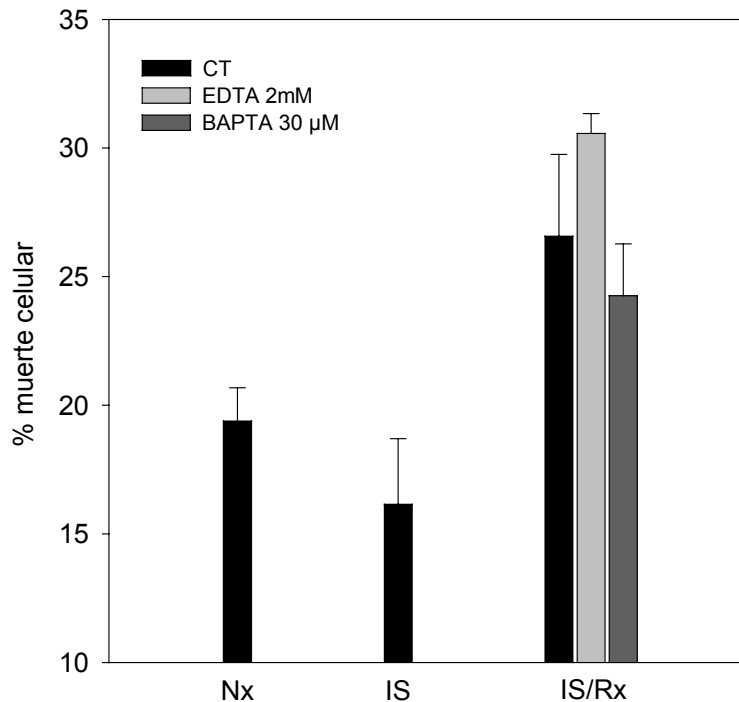
**Figura 9: Muerte celular apoptótica y necrótica en células HL-1 tras 60 minutos de IS y 30 minutos de Rx.** Durante los primeros minutos de Rx se produjo un aumento significativo de la muerte celular por necrosis. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 9 a 15 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.001$  vs Nx.

## 1.2. PAPEL DEL CALCIO EN EL DAÑO POR IS/RX

Para investigar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la muerte celular por IS/Rx:

- 1) Se eliminó el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular durante la Rx (sustituyendo el  $\text{CaCl}_2$  del tampón por EDTA 2 mM).
- 2) Se queló el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con BAPTA-AM 30  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos antes de iniciar el protocolo de IS/Rx.

La eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular o del medio intracelular no proporcionó ninguna protección frente la muerte celular por necrosis durante la Rx (figura. 10).

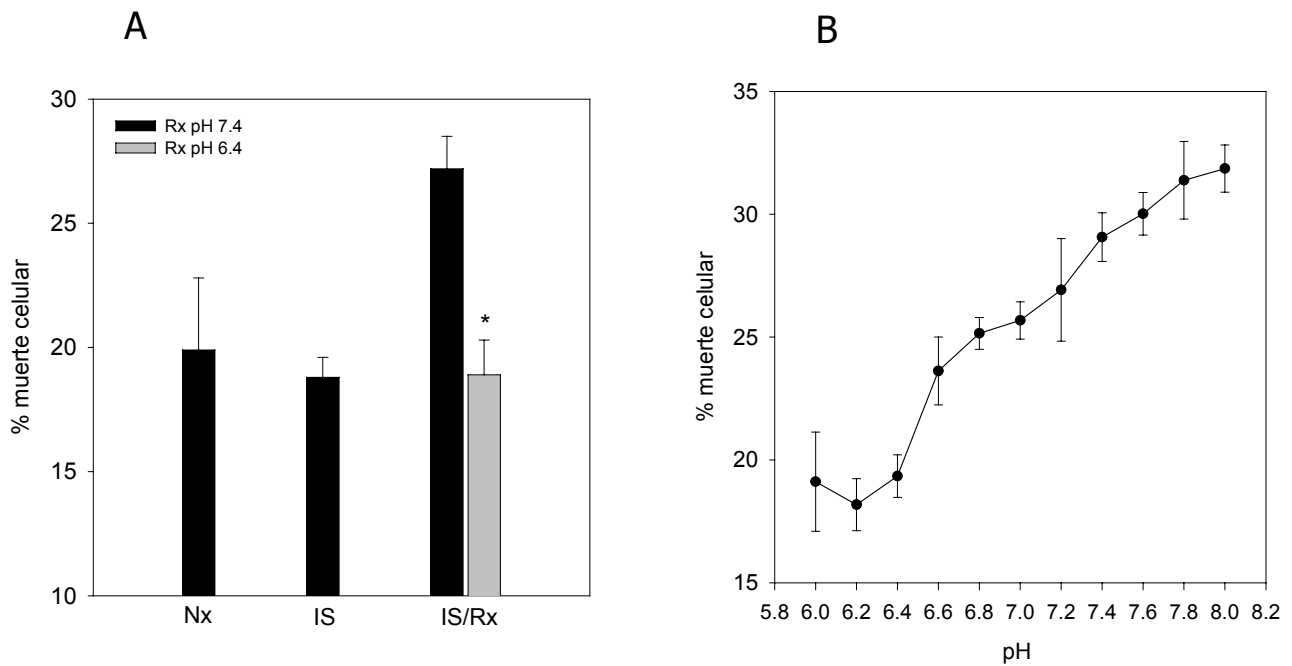


**Figura 10: Papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el daño por Rx.** La eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular (grupo EDTA) no redujo la muerte celular por necrosis asociada a la Rx. La eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (grupo BAPTA) tampoco previno el daño celular por Rx. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 2 a 5 experimentos realizados por triplicado.

### 1.3. PAPEL DEL pH EXTRACELULAR EN EL DAÑO POR IS/RX

Para estudiar el papel del pH sobre la muerte celular se comparó el efecto de la Rx a pH 6.4 versus la Rx a pH 7.4 sobre el número de células necróticas.

La Rx a pH 6.4 previno completamente la muerte celular por Rx (figura 11.A). Además, el efecto protector del pH ácido fue "dosis-dependiente" (figura 11.B).



**Figura 11: Efecto del pH extracelular en el daño por IS/Rx.**

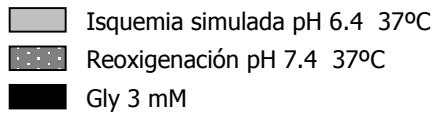
A) Muerte celular en cada grupo de tratamiento. B) Muerte celular durante la Rx a distintos pH. Tras 60 min de IS la Rx a pH 6.4 redujo de manera significativa la muerte celular por necrosis asociada a la Rx a pH 7.4. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 2 a 4 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.05$  versus IS/Rx pH 7.4

#### 1.4. EFECTO DE LA GLICINA SOBRE EL DAÑO POR IS/RX

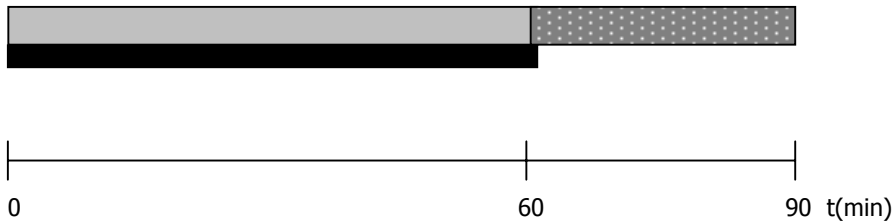
Se investigó el efecto de la glicina sobre la muerte celular en experimentos en los que este aminoácido fue añadido bien al medio de IS, bien al medio de Rx.

## Resultados

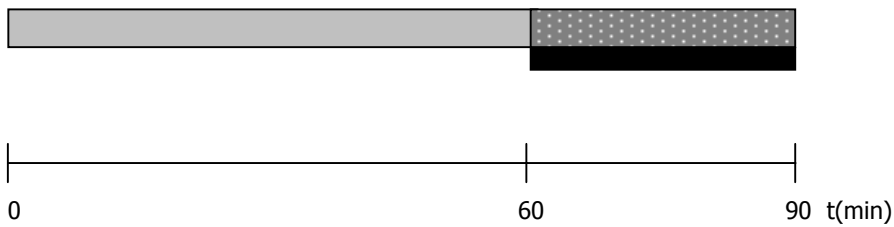
---



1)



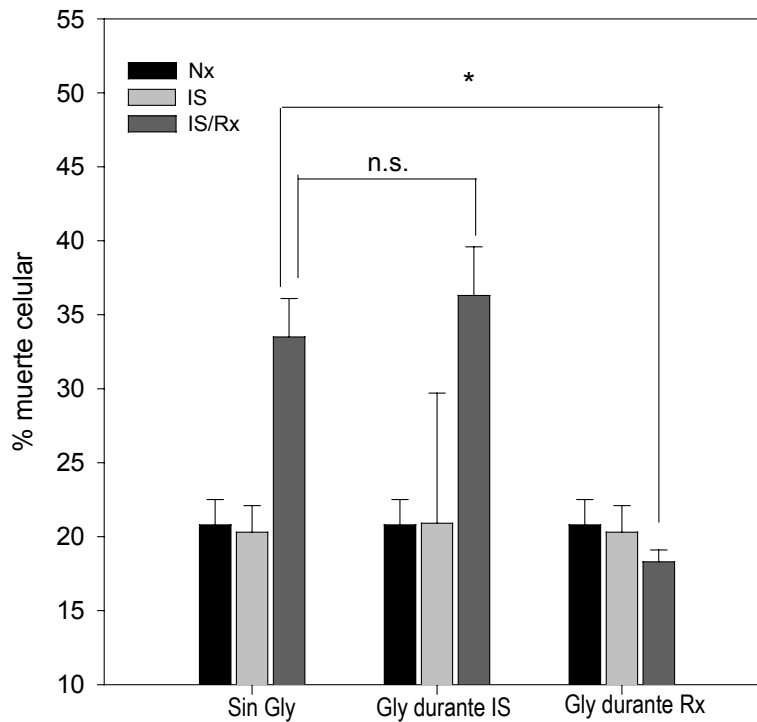
2)



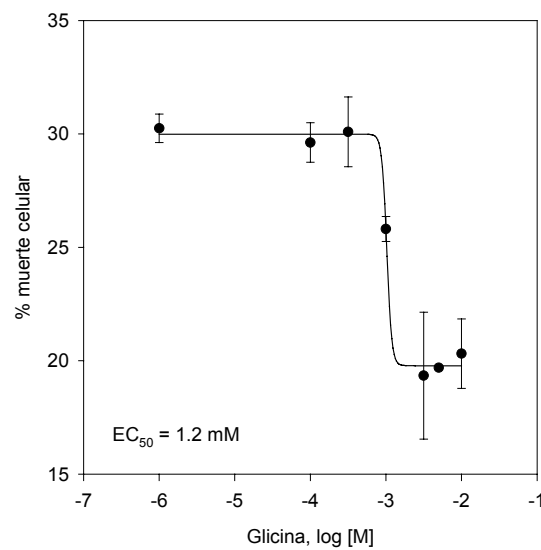
### *Esquema del protocolo experimental.*

La adición de glicina 3 mM durante la Rx previno totalmente la muerte celular dependiente de pH. Cuando la glicina estuvo presente durante la IS no se observó ningún efecto protector (figura 12.A). Además, el efecto protector de la glicina durante la Rx fue dosis-dependiente, con una  $EC_{50}$  de 1.2 mM (figura 12.B).

A



B



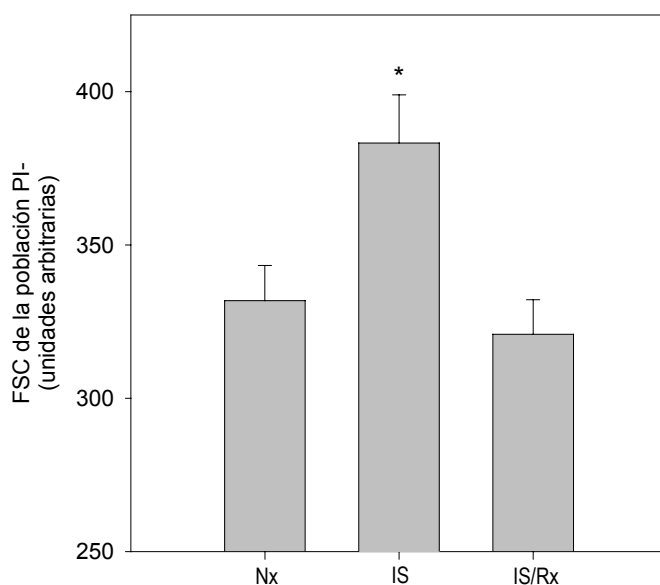
**Figura 12: Efecto de la glicina en la muerte celular por IS/Rx.** A) Muerte celular en cada grupo de tratamiento. B) Curva dosis-respuesta de la glicina aplicada durante la Rx. La adición de Gly 3 mM durante la Rx redujo de manera significativa la muerte celular asociada a la Rx, con un efecto claramente dosis-dependiente. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 8 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.001$  vs Rx sin Gly



## 2. EFECTO DEL pH Y DE LA GLICINA SOBRE LOS CAMBIOS EN EL VOLUMEN CELULAR DURANTE LA RX

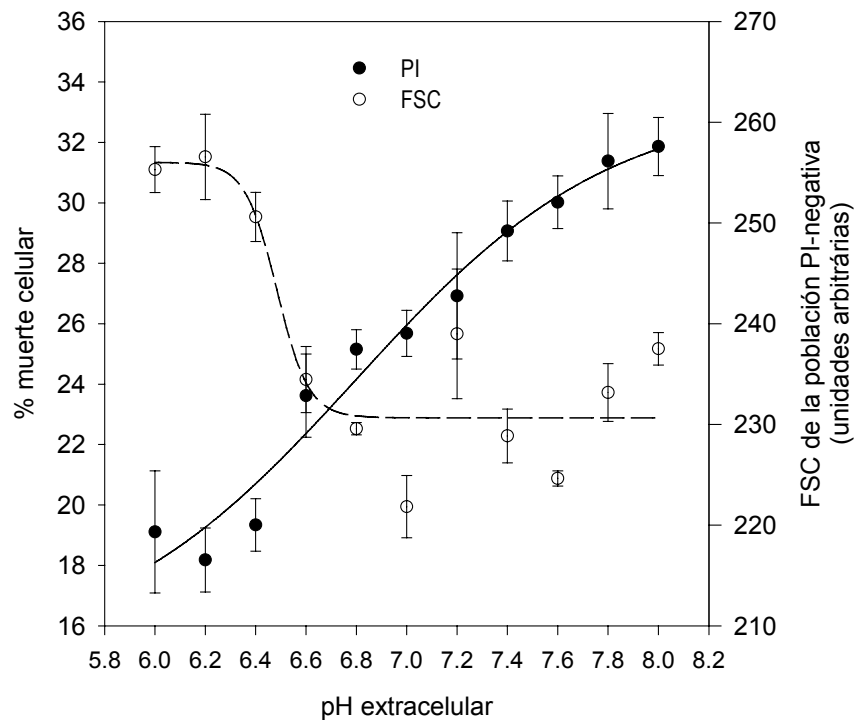
Los cambios en el volumen celular se determinaron en función de los parámetros de "forward" y "side scatter" obtenidos mediante el análisis de la población total de células, que se relacionaron, respectivamente, con el tamaño y la complejidad citoplasmática de dicha población. Los resultados se representan en unidades arbitrarias de "forward scatter" (FSC). Para evitar que la muerte celular influyera en el análisis de los efectos de los distintos tratamientos, el volumen celular se calculó a partir de la población de células viables.

La IS indujo un incremento significativo en el volumen celular (edema) mientras que la Rx se acompañó de una normalización del mismo (figura 13).



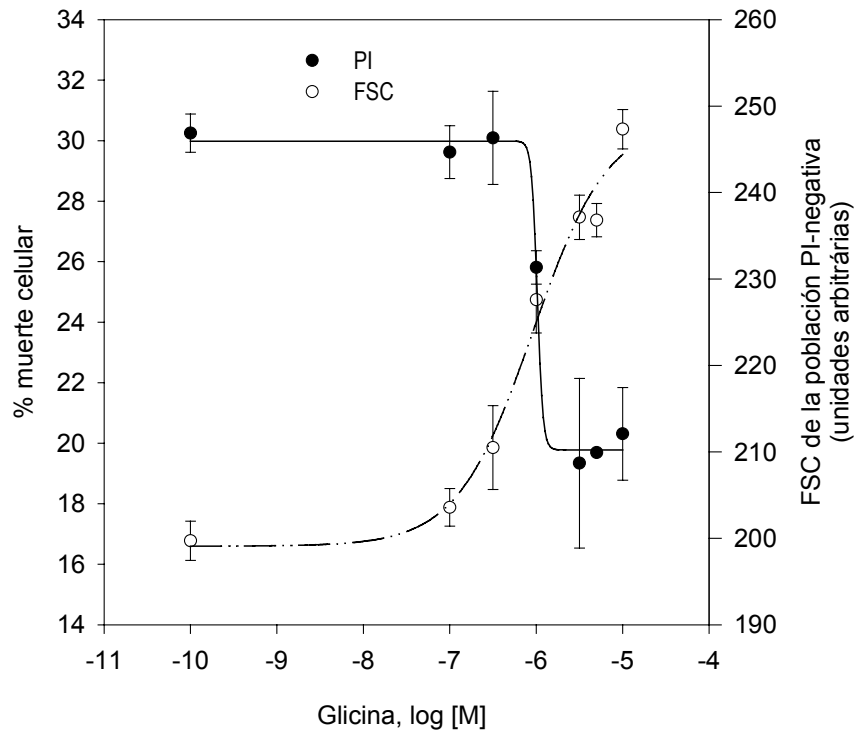
**Figura 13: Cambios en el volumen celular durante la IS/Rx.** Valores de FSC en células HL-1 tras 60 min de IS y 30 min de Rx en la población viable (PI). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 9 experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0.01$  vs Nx.

El efecto protector del pH ácido sobre la muerte celular se asoció a una disminución de la recuperación del volumen celular durante la Rx (figura 14). Los estudios dosis-efecto demostraron una relación inversa entre el grado de protección frente al daño celular y la magnitud de la reducción del volumen durante la Rx.



**Figura 14: Cambios en el volumen celular durante la IS/Rx.** Efecto del pH extracelular sobre el volumen (línea discontinua) y sobre la muerte celular (línea continua). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados por triplicado.

Al igual que el pH ácido, la presencia de glicina durante la Rx se asoció a una disminución de la recuperación del volumen celular, con una clara relación dosis-efecto (figura 15)

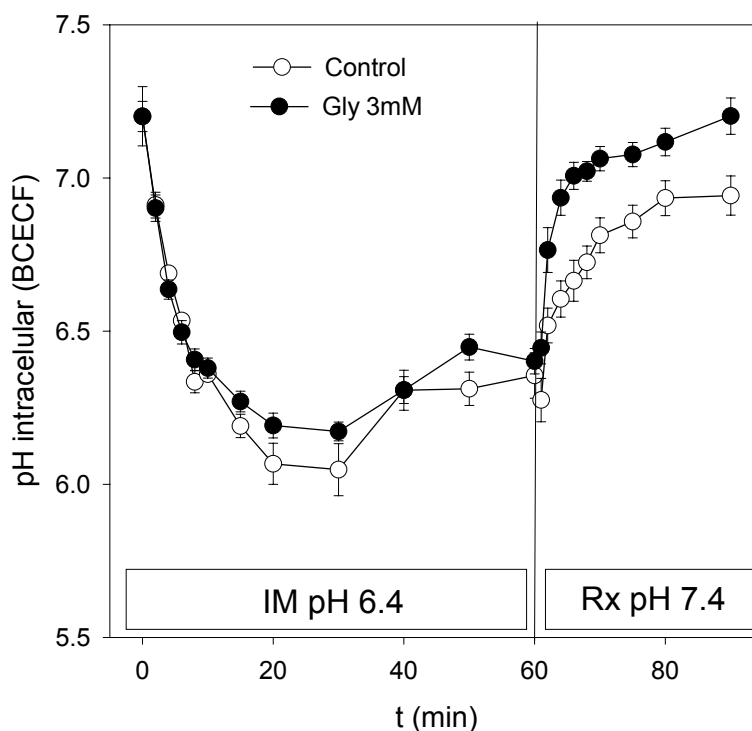


**Figura 15: Cambios en el volumen celular durante la IS/Rx.** Efecto de la glicina sobre el volumen celular (línea discontinua) y sobre la muerte celular (línea continua). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados por triplicado.

### 3. EFECTO DE LA GLICINA SOBRE EL pH Y EL Na<sup>+</sup> INTRACELULARES DURANTE LA IS/RX

Para comprobar si la glicina ejercía su efecto protector impidiendo la recuperación del pH intracelular durante la Rx, se monitorizaron los cambios de pH intracelular durante la IS/Rx mediante ratiofluorescencia por imagen.

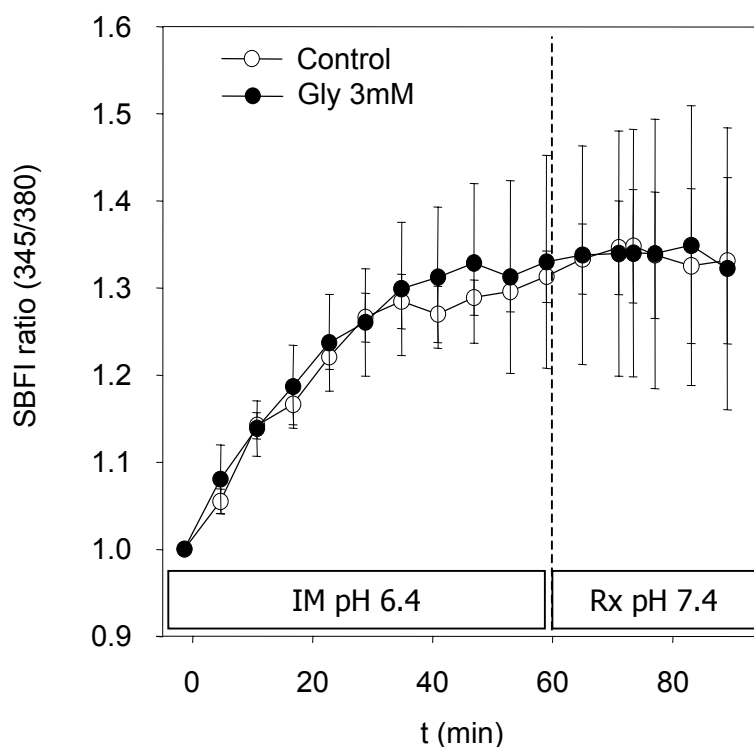
El pH intracelular disminuyó rápidamente desde el inicio de la IS hasta alcanzar valores próximos al del medio extracelular (pH 6.4). La Rx produjo una rápida normalización del pH intracelular hasta alcanzar valores fisiológicos (pH 7.2). La glicina no enlenteció la recuperación del pH intracelular (figura 16).



**Figura 16: Cambios en el pH intracelular durante la IS/Rx.** Efecto de la Gly sobre los cambios de pH intracelular en células HL-1 tras 60 min de IS y 30 min de Rx. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 7 a 8 determinaciones. El grupo tratado con Gly no presentó diferencias significativas respecto al grupo control.

Para comprobar si los efectos de la glicina sobre el volumen celular pudieran deberse a cambios en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , se monitorizó la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  durante la IS/Rx mediante ratiofluorescencia por imagen.

La concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  aumentó gradualmente desde el inicio de la IS y se mantuvo elevada durante los primeros minutos de Rx. La glicina no tuvo ningún efecto detectable sobre la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  (figura 17).



**Figura 17: Sobrecarga de  $\text{Na}^+$  durante la IS/Rx.** Efecto de la Gly sobre la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  en células HL-1 tras 60 min de IS y 30 min de Rx. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 a 6 determinaciones. El grupo tratado con Gly no presentó diferencias significativas respecto el grupo control.

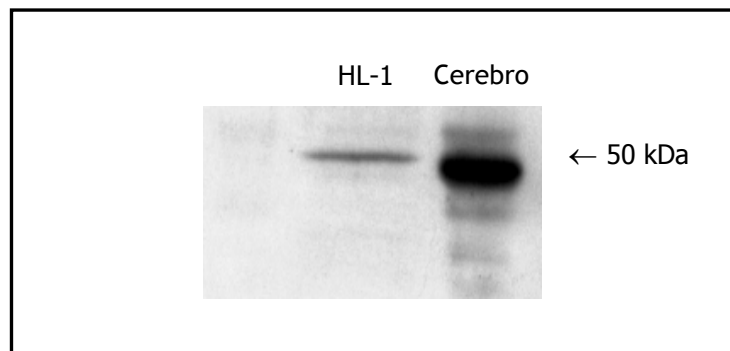
#### 4. PAPEL DEL RECEPTOR DE GLICINA

Teniendo en cuenta que la presencia del receptor de membrana de la glicina no ha sido descrita previamente en cardiomiocitos se investigó la posibilidad de que la glicina ejerciese su efecto protector a través de la activación de un receptor acoplado a un

canal de Cl<sup>-</sup>, similar al del SNC. Así, se determinó, en primer lugar mediante Western blot e inmunocitoquímica, la presencia de este receptor en las células HL-1, y posteriormente se estudió el papel del cloro extracelular en el efecto protector de la glicina durante la IS/Rx .

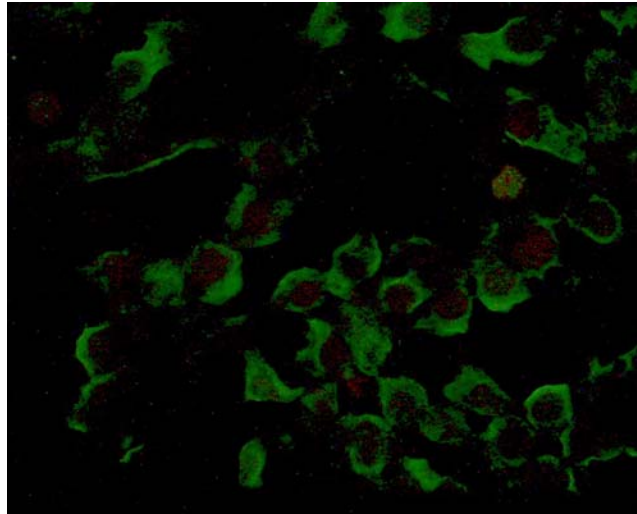
#### **4.1. DETERMINACIÓN DEL RECEPTOR POR WESTERN BLOT E INMUNOCITOQUÍMICA**

Mediante análisis por Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\alpha$  de 48 KDa del RGly de cerebro se pudo detectar una reacción específica en el extracto de células HL-1.



**Figura 18: Detección del RGly mediante Western Blot.** Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico (anti-GlyR-4a, dilución 1:500) y se cargaron 12.5  $\mu$ g de tejido en cada carril. La muestra de cerebro (homogenado de médula espinal y bulbo raquídeo) se utilizó como control positivo. Western blot representativo de resultados de, como mínimo, 3 preparaciones independientes.

Los estudios de inmunocitoquímica con este mismo anticuerpo confirman la presencia del receptor en la membrana plasmática de las células HL-1.



**Figura 19: Detección del R Gly mediante técnicas inmunocitoquímicas.**

Cultivo de células HL-1 teñidas con el anticuerpo monoclonal específico para la subunidad  $\alpha$  del R Gly (anti-GlyR MAb 4a) unido a FITC. Fotografía obtenida mediante microscopia confocal.

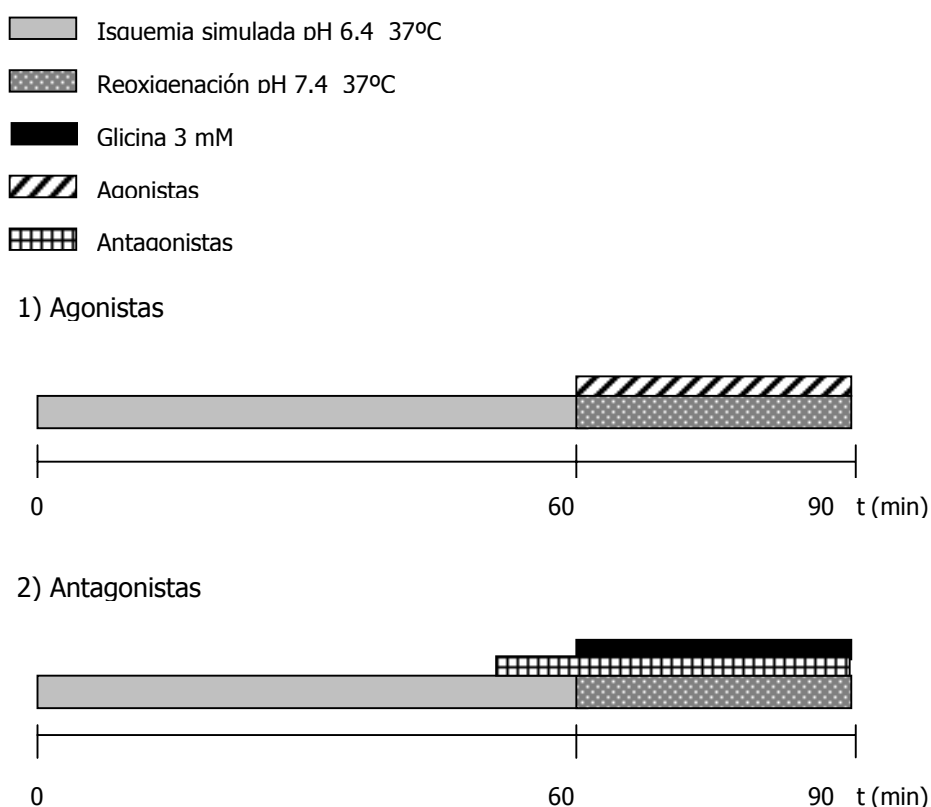
#### **4.2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA.**

Para investigar el potencial papel del R Gly en el efecto protector de este aminoácido durante la IS/Rx:

- 1) Se estudió el efecto protector de agonistas y antagonistas glicinérgicos en el daño por IS/Rx.
- 2) Se analizó el papel del cloro extracelular en el daño por IS/Rx.

4.2.1. EFECTO DE AGONISTAS-ANTAGONISTAS GLICINÉRGICOS EN EL DAÑO POR IS/RX.

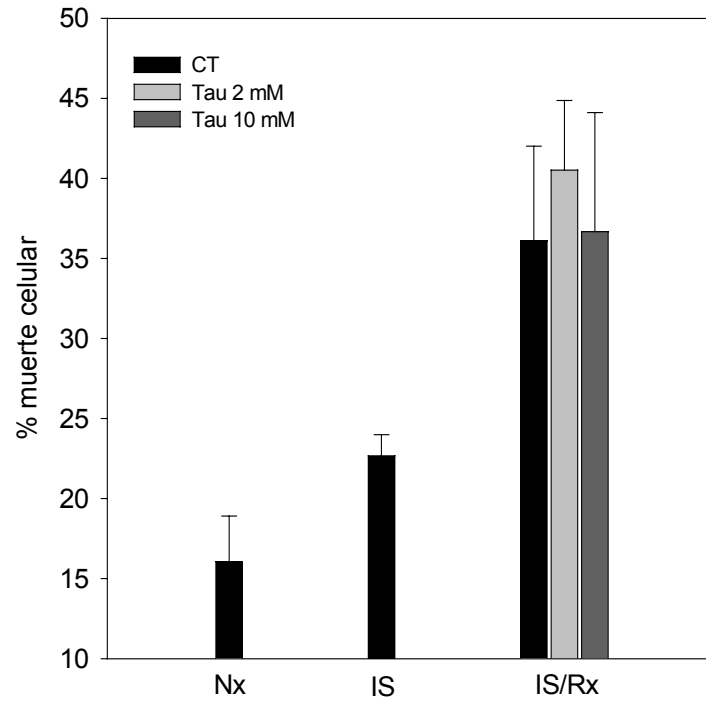
Se estudió la muerte celular por necrosis en células HL-1 sometidas a 60 minutos de IS y 30 minutos de Rx utilizando, por un lado, un agonista glicinérgico como la taurina, y por otro, utilizando antagonistas selectivos del receptor como la estricnina o el ginkgolide B y se estudió su interacción con la glicina.



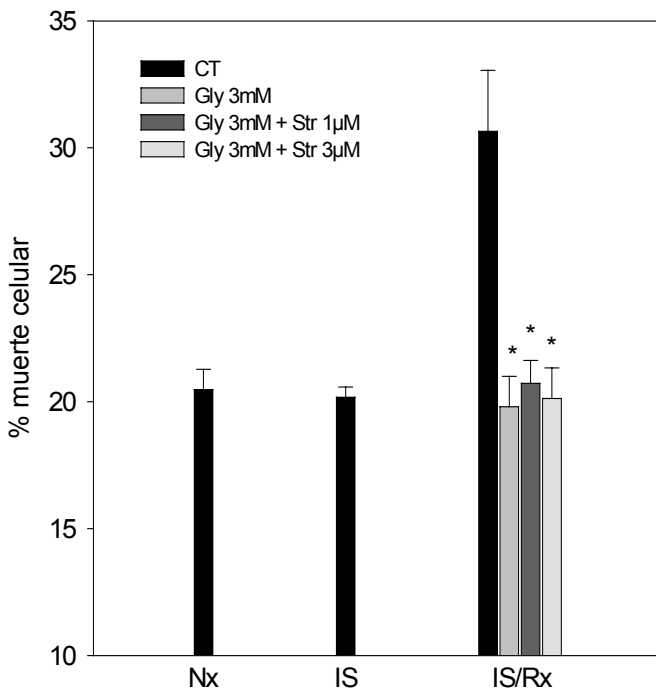
*Esquema del protocolo experimental*

La adición de taurina 2 y 10 mM durante la Rx, no proporcionó ninguna protección frente la muerte celular (figura 20.A). El bloqueo del RGly con estricnina 1 y 3  $\mu$ M (figura 20.B) o con BN-52021 10  $\mu$ M (figura 20.C) no fue capaz de inhibir el efecto protector de la glicina en el daño celular por Rx. Curiosamente, la estricnina a dosis elevadas (superiores a la dosis habitualmente utilizadas como antagonista) ejerció un efecto protector similar al ejercido por la glicina (figura 20.D). Además, este efecto protector fue "dosis-dependiente", con una  $EC_{50}$  de 400  $\mu$ M (figura 20.D).





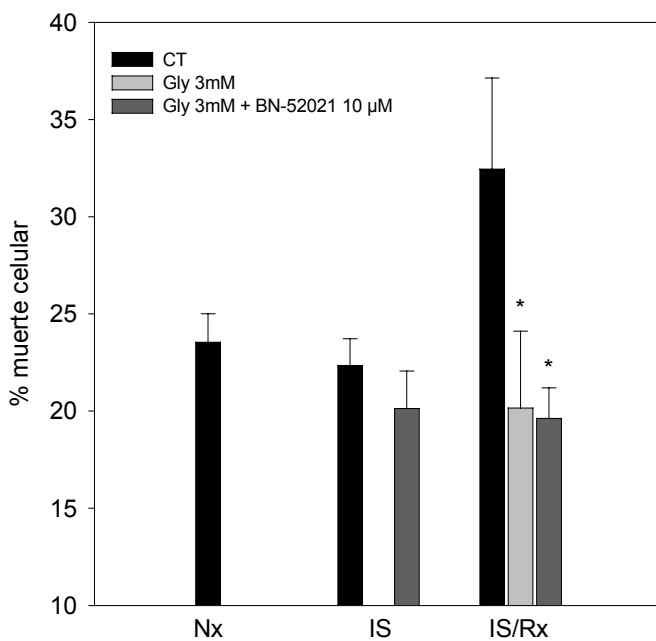
**Figura 20.A: Efecto de la taurina en la muerte celular por IS/Rx.** La administración de taurina, un agonista del RGly de SNC, a concentraciones de 2 y 10 mM durante la Rx no modificó de manera significativa la muerte celular durante la Rx respecto al grupo control. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados por triplicado.



**Figura 20.B: Acción de la estripcnina sobre el efecto protector de la glicina.**

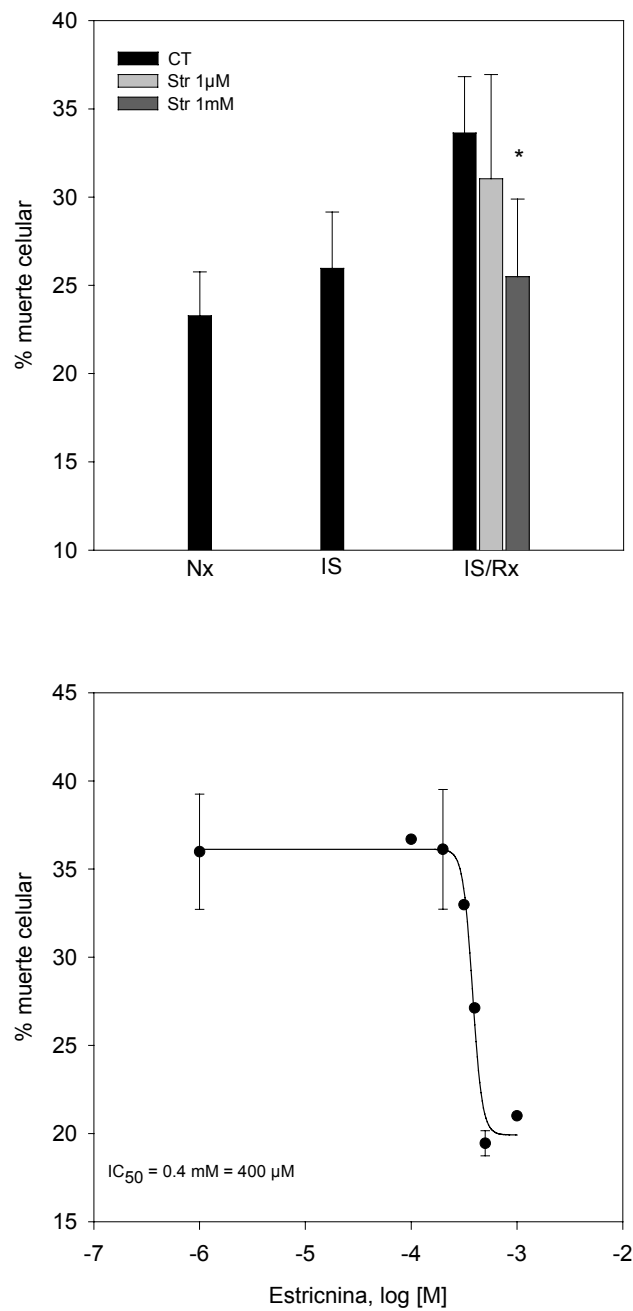
La administración de estripcnina, un antagonista competitivo del RGly de SNC, a concentraciones de 1 y 3 µM, conjuntamente con la Gly no antagonizó el efecto protector de la Gly en la muerte celular por IS/Rx. Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado.

\* p < 0.001 vs Rx del grupo CT



**Figura 20.C: Acción del BN-52021 (ginkgolide B) sobre el efecto protector de la glicina.**

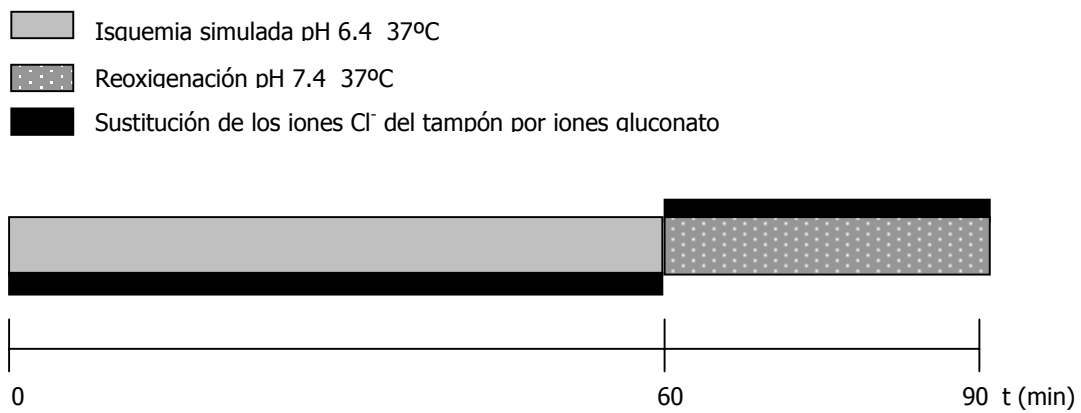
La administración de BN-52021, antagonista selectivo del RGly de SNC, a concentración 10 µM, conjuntamente con la Gly no antagonizó el efecto protector de la Gly en la muerte celular por IS/Rx. Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. \* p < 0.05 vs Rx del grupo CT.



**Figura 20.D: Efecto de la estricnina en la muerte celular por IS/Rx.** La administración de estricnina 1 mM redujo de manera significativa el daño celular tras IS/Rx, con un claro efecto dosis-dependiente. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 a 6 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.01$  vs Rx del grupo CT.

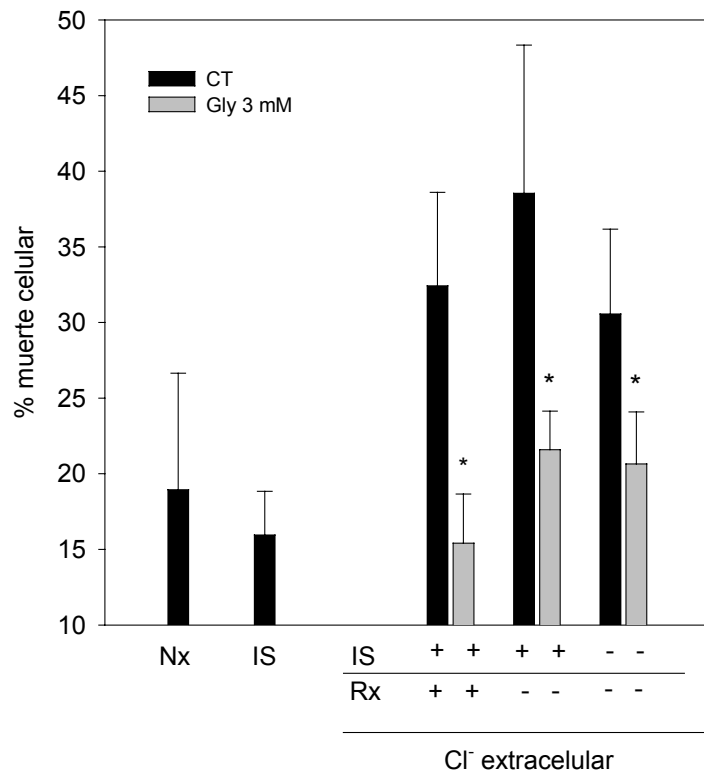
#### 4.2.2. PAPEL DEL CLORO EXTRACELULAR EN EL EFECTO PROTECTOR DE LA GLICINA.

Para comprobar si la protección ejercida por la glicina estaba mediada por la activación de canales de  $\text{Cl}^-$ , se estudió su efecto en un tampón libre de  $\text{Cl}^-$ . Para ello se sustituyeron los iones  $\text{Cl}^-$  del tampón por iones gluconato, un anión no permeable a los canales de  $\text{Cl}^-$  y se investigó si la eliminación del  $\text{Cl}^-$  del medio extracelular podía abolir el efecto protector de la glicina en el daño celular asociado a la Rx.



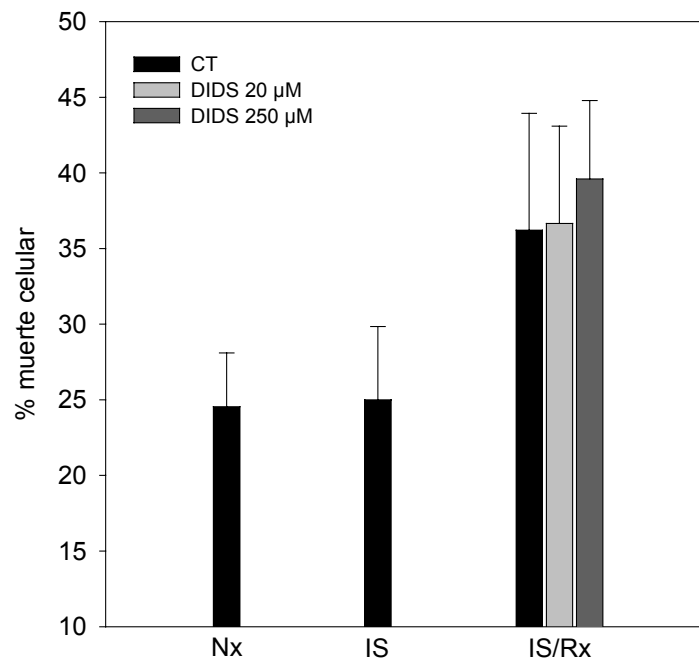
#### *Esquema del protocolo experimental.*

La eliminación del  $\text{Cl}^-$  extracelular no tuvo efectos significativos sobre el daño celular durante la Rx, siendo la glicina protectora incluso en ausencia de  $\text{Cl}^-$  extracelular (figura 21).



**Figura 21: Efecto de la eliminación del Cl<sup>-</sup> del medio extracelular sobre la muerte celular durante la IS/Rx.** Las células HL-1 se sometieron a 60 min de IS y 30 min de Rx en presencia o ausencia de Cl<sup>-</sup> extracelular (sustituyendo los iones Cl<sup>-</sup> por gluconato, a la misma concentración). La muerte celular durante la Rx en ausencia de Cl<sup>-</sup> fue similar a la observada durante la Rx en presencia de Cl<sup>-</sup>. En ambos casos se observó una reducción de la muerte celular durante la Rx cuando ésta se realizó en presencia de Gly 3 mM. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 a 4 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.05$  vs IS/Rx en presencia de Cl<sup>-</sup>

Para confirmar que los flujos de  $\text{Cl}^-$  no participan en el efecto protector de la glicina se realizaron experimentos adicionales en los que se bloqueó el flujo de  $\text{Cl}^-$  a través de otros transportadores y canales de  $\text{Cl}^-$  distintos del receptor. En estos estudios, las células se sometieron a un protocolo de IS/Rx en presencia de DIDS, un bloqueante inespecífico de canales de  $\text{Cl}^-$  de la membrana plasmática.



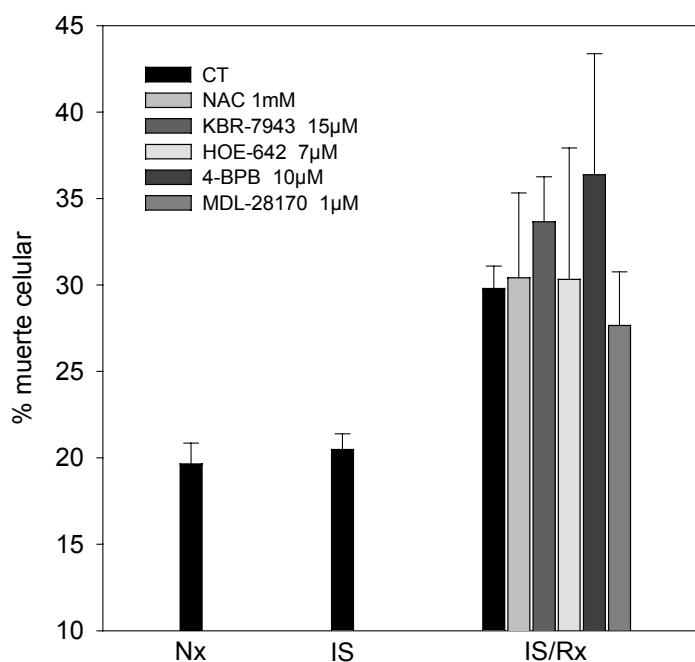
**Figura 22: Efecto del DIDS sobre el daño por IS/Rx.** El bloqueo de los canales de  $\text{Cl}^-$  durante la Rx no redujo el porcentaje de células necróticas. Los grupos tratados con DIDS durante la Rx no presentaron diferencias significativas respecto al grupo no tratado (CT). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados por triplicado

## **5. IMPLICACIÓN DE OTROS MECANISMOS DE ACCIÓN EN EL EFECTO PROTECTOR DE LA GLICINA.**

Para descartar que la muerte celular observada en las células HL-1 pudiera producirse por mecanismos que se han implicado en el daño por reperfusión en cardiomiocitos, se estudió el efecto de las siguientes intervenciones:

- 1) Inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (implicado en la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  que se produce durante la reperfusión), utilizando un inhibidor competitivo, el KBR-7943 a concentración 15  $\mu\text{M}$
- 2) Inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (implicado en la regulación del pH intracelular y en la modulación de los flujos iónicos de  $\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+$ ), utilizando HOE-642 a concentración 7  $\mu\text{M}$
- 3) Inhibición del estrés oxidativo utilizando compuestos con actividad antioxidante como la N-Acetil cisteína, a concentración 1 mM
- 4) Inhibición de enzimas implicados en la degradación de lípidos y proteínas utilizando inhibidores de la  $\text{PLA}_2$ , como la 4-BPB, a concentración 10  $\mu\text{M}$ , e inhibidores de la calpaína como el MDL-28170, a concentración 1  $\mu\text{M}$ .

En ninguno de los casos se obtuvo un efecto protector similar al obtenido con la glicina (figura 23).



**Figura 23: Efecto de otros compuestos en la muerte celular por IS/Rx.**

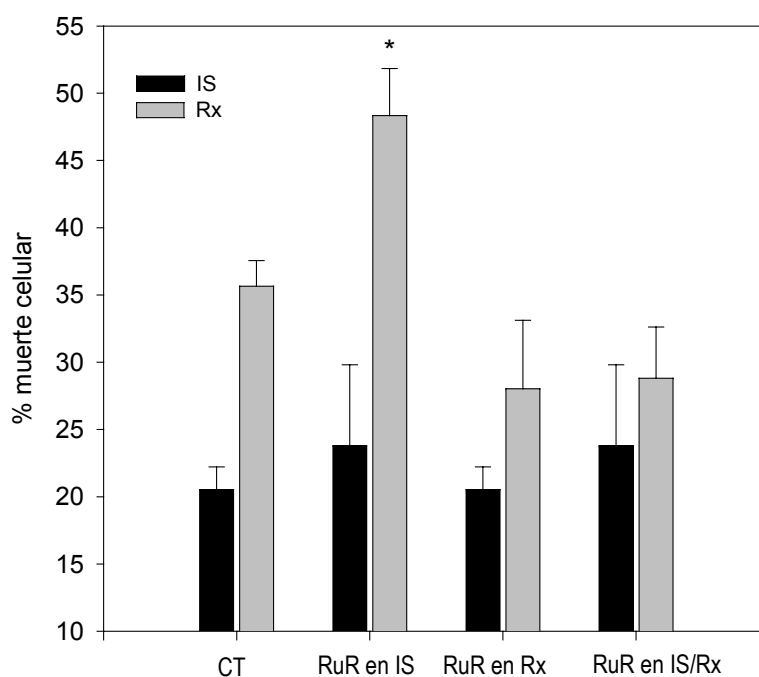
Efecto de distintas intervenciones que se han descrito como cardioprotectoras en el daño por reperfusión. Ninguno de los tratamientos aplicados fue capaz de prevenir la muerte celular por Rx. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados por triplicado.

## 6. EFECTO DEL RUTENIUM RED EN EL DAÑO POR IS/RX

Para evaluar la implicación del VDAC, el canal que determina la apertura del PTPm, en la muerte celular inducida por la Rx, se evaluó el efecto del RuR (un inhibidor del VDAC, que también interfiere en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la mitocondria (Gincel *et al.*, 2001) sobre la viabilidad celular.



La administración de RuR 20  $\mu\text{M}$  durante la Rx disminuyó el daño celular asociado a Rx, efecto que también se observó cuando el RuR se administró durante todo el protocolo experimental, aunque en ninguno de los dos casos la disminución del daño celular fue significativa. Por el contrario, la administración de RuR durante el período de IS no redujo la muerte celular asociada a la Rx, sino que indujo un aumento significativo del mismo (figura 24). Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que la muerte celular observada durante la Rx está relacionada con la apertura del PTPm y con la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, ya que el bloqueo del VDAC sólo es protector cuando el inhibidor está presente durante la Rx, período en el que las mitocondrias son vulnerables a permeabilizarse.



**Figura 24: Efecto del RuR en la muerte celular por IS/Rx.** La administración de RuR 20  $\mu\text{M}$  durante el período de Rx, así como durante todo el protocolo de IS/Rx, disminuyó el daño celular por Rx, aunque su efecto no llegó a ser significativo. La administración de RuR durante el período de IS incrementó significativamente el daño celular por Rx respecto al grupo control. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 4 a 6 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.05$  vs Rx del grupo CT.



## **7. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN CARDIOMIOCITOS**

### **HL-1**

Los principales resultados son:

- Se ha identificado un nuevo mecanismo de muerte celular aguda por reoxigenación independiente de la hipercontractura y de carácter mayoritariamente necrótico.
- Esta muerte celular se asocia a la normalización del pH y puede prevenirse con una reoxigenación ácida (paradoja del pH). Además esta regulada por un mecanismo independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.
- El efecto protector de la acidosis se asocia a un mayor volumen celular durante la reoxigenación porque se impide la recuperación del tamaño celular anormalmente aumentado durante la isquemia previa.
- La adición de glicina durante la reoxigenación es capaz de abolir la muerte celular asociada a la corrección del pH. Su efecto es dosis-dependiente, con una  $\text{EC}_{50}$  de 1.2 mM.
- El efecto protector de la glicina, al igual que la acidosis, se asocia a un mayor volumen celular durante la reoxigenación. En ambas estrategias se observó una relación inversa entre el grado de protección y la magnitud de la reducción del volumen celular durante la reoxigenación.
- El efecto citoprotector de la glicina no está relacionado con la modificación del pH o del  $\text{Na}^+$  intracelulares, ni con la prevención de la activación de fosfolipasas o proteasas o con la generación de radicales libres.
- Los cardiomiocitos HL-1 expresan un receptor de glicina en su membrana similar al receptor que se encuentra en SNC. Sin embargo, este receptor no parece estar implicado en el mecanismo de acción por el que la glicina ejerce su efecto protector, ya que la prevención de la muerte celular es independiente de los flujos de  $\text{Cl}^-$  ni puede estimularse con agonistas del receptor. Los antagonistas del receptor tampoco son capaces de bloquear el efecto citoprotector de la glicina.

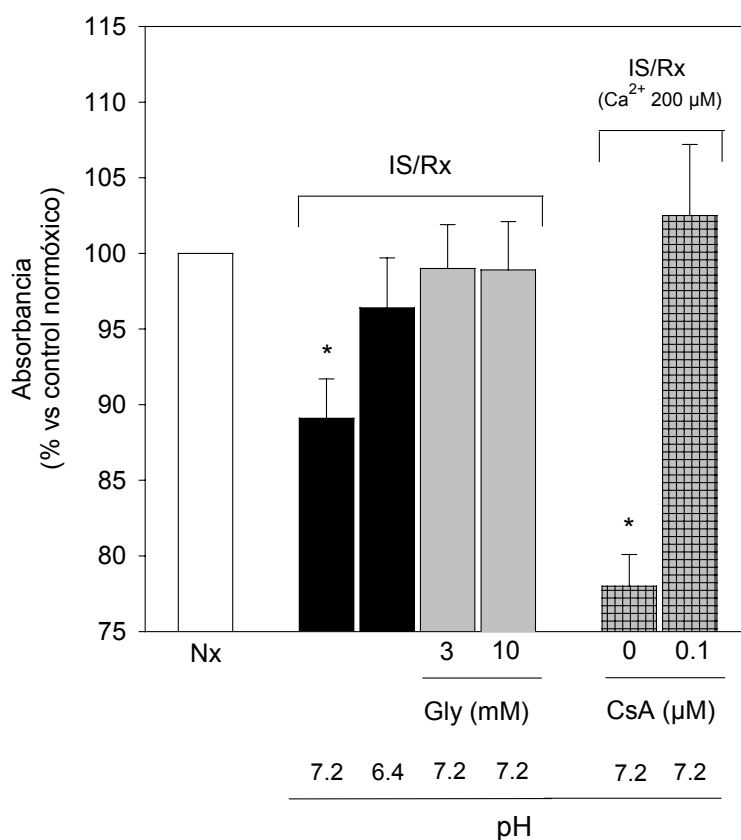
- La estricnina, antagonista del receptor de glicina en SNC, presenta un efecto protector dosis-dependiente frente al daño por reoxigenación similar al observado para la glicina, con una  $EC_{50}$  de 400  $\mu$ M.
- El bloqueo del VDAC, canal localizado en la membrana externa de la mitocondria e implicado en la apertura del PTPm, con Rutenium Red es capaz de reducir la muerte celular asociada a la corrección del pH. El efecto observado por el Rutenium Red sobre el daño por Rx podría reflejar que éste se produce por la apertura del PTPm.

## **B. ESTUDIOS CON MITOCONDRIAS AISLADAS DE CORAZÓN DE RATA**

Tras descartar los otros mecanismos que se han implicado en la muerte celular aguda por Rx en miocitos, y puesto que de las tres únicas estrategias protectoras descritas (acidosis, Gly y RuR), dos de ellas (acidosis y RuR) se han involucrado en la función mitocondrial, se decidió investigar el papel de las mitocondrias en la muerte celular observada en nuestro modelo experimental de cardiomiocitos HL-1. Así, utilizando un modelo de mitocondrias aisladas a partir de corazón de rata, se investigó si el pH ácido y la glicina eran capaces de prevenir la apertura del PTPm, el principal mecanismo responsable de la muerte celular inducida por mitocondrias.

### **1. EFECTO DE LA RX SOBRE LA APARICIÓN DE EDEMA MITOCONDRIAL.**

La Rx a pH 7.2 de mitocondrias aisladas sometidas previamente a IS a pH 6.4 se asoció con un incremento del volumen de la matriz mitocondrial, como indica la caída en la absorbancia determinada a 550 nm. La Rx a pH 6.4 previno el edema mitocondrial asociado a la Rx. El edema mitocondrial inducido por Rx se atribuye a la apertura del PTPm ya que puede prevenirse con CsA y puede inducirse con altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) durante la Rx (Garlid *et al.*, 1996). La adición de glicina al tampón de Rx, a las mismas concentraciones que demostraron ser protectoras frente a la muerte celular asociada a Rx, previno completamente el edema mitocondrial asociado a la Rx, a pesar de la normalización del pH. (figura 25)



**Figura 25: Cambios en la absorbancia a 550 nm en mitocondrias aisladas de corazón de rata.** Las mitocondrias en suspensión fueron sometidas 60 min de IS y 30 min de Rx en las siguientes condiciones experimentales:

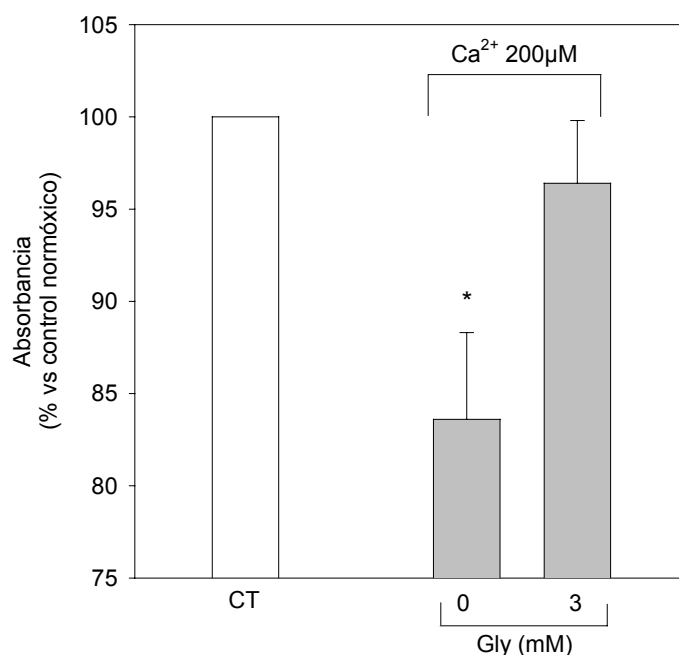
- Barra blanca: normoxia.
- Barras negras: Rx a pH 6.4 ó a pH 7.2.
- Barras grises: Gly 3 mM ó 10 mM durante la Rx
- Barras punteadas: CsA 0.1 μM durante la Rx en presencia de una elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (200 μM).

Durante la Rx a pH 7.2 se produjo una caída significativa de la absorbancia mitocondrial. El pH 6.4 y la Gly, a las dos concentraciones usadas para prevenir la muerte celular (3 y 10 mM), fueron capaces de prevenir la caída de la absorbancia indicativa de edema mitocondrial secundario a la apertura del PTPm. Tal como ya se ha descrito, la CsA 0.1 μM previno completamente la apertura del PTPm secundaria a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0.05$  vs Nx

## 2. EFECTO DE LA GLICINA SOBRE EL EDEMA MITOCONDRIAL INDUCIDO POR SOBRECARGA DE $\text{Ca}^{2+}$ EN CONDICIONES NORMÓXICAS.

Para comprobar la especificidad de la glicina sobre la apertura del PTPm, la suspensión de mitocondrias se sometió a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) en condiciones normóxicas, una maniobra que precipita la permeabilización mitocondrial.

La concentración de glicina que demostró ser protectora frente al daño celular por Rx también demostró ser eficaz en la abolición de la apertura del PTPm en condiciones de estrés por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluso en ausencia de IS/Rx (figura 26).



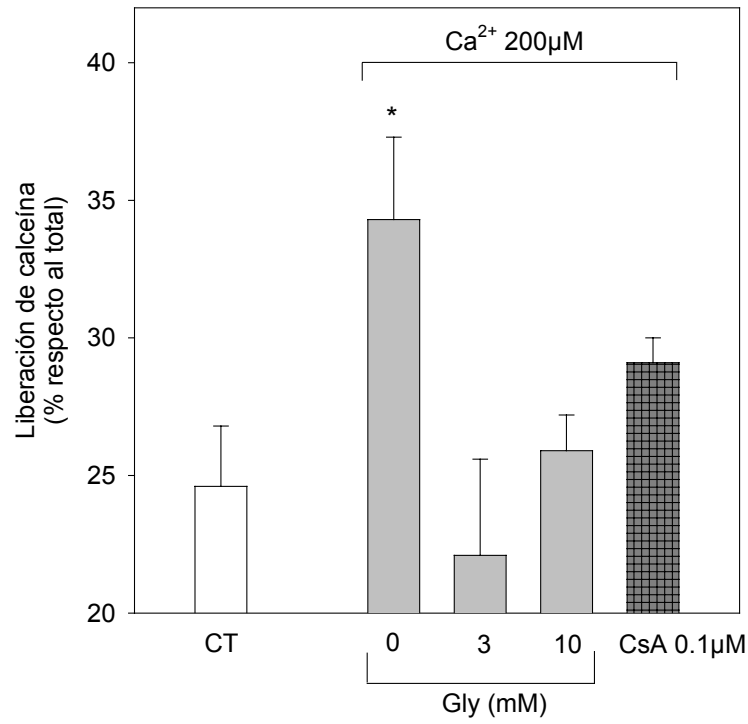
**Figura 26: Cambios en la absorbancia a 550nm en mitocondrias aisladas de corazón de rata sometidas a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Mitocondrias normóxicas sometidas a 15 min de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , en presencia o ausencia de Gly. El grupo control corresponde a mitocondrias normóxicas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.1  $\mu\text{M}$ . La adición de Gly 3 mM abolió completamente el edema mitocondrial inducido por 200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.05$  vs grupo CT.

### **3. LIBERACIÓN DE CALCEÍNA INDUCIDA POR SOBRECARGA DE Ca<sup>2+</sup>.**

Para corroborar el efecto protector de la glicina frente a la apertura del PTPm se determinó la liberación de calceína como un índice de permeabilización mitocondrial en presencia o ausencia de glicina. Las mitocondrias, previamente incubadas con calceína-AM, se sometieron a un estrés de sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> en condiciones normóxicas y se investigó el efecto de la glicina sobre la liberación de calceína.

La adición de 200  $\mu\text{M}$  de Ca<sup>2+</sup> a la suspensión de mitocondrias indujo una rápida y abrupta liberación de fluorocromo desde la matriz hacia el espacio extramitocondrial (figura 27). Cuando la glicina se añadió a las concentraciones utilizadas para prevenir el edema mitocondrial (3 mM y 10 mM) la liberación de calceína inducida por la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> fue completamente inhibida (figura 27). La liberación de calceína refleja claramente la apertura del PTPm ya que ésta pudo ser bloqueada por CsA 0.1  $\mu\text{M}$ .





**Figura 27: Liberación de calceína en mitocondrias aisladas de corazón de rata.** Las mitocondrias en suspensión se sometieron a 15 min de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  para precipitar la apertura del PTPm, en ausencia y en presencia de Gly 3 mM y 10 mM, y en presencia de CsA 0.1  $\mu\text{M}$ . El grupo control corresponde a mitocondrias normóxicas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.1  $\mu\text{M}$ . La adición de Gly (3 mM y 10 mM) previno la liberación de calceína, al igual que la CsA 0.1  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.05$  vs grupo CT.



#### **4. RESUMEN DE RESULTADOS DERIVADOS DEL ESTUDIO CON MITOCONDRIAS AISLADAS.**

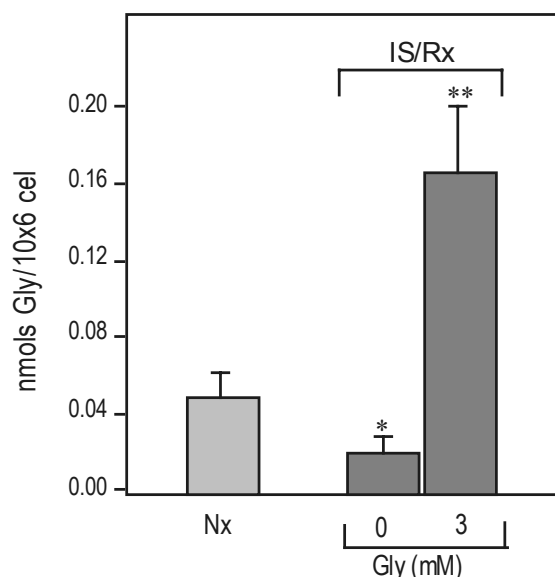
Los principales resultados son:

- La reoxigenación a pH 7.2 tras 60 minutos de isquemia simulada se asocia a una abrupta apertura del PTPm, determinada por una reducción de la absorbancia observada a 550 nm (edema mitocondrial) y por un aumento de la liberación de calceína.
- La acidosis (pH 6.4) inhibe la apertura del PTPm durante la reoxigenación.
- La glicina, utilizada a las concentraciones que habían demostrado prevenir la muerte celular en la reoxigenación, es capaz de inhibir eficazmente la apertura del PTPm, tanto durante la normalización del pH asociada a la reoxigenación como durante la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones normóxicas.

### **C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE GLICINA.**

Los experimentos realizados en mitocondrias aisladas de corazón de rata confirmaron que la dosis terapéuticamente efectiva de glicina para inhibir la apertura del PTPm era 3 mM. Para comprobar si esta concentración se alcanzaba en células intactas cuando se sometían a isquemia simulada y posterior reoxigenación en presencia de glicina exógena se determinó, mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la concentración intracelular de glicina durante la reoxigenación en presencia y en ausencia de glicina exógena, y tras someter los cardiomiocitos HL-1 a 60 minutos de isquemia simulada.

Durante la reoxigenación en ausencia de glicina exógena se observó una disminución significativa del contenido intracelular de la misma, en relación al grupo control normóxico. Por el contrario, la reoxigenación en presencia de glicina exógena a concentración de 3 mM produjo un incremento muy significativo en el contenido de glicina intracelular respecto al grupo control normóxico (figura 28).



**Figura 28: Concentración intracelular de glicina.** En cardiomiocitos HL-1 sometidos a 60 min de IS se observó una disminución significativa en el contenido intracelular de glicina durante la reoxigenación respecto al grupo

control normóxico, mientras que la reoxigenación en presencia de glicina 3 mM indujo un aumento significativo en el contenido intracelular de glicina respecto al grupo control normóxico. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.05$  vs Nx ; \*\*  $p < 0.01$  vs Nx.



## **V.DISCUSIÓN**





## **V. DISCUSIÓN**

El resultado más importante del presente trabajo es que la glicina, un aminoácido no esencial que forma parte de la estructura de muchas proteínas, tiene un efecto inhibitor sobre la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) y que este efecto se traduce en una reducción de la muerte celular durante la re-energización miocárdica después de un período de isquemia o hipoxia.

Aunque estudios previos habían descrito el efecto protector de la glicina frente a diversos insultos celulares (incluida la isquemia/reperfusión) en células no cardíacas, el mecanismo responsable de este efecto protector no había sido aclarado. En particular, la posibilidad de que la glicina actuase sobre el PTPm no había sido investigada previamente. Los experimentos descritos en la presente tesis extienden por primera vez las observaciones previas sobre el efecto citoprotector de la glicina a los cardiomiocitos, y demuestran la participación de la mitocondria en dicho efecto.

Además, los presentes resultados describen por primera vez la muerte de cardiomiocitos por necrosis durante los primeros minutos de reoxigenación por un mecanismo dependiente de la mitocondria e independiente de la sobrecarga mecánica del sarcolema por edema o hipercontractura.

## **1. MUERTE CELULAR POR ISQUEMIA SIMULADA Y REOXIGENACIÓN EN CARDIOMIOCITOS HL-1**

La restauración del aporte de oxígeno es la única vía de supervivencia que tienen las células sometidas a una isquemia severa. Durante la isquemia se produce una pérdida en el contenido de ATP debido al bloqueo de la producción de energía, causando un desequilibrio en la homeostasis iónica celular. La glucólisis pasa de ser aeróbica a anaerobia, por lo que aumentan los niveles de lactato y disminuye el pH intracelular. La resíntesis de ATP es necesaria para restablecer la homeóstasis iónica y metabólica. Pero durante la reoxigenación, una población variable de células isquémicas puede morir debido a la propia reoxigenación: es lo que se conoce como daño letal por reperfusión, y los mecanismos que lo precipitan no han sido del todo identificados (Piper *et al.*, 1998).

### **1.1. MUERTE CELULAR EN AUSENCIA DE HIPERCONTRACTURA**

Para estudiar el daño por isquemia-reperfusión se utilizó como modelo la línea celular de cardiomiocitos HL-1 (Claycomb *et al.*, 1998) sometida a unas condiciones determinadas para simular las condiciones del tejido isquémico "in vivo". La elección de este modelo experimental se basó en varias razones. El hecho de ser una línea celular de origen cardíaco, con un fenotipo característico de cardiomiocitos adultos pero con capacidad proliferativa, permite su mantenimiento, de manera casi indefinida, en el laboratorio. En el campo de la biología cardíaca, los cultivos primarios de cardiomiocitos aislados embrionarios o neonatales han sido ampliamente utilizados como modelo experimental, aunque su uso es limitado debido a su inestabilidad: carecen de un fenotipo cardíaco adulto, la división celular cesa al finalizar el período neonatal y al cabo de pocos días empiezan a aparecer células no cardíacas que contaminan el cultivo. El uso del modelo experimental de cardiomiocitos HL-1 supone también una ventaja respecto al modelo de miocitos cardíacos aislados a partir de ratas adultas: constituyen un modelo celular altamente reproducible, y no es necesario sacrificar animales para su obtención. Además de estas consideraciones, y debido a que las células HL-1 presentan una maquinaria contráctil muy rudimentaria, la utilización de este modelo experimental nos permitió estudiar, en cardiomiocitos adultos, la muerte celular asociada a la reoxigenación tras un período previo de

isquemia, mediada por mecanismos distintos a la sobrecarga mecánica, y en consecuencia, a la hipercontractura.

En cardiomiocitos aislados de rata, la reoxigenación tras isquemia simulada induce muerte celular por hipercontractura (activación contráctil exagerada), debido a la disponibilidad de nuevo de energía en presencia de niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico elevados (Ruiz-Meana *et al.*, 1999; Inserte *et al.*, 2002). En cardiomiocitos HL-1 la isquemia simulada indujo sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  aunque la muerte celular durante la reoxigenación no se asoció a hipercontractura. Experimentos realizados con BDM, un bloqueante de las miofibrillas utilizado experimentalmente como inhibidor de la hipercontractura (Siegmund *et al.*, 1991; Garcia-Dorado *et al.*, 1992a), no presentaron protección alguna frente al daño celular inducido por la reoxigenación (datos no presentados). Estas células no se hipercontraen durante la reoxigenación debido a que presentan una maquinaria contráctil muy rudimentaria (Claycomb *et al.*, 1998). Por otro lado, la muerte celular por reoxigenación no dependió directamente de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que las maniobras utilizadas para reducir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (reoxigenación en presencia de EDTA) y de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (preincubación con BAPTA, quelante del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular) fallaron en proteger a las células del daño por reoxigenación (vease figura 10 )

## **1.2. DAÑO CELULAR POR CORRECCIÓN DE LA ACIDOSIS INTRACELULAR (PARADOJA DEL pH)**

Para simular las condiciones de isquemia y para favorecer la depleción de ATP se utilizó NaCN, un inhibidor reversible de la fosforilación oxidativa, y DOG, un inhibidor de la glucólisis aeróbica, para forzar la depleción rápida de ATP. La acidosis intracelular se indujo acidificando el medio de incubación a pH 6.4. El cianuro es un inhibidor reversible de la respiración; en cultivos de células hepáticas y en miocitos se ha observado que la eliminación del cianuro permite la recuperación funcional y estructural de las células inducida por la inhibición metabólica, como la formación de edema y la depleción de ATP (Herman *et al.*, 1988; Bond *et al.*, 1991b). Tras la isquemia simulada, la reoxigenación de las células se consiguió eliminando el KCN y el DOG del medio de incubación, añadiendo glucosa y normalizando el pH a 7.4.

En cardiomiocitos HL-1, la reoxigenación a pH 7.4 tras someter las células a 60 minutos de isquemia simulada indujo la muerte de alrededor de un 10-15 % de las células. El daño celular se produjo mayoritariamente por necrosis, como muestra la tinción doble con yoduro de propidio (PI) y anexina (Anx). Tras 30 minutos de reoxigenación a pH 7.4 se observó un incremento significativo del número de células PI+/Anx+, marcaje específico de las células que presentan la membrana celular rota, con respecto al número de células PI-/Anx+, indicativo de células apoptóticas (vease figura 9). Estos resultados demuestran que en nuestro modelo experimental la muerte celular se produce durante los primeros minutos de reoxigenación, y es fundamentalmente debida a necrosis.

Cuando la reoxigenación se produjo a pH 6.4 la muerte celular se previno totalmente. Además, el efecto fue dosis-dependiente: el número de células teñidas con PI fue aumentando a medida que aumentaba el pH del medio de reoxigenación (vease figura 11). El hecho de que la reoxigenación a pH 6.4 sea protectora frente a la muerte celular producida a pH 7.4 demuestra que la normalización del pH durante la reoxigenación es la responsable del daño celular agudo letal en los cardiomiocitos HL-1. Este fenómeno, conocido como paradoja del pH, se ha demostrado en otros tipos celulares así como en estudios realizados con órganos aislados y perfundidos (Currin *et al.*, 1991; Bond *et al.*, 1993; Lemasters *et al.*, 1996). Experimentos realizados en nuestro laboratorio en corazón de rata aislado y perfundido demuestran que la reoxigenación ácida atenúa claramente la liberación de LDH (un índice de ruptura de la membrana celular), confirmando la contribución de la corrección del pH en el daño celular por reperfusión (Ruiz-Meana M *et al.*, 2004). Por otro lado, la acidosis que se produce en el tejido isquémico como consecuencia de la acumulación de lactato y iones H<sup>+</sup> protege del daño celular que desencadena la propia isquemia (Gores *et al.*, 1989; Bond *et al.*, 1991a). En cardiomiocitos HL-1, tras 4 horas de isquemia simulada a pH 7.4 se observó una tasa de muerte celular por necrosis muy superior a la observada tras 4 horas de isquemia simulada a pH 6.4 (datos no presentados). Este fenómeno también se observa en corazón aislado y perfundido de rata (Rodríguez-Sinovas A, comunicación personal).

En múltiples estudios previos las estrategias destinadas a retrasar la recuperación del pH intracelular se han mostrado protectoras, sin embargo los mecanismos relacionados con la protección ejercida por el pH ácido no han sido aún identificados.

Tratamientos destinados a aumentar el pH intracelular durante la hipoxia química, como la monensina, un ionóforo de  $\text{Na}^+$ , aceleran la muerte celular (Gores *et al.*, 1989; Bond *et al.*, 1993), mientras que tratamientos destinados a bajar el pH intracelular, como la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , el principal sistema de transporte regulador del pH intracelular, retrasan el inicio de la muerte celular (Gores *et al.*, 1989; Harper *et al.*, 1993). El uso de agentes que inhiben el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  también puede tener un efecto beneficioso sobre el miocardio isquémico/reperfundido. Durante la reoxigenación el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se pone en marcha para normalizar el pH sacando  $\text{H}^+$  fuera de la célula a expensas de la entrada de  $\text{Na}^+$ , lo que favorece el influjo de  $\text{Na}^+$  que, a su vez, pone en marcha el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que saca  $\text{Na}^+$  a costa de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  desempeña entonces un papel deletéreo para la célula porque constituye un mecanismo de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tani & Neely, 1989; Piper *et al.*, 1996). Aunque se han obtenido resultados contradictorios, la opinión mayoritaria y recientemente respetada es que el efecto beneficioso del bloqueo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se debe a su acción durante la isquemia. Estudios realizados en órganos perfundidos han demostrado que la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ejerce un efecto beneficioso sólo cuando está presente antes y durante la isquemia (Klein *et al.*, 1995; Garcia-Dorado *et al.*, 1997a; Rodriguez-Sinovas *et al.*, 2003).

En cardiomiocitos HL-1 la presencia de un inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  como el HOE-642 o de un inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  como el KBR-7943 administrado en distintos momentos del protocolo experimental no previno del daño celular por reoxigenación observado en este modelo (vease figura 23), lo que sugiere la participación en el mismo de mecanismos distintos a los relacionados con la muerte celular en cardiomiocitos capaces de hipercontraerse.

## **2. LA GLICINA PREVIENE DEL DAÑO CELULAR ASOCIADO A LA REOXIGENACIÓN**

La glicina es un aminoácido no esencial, de pequeño tamaño, y con un claro efecto citoprotector frente a la muerte celular por necrosis y apoptosis inducida por diferentes insultos (Hall, 1998; Wheeler *et al.*, 1999; Matilla *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2003).

En cardiomiocitos HL-1 la reoxigenación en presencia de glicina protegió totalmente de la muerte celular asociada a la reoxigenación, de manera similar a la reoxigenación ácida. El efecto de la glicina fue dosis-dependiente, con una  $EC_{50}$  de 1.2 mM, y claramente "reoxigenación-dependiente", ya que la administración de glicina durante la isquemia no fue capaz de prevenir la muerte celular asociada a la reoxigenación (vease figura 12).

El efecto beneficioso de la glicina ha sido descrito, tanto en estudios in vitro como in vivo, en varios tipos celulares y frente a diversos estímulos citotóxicos, aunque el mecanismo de acción por el que la glicina ejerce su efecto no ha sido aún identificado. Algunos trabajos sugieren que la glicina podría ejercer su efecto beneficioso al activar canales de  $Cl^-$  localizados en la membrana plasmática de las células disminuyendo así la entrada de  $Ca^{2+}$  y, en consecuencia, inhibiendo los mecanismos de comunicación intracelular mediados por  $Ca^{2+}$  citosólico. Este mecanismo se ha observado en células de Kúpffer del hígado y en otras células de la serie blanca, y se traduce en una disminución de la activación de las células del sistema inmunológico, en particular de macrófagos, neutrófilos y linfocitos, minimizando así la producción de moléculas inflamatorias, como las citoquinas y los eicosanoides, asociada a numerosos procesos patológicos (Wheeler *et al.*, 1999). Otros trabajos sugieren que la glicina podría ejercer un mecanismo directamente relacionado con la preservación de la ultraestructura celular, ya sea por inhibición de la acción de enzimas de degradación, que afectaría a proteínas del citoesqueleto (Nichols *et al.*, 1994; Edelstein *et al.*, 1997; Tijssen *et al.*, 1997), o mediante la inhibición del desarrollo de "poros inespecíficos" en la membrana plasmática de las células como consecuencia del daño celular, que inducirían rotura de la membrana y muerte celular (Frank *et al.*, 2000; Nishimura & Lemasters, 2001; Estacion *et al.*, 2003).

También se ha relacionado el mecanismo de acción de la glicina con la inhibición de la cascada apoptótica (Zhang *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 2003; Omasa *et al.*, 2003), con efectos antiangiogénicos (Rose *et al.*, 1999a; Rose *et al.*, 1999b; Amin *et al.*, 2003) y con la regulación de la expresión de genes que codifican para determinadas proteínas (Heat Shock Proteins; Stress Proteins) (Nissim *et al.*, 1992) y otros mediadores implicados en diversos procesos fisiopatológicos (iNOS) (Nissim *et al.*, 1992; Mauriz *et al.*, 2001; Amin *et al.*, 2003).

## 2.1. RECUPERACIÓN DEL pH INTRACELULAR Y SOBRECARGA DE Na<sup>+</sup>

En cardiomiocitos HL-1 la protección ejercida por la glicina frente al daño por reoxigenación fue similar al efecto del pH ácido. Una posibilidad a descartar fue que la glicina estuviera evitando la recuperación del pH intracelular durante la reoxigenación. Para comprobar los cambios en el pH intracelular durante la isquemia simulada y la reoxigenación cargamos las células con BCECF, y determinamos los cambios de pH a lo largo del protocolo experimental mediante ratiofluorescencia por imagen. Se observó que durante la isquemia simulada el pH intracelular disminuía progresivamente hasta equilibrarse con el pH extracelular (alrededor de 6.0-6.2), mientras que durante la reoxigenación la acidosis se recuperaba rápidamente hasta alcanzar valores fisiológicos (7.2-7.4) durante los primeros 10 minutos de reoxigenación. La presencia de glicina no modificó la recuperación del pH intracelular durante la reoxigenación (vease figura 16). En realidad parecía que la recuperación de los valores fisiológicos de pH se producía más rápidamente en presencia de glicina que en ausencia de ella, aunque las diferencias no fueron significativas.

Igualmente, comprobamos el efecto de la glicina frente la sobrecarga intracelular de Na<sup>+</sup>. Como consecuencia de la acidosis intracelular acontecida durante la isquemia y debido a la activación de los mecanismos reguladores de pH (como el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y el cotransportador Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), se produce una entrada de iones Na<sup>+</sup> al interior celular, favoreciendo la sobrecarga de Na<sup>+</sup> y el daño celular por edema osmótico. Algunos autores habían observado un efecto beneficioso de la glicina en la sobrecarga de Na<sup>+</sup> en hepatocitos hipóxicos y en hepatocitos tratados con KCN (Carini *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 2000). En este sentido Qian y cols observaron que la reperfusión con un tampón libre de Na<sup>+</sup> protegía a las células del daño celular letal (Qian *et al.*, 1997). Para comprobar el efecto de la glicina sobre la concentración intracelular de Na<sup>+</sup> sometimos las células HL-1 al protocolo experimental habitual cargándolas previamente con el SBFI, y mediante ratiofluorescencia por imagen estudiamos los cambios producidos en la emisión de fluorescencia. El método fue el mismo que el utilizado para la determinación del pH intracelular exceptuando las longitudes de onda de la luz de excitación y emisión. Observamos que durante la isquemia simulada la concentración intracelular de Na<sup>+</sup> iba aumentando gradualmente manteniéndose elevada durante los primeros minutos de reoxigenación. La glicina no

ejerció ningún efecto detectable sobre la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  a lo largo del protocolo experimental (vease figura 17).

## **2.2. EL RECEPTOR DE GLICINA NO PARTICIPA EN LA PROTECCIÓN CONTRA LA PARADOJA DEL pH**

La protección frente al daño celular ejercida por la glicina ocurre cuando ésta es administrada durante la reoxigenación. Esto sugiere que la glicina debe actuar específicamente sobre aquellos mecanismos que precipitan el daño celular durante este período. El hecho de que la glicina no modificara la recuperación del pH intracelular ni la sobrecarga de  $\text{Na}^+$ , así como tampoco modificaba la recuperación de los niveles de ATP durante la isquemia/reperfusión (Marsh *et al.*, 1993; Venkatachalam *et al.*, 1996) nos hizo pensar que el mecanismo de acción de la glicina podía estar relacionado con la activación de su receptor.

En el SNC la glicina ejerce como neurotransmisor inhibitorio a través de la unión a un receptor, localizado en las membranas neuronales postsinápticas (Rajendra *et al.*, 1997). Al unirse a su receptor, la glicina induce hiperpolarización de la membrana postsináptica, por entrada de iones  $\text{Cl}^-$ , bloqueando la acción despolarizante de la neurotransmisión. El RGly es un complejo pentamérico que forma un canal transmembrana selectivo de cloro y que se expresa predominantemente en la médula espinal y en cerebro. Hasta hace poco se creía que el RGly se localizaba exclusivamente en SNC, pero desde hace pocos años se ha descrito su presencia en una amplia variedad de células involucradas en la inflamación, como las células de Kupffer (Ikejima *et al.*, 1997), los macrófagos alveolares y los neutrófilos (Wheeler *et al.*, 2000a; Wheeler *et al.*, 2000b). Igualmente se ha demostrado la presencia de este receptor en otros tipos celulares como hepatocitos o células renales (Miller & Schnellmann, 1995; Venkatachalam *et al.*, 1996; Qu *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún estudio que demuestre la presencia del RGly en miocitos cardíacos.

Algunos trabajos sugieren que el efecto protector de la glicina está relacionado con la activación de sus receptores. Se ha sugerido que la activación de los receptores de glicina podría prevenir el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante la hiperpolarización de la membrana, previniendo así la activación de los



canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Wheeler *et al.*, 2000a; Yamashina *et al.*, 2001) inhibiendo la cascada de señalización intracelular inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ . En el tejido nervioso el RGly es detectado mediante anticuerpos monoclonales que reconocen regiones localizadas en las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (Pfeiffer *et al.*, 1984). Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconocía la subunidad  $\alpha$  de la isoforma adulta (48 kDa) y de la isoforma neonatal (58 kDa) hemos demostrado, mediante Western blot, la presencia de la subunidad  $\alpha$  de PM~48 kDa en cardiomiocitos HL-1 (vease figura 18). En cardiomiocitos aislados de rata, el anticuerpo también reconoció una banda aunque de PM inferior a 48 kDa (aproximadamente 40 kDa, datos no presentados). Estos resultados demuestran que en células HL-1, y probablemente en miocitos aislados de rata, existe una proteína similar a las subunidades  $\alpha$  del receptor de glicina de SNC, lo que sugiere que estas células expresan el receptor, como ya se ha descrito previamente en otras células no neuronales. De todas maneras estos resultados, aunque indicativos de la presencia de la isoforma adulta, no permiten precisar con exactitud cual de las distintas subunidades  $\alpha$  forman el receptor, debido a la existencia de reacciones cruzadas entre el anticuerpo y los miembros de la familia de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ), lo que podría explicar las diferencias observadas en el caso de los miocitos.

Se ha descrito que la estimulación del RGly localizado en macrófagos y en células de Kúpffer estimula la entrada de iones  $\text{Cl}^-$  lo que produce hiperpolarización de la membrana plasmática y provoca un bloqueo de la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes. La disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inhibiría las vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ikejima *et al.*, 1997). En este sentido, también se ha descrito un efecto protector se algunos agonistas y antagonistas de los canales de  $\text{Cl}^-$  frente al daño celular letal inducido por distintos tóxicos (Venkatachalam *et al.*, 1996; Waters & Schnellmann, 1996). En el presente estudio utilizamos agonistas y antagonistas del receptor conocidos por su actividad en el SNC y caracterizamos farmacológicamente su comportamiento.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en nuestro modelo de isquemia-reperfusión el efecto protector de la glicina no estaba mediado por la activación de un receptor farmacológicamente similar al RGly de SNC. Ninguno de los agonistas o bloqueantes utilizados modificó la muerte celular por reoxigenación en cardiomiocitos HL-1. La taurina, a concentraciones descritas efectivas como agonista (Tokutomi *et al.*,

1989; Heyman *et al.*, 1992; Schmieden & Betz, 1995) no mimetizó el efecto de la glicina (vease figura 20.A). La estricnina, competitivamente con la glicina, tampoco fue capaz, a las dosis descritas como efectivas para antagonizar el receptor (Young & Snyder, 1973), de antagonizar el efecto de la glicina durante la reoxigenación (vease figura 20.B). Tampoco lo hizo el BN-52021, extracto del Ginkgo Biloba, un antagonista selectivo del receptor (Kondratskaya *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2003) (vease figura 20.C). Sin embargo se observó, varios órdenes de magnitud por encima de los descritos como antagonista (concentraciones del orden de milimolar), un efecto protector de la estricnina frente a la reoxigenación, en cardiomiocitos HL-1. Este efecto fue dosis-dependiente ( $EC_{50} = 0.4 \text{ mM}$ ) y similar al ejercido por la glicina (vease figura 20.D). Estos resultados coinciden con los descritos previamente en hepatocitos y en células renales (Aleo & Schnellmann, 1992; Miller & Schnellmann, 1993; Miller & Schnellmann, 1994b; Carini *et al.*, 1997), en los que observaban un efecto protector compartido por la glicina y la estricnina.

Algunos autores han propuesto que el efecto protector de la estricnina a altas concentraciones podría deberse a su acción agonista sobre el RGly (Wheeler *et al.*, 2000a). Pero contrariamente a los estudios que sugieren que la glicina actuaría a través de la activación de la entrada de  $Cl^-$ , otros trabajos proponen que el efecto protector de la glicina estaría mediado por un bloqueo de la entrada de  $Cl^-$  dependiente de su interacción con el receptor, lo que explicaría además el efecto observado para la estricnina. Se ha descrito que a concentraciones elevadas la glicina podría actuar como antagonista del receptor bloqueando la entrada de  $Cl^-$  (Tokutomi *et al.*, 1989; Miller & Schnellmann, 1993; Miller & Schnellmann, 1995; Currin *et al.*, 1996).

Para investigar la contribución de los flujos de  $Cl^-$  en el daño por reoxigenación y comprobar si la glicina regulaba dichos flujos iónicos tal y como se había sugerido (Waters & Schnellmann, 1996) sometimos las células HL-1 a IS y Rx y sustituimos los iones  $Cl^-$  del medio de reoxigenación por iones gluconato, en presencia y en ausencia de glicina. La eliminación del  $Cl^-$  del medio extracelular (sustitución por gluconato, anión no permable a la célula), o la inhibición de la entrada de  $Cl^-$  utilizando un bloqueante de los canales de  $Cl^-$  de la membrana plasmática como el DIDS, no disminuyó la muerte celular asociada a la reoxigenación. Además, el efecto de la glicina no fue dependiente de la presencia de  $Cl^-$  en el medio (vease figura 21 y figura 22). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Currin y cols. (Currin *et al.*, 1991)

y por Venkatachalam y cols (Venkatachalam *et al.*, 1996) en los que no observan ninguna relación entre el aumento de la conductancia para el Cl<sup>-</sup> y el efecto protector de la glicina. Se ha propuesto que el hecho de que varios agonistas y antagonistas de los canales de Cl<sup>-</sup> tengan efectos protectores frente al daño celular letal podría ser debido a un efecto de estos compuestos sobre canales "aniónicos" no específicos para el Cl<sup>-</sup> y relacionados con la muerte celular por necrosis. En este sentido, algunos autores sugieren que la glicina podría actuar a través de este "canal aniónico orgánico inespecífico", que se "activaría" inmediatamente antes de iniciarse el proceso de necrosis celular (Nishimura & Lemasters, 2001; Estacion *et al.*, 2003). Nuestros resultados, aunque sugieren la existencia de receptores de glicina en cardiomiocitos HL-1, indican que el mecanismo de acción de la glicina es independiente de la modulación de corrientes de Cl<sup>-</sup> asociadas al receptor y, por lo tanto, de la activación o bloqueo de estos.

### **3. LA APERTURA DEL PTP<sub>m</sub> CONTRIBUYE A LA MUERTE CELULAR POR NORMALIZACIÓN DEL pH DURANTE LA REOXIGENACIÓN.**

Cada vez hay más evidencias que demuestran la importancia de la mitocondria en la muerte celular o en la supervivencia de los miocitos cardíacos expuestos a isquemia-reperusión (Duchen, 1999; Halestrap *et al.*, 2004). Este papel de la mitocondria no se debe exclusivamente a su importancia en la síntesis de ATP sino también a procesos relacionados con la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP<sub>m</sub>).

Bajo condiciones fisiológicas, la membrana interna de la mitocondria permanece impermeable a la mayoría de iones y metabolitos. La disrupción de la barrera mitocondrial como consecuencia de la apertura del PTP<sub>m</sub> puede desencadenar la muerte celular por distintos mecanismos, siendo el más estudiado la liberación del citocromo c y de otros factores pro-apoptóticos que activarían la cascada de las caspasas iniciándose así la vía de la apoptosis (Zamzami & Kroemer, 2001; De Giorgi *et al.*, 2002).

Además de jugar un papel muy importante en la muerte celular por apoptosis, varios estudios demuestran la contribución del PTP<sub>m</sub> en la muerte celular aguda por

necrosis y en particular en la necrosis celular que se produce como consecuencia de la reperfusión (Griffiths & Halestrap, 1995; Di Lisa *et al.*, 2001). Se ha descrito que la apertura del PTPm puede conducir a la necrosis mediante la desenergización mitocondrial completa o por una alteración severa de la homeostasis iónica, en particular del  $\text{Ca}^{2+}$ . (Kruman & Mattson, 1999; Crompton, 1999; Kim *et al.*, 2003).

Durante la isquemia prolongada, la depleción severa de los niveles de ATP intracelular y el aumento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  y en la producción de radicales libres favorecen la apertura del PTPm (Duchen *et al.*, 1993; Griffiths & Halestrap, 1995). Sin embargo, la rápida caída del pH intracelular y los elevados niveles de  $\text{Mg}^{2+}$  tienden a mantener el PTPm cerrado (Halestrap, 1991). Por esta razón, el PTPm no contribuye de manera significativa al daño celular durante la isquemia. La reinstauración del oxígeno durante la reperfusión favorece la recuperación de la cadena de transporte electrónico, lo que produce un marcado aumento en los niveles de radicales libres. La concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  y los niveles de Pi siguen aumentados, mientras que los valores de  $\text{Mg}^{2+}$  y el pH intracelular se normalizan. La rápida corrección de la acidosis intracelular, el estrés oxidativo y las persistentes anomalías en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulan la apertura del PTPm.

Existen datos experimentales que demuestran la apertura del PTPm únicamente durante la reperfusión. Mediante la utilización de compuestos fluorescentes indicadores del potencial de membrana Lemasters y cols observaron, en cardiomiocitos sometidos a isquemia/reperfusión, despolarización de la membrana mitocondrial interna durante la reoxigenación atribuible a la apertura del PTPm (Lemasters *et al.*, 1997). Monitorizando la liberación mitocondrial de calceína (fluorocromo que queda retenido en el interior de la célula y que se libera en función de la apertura del PTPm) mediante microscopia de fluorescencia se ha observado despolarización mitocondrial, sensible a CsA, en cardiomiocitos aislados y reoxigenados tras isquemia simulada (Duchen *et al.*, 1993; Petronilli *et al.*, 1999). La apertura del PTPm durante la reperfusión también ha sido demostrada en corazón aislado y perfundido de rata, confirmando que el PTPm permanece cerrado durante la isquemia y que la reoxigenación induce su apertura con un curso temporal que refleja la normalización del pH intracelular (Javadov *et al.*, 2000; Di Lisa *et al.*, 2001)

En el presente estudio los resultados obtenidos con Rutenium Red (RuR) sugerían que la mitocondria podía contribuir de manera activa al daño celular inmediato por reoxigenación en el modelo celular de cardiomiocitos HL-1. El RuR es un inhibidor de la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la mitocondria ya que inhibe el transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  ("uniporter" de  $\text{Ca}^{2+}$ ) localizado en la membrana interna mitocondrial (Griffiths, 2000). En cardiomiocitos HL-1 la administración de RuR durante la reoxigenación o durante todo el protocolo experimental de IS/Rx disminuyó la muerte celular asociada a la normalización del pH (vease figura 24). Estos resultados encajan con resultados descritos en anteriores estudios en los que se observaba que la inhibición de la sobrecarga intramitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante RuR protegía tanto de la apoptosis como de la necrosis (Kruman & Mattson, 1999). En un estudio reciente, Gincel y cols demuestran que el efecto inhibitor del RuR sobre la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial es debido a la inhibición del canal VDAC, uno de los principales componentes del complejo multiproteico que forma el PTPm, y no por inhibición del transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana interna mitocondrial como se había sugerido previamente (Gincel *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta estos datos, es posible que el efecto observado con RuR sobre la muerte celular en cardiomiocitos HL-1 pueda ser debido a un efecto sobre el PTPm. En este sentido, los resultados obtenidos con la reoxigenación ácida encajarían con esta hipótesis. En cardiomiocitos HL-1 el efecto protector del pH ácido sobre la muerte celular asociada a la reoxigenación no puede atribuirse a la atenuación de la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  que se produce como consecuencia de la actividad de los intercambiadores iónicos implicados en la regulación del pH intracelular durante la reoxigenación. Además, la muerte celular asociada a la reoxigenación no fue dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y no puede asociarse a la hipercontractura, ya que los cardiomiocitos HL-1 no se hipercontraen, debido principalmente a la maquinaria contráctil rudimentaria que poseen. Por otro lado, la glicina mimetizó el efecto protector del pH ácido sin influir en la recuperación del pH intracelular ni en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  (vease figura 16 y figura 17). Todos estos resultados sugieren que el efecto protector de la glicina y del pH ácido es independiente de la atenuación de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la hipercontractura. El hecho de que el pH ácido y el RuR fueran a su vez inhibidores de la apertura del PTPm nos llevó a investigar si la glicina podía actuar a nivel mitocondrial interfiriendo con la apertura del PTPm.

Para ello se utilizaron mitocondrias aisladas de corazón de rata sometidas a dos protocolos experimentales distintos: un protocolo de IS/Rx y un protocolo de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , y se estudió el efecto de la glicina y del pH ácido en la apertura del PTPm.

#### **4. LA GLICINA PREVIENE DEL DAÑO CELULAR DEBIDO A LA NORMALIZACIÓN DEL pH AL INTERFERIR CON LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.**

Algunos autores habían relacionado el efecto protector ejercido por la glicina con el cierre de poros o canales inespecíficos que podían desarrollarse en la membrana plasmática de las células inducidos por la hipoxia (Dong *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2000; Nishimura & Lemasters, 2001). Mediante estudios de permeabilización de la membrana plasmática y utilizando técnicas de microscopia confocal se ha observado que la glicina retarda la permeabilización de moléculas fluorescentes de distinto tamaño al interior celular durante la hipoxia (Nishimura & Lemasters, 2001). Este fenómeno se ha relacionado con la aparición de una permeabilidad transitoria de la membrana plasmática que reflejaría la apertura de canales aniónicos. El edema celular masivo resultante de la entrada de iones a través de estos canales terminaría por causar la ruptura de la membrana y la muerte celular por necrosis.

Es probable que esta permeabilidad transitoria de la membrana plasmática este en realidad reflejando la apertura del PTPm, que desencadenaría la muerte celular por necrosis o por apoptosis. De hecho, la ruptura de la membrana plasmática es el último paso en la vía desencadenante de la muerte celular por necrosis y por apoptosis.

Para investigar la posible acción de la glicina sobre el PTPm utilizamos como modelo experimental mitocondrias aisladas de corazón de rata sometidas a un protocolo experimental de isquemia *in vitro*. Para determinar la apertura del PTPm estudiamos los cambios de absorbancia a 550 nm, reflejo de la aparición de edema mitocondrial, un índice aceptado de apertura del poro (Garlid *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos demuestran que la glicina, a concentración 3 y 10 mM, previene el edema mitocondrial inducido por reoxigenación tras una isquemia simulada transitoria (vease figura 25). Para confirmar que el edema se debía verdaderamente a

la apertura del PTPm las mitocondrias, previamente incubadas con calceína-AM, se sometieron a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , maniobra utilizada habitualmente para inducir la permeabilización mitocondrial. La glicina fue capaz de prevenir la liberación de calceína inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones normóxicas, lo que refleja el cierre del PTPm (vease figura 27).

El efecto inhibitorio de la glicina sobre la apertura del PTPm en mitocondrias aisladas de corazón de rata fue equivalente al observado por el pH 6.4, siendo completo a la concentración de 3 mM y ausente a concentraciones inferiores a 1 mM (vease figura 25). Este resultado plantea la cuestión de si es posible alcanzar concentraciones citosólicas de glicina efectivas sobre la regulación del PTPm con las concentraciones de glicina extracelular utilizadas durante la reoxigenación en células intactas. Los experimentos realizados con espectroscopia de RMN demostraron que la concentración intracelular de glicina en cardiomiocitos HL-1 expuestos a 60 minutos de IS y 30 minutos de Rx se reducía de manera significativa respecto la concentración intracelular de glicina de las células normóxicas (vease figura 28). Cuando la reoxigenación se producía en presencia de glicina 3 mM, la concentración intracelular de glicina aumentó significativamente, alcanzando concentraciones que probablemente se encuentren dentro del rango de concentraciones que inhiben el PTPm.

## **5. PAPEL DELETÉREO DE LA DEPLECIÓN DE GLICINA DURANTE LA RX.**

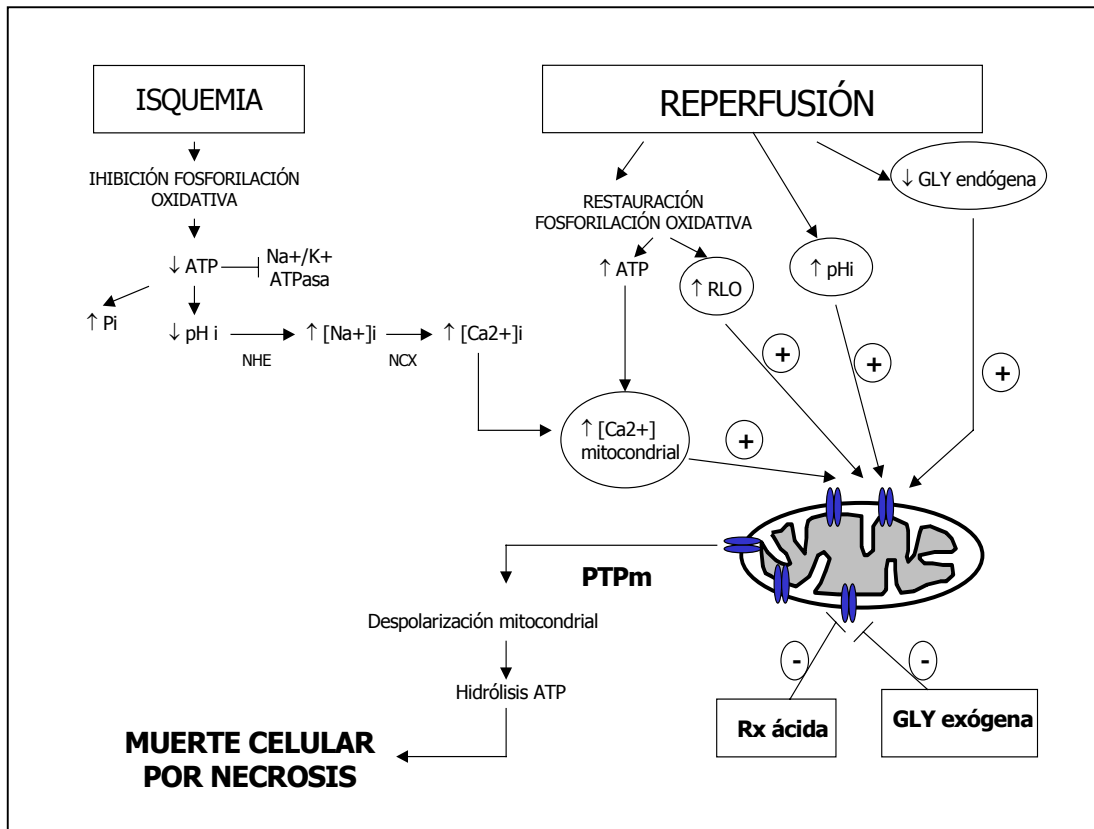
El mecanismo por el cual la concentración de glicina disminuye en cardiomiocitos sometidos a IS/Rx no ha sido investigado en este trabajo. Se sabe que durante la isquemia, el fallo de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa contribuye a la acumulación de  $\text{Na}^+$  y, secundariamente de  $\text{Cl}^-$ , acompañada de  $\text{H}_2\text{O}$ , lo que favorece la aparición de edema celular. El aumento del volumen celular pone en marcha un mecanismo regulador que induce la extrusión de solutos, moléculas orgánicas y aminoácidos, entre ellos glicina, en un proceso conocido como "Regulatory Volume Decrease" (RVD) o reducción regulada de volumen (Rasmusson *et al.*, 1993; Song *et al.*, 1998a; Song *et al.*, 1998b).

Estudios realizados en corazón y en cerebro han puesto de manifiesto la pérdida de aminoácidos durante la isquemia, que puede perjudicar la capacidad de las células de recuperar su función durante la reoxigenación (Phillis & O'Regan, 2003). En este

sentido cabría esperar entonces que la rápida corrección de la reducción del volumen celular que tiene lugar durante la reoxigenación y la normalización del pH intracelular resulte en la extrusión de glicina al espacio extracelular. Aunque la contribución de la pérdida de glicina en los mecanismos de regulación de volumen no ha sido establecida, su abolición por exposición a concentraciones crecientes de glicina en el medio extracelular podría reducir e impedir la corrección del volumen. Los cambios morfológicos observados en los cardiomiocitos HL-1 reoxigenados estarían de acuerdo con esta hipótesis. Durante la isquemia simulada, las células experimentan un aumento en el volumen celular, mientras que la reoxigenación se acompaña de una reducción del mismo (vease figura 13). La adición de glicina al tampón de reoxigenación atenuó significativamente esta reducción del volumen celular de manera dosis-dependiente y la magnitud de este efecto se correlacionó claramente con la del efecto protector de la glicina frente a la muerte celular (vease figura 15).

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo permiten formular la siguiente hipótesis, esquematizada en la figura 29. De acuerdo con esta hipótesis, la rápida normalización del pH durante la reoxigenación, en presencia de elevadas concentraciones de radicales libres de oxígeno, así como una elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, y en consecuencia de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, favorecerían la apertura del PTPm, promoviendo la permeabilización mitocondrial, la disipación del potencial de membrana y la muerte celular por necrosis. La glicina intracelular actuaría como inhibidor de la permeabilización mitocondrial, sin embargo los mecanismos de regulación del volumen celular que se activan durante la reoxigenación para contrarrestar el edema celular inducido durante la isquemia implican la pérdida de aminoácidos, entre los cuales se encuentra la glicina, deplecionando así los niveles intracelulares de glicina y, en consecuencia, aumentando la vulnerabilidad de la célula frente a estímulos inductores de la apertura del PTPm. El aumento de la concentración extracelular de glicina durante la reoxigenación y la entrada de ésta al interior celular (probablemente a través de los transportadores de aminoácidos de la membrana plasmática) resultaría en un aumento de la concentración intracelular de glicina, que actuaría a nivel mitocondrial inhibiendo la apertura del PTPm y el desarrollo de la permeabilización mitocondrial, evitando la disipación del potencial de membrana y previniendo la muerte celular por necrosis.





**Figura 29: Mecanismo de acción propuesto para la glicina.** La disminución de la síntesis de ATP como consecuencia de la inhibición de la fosforilación oxidativa durante la isquemia, la acumulación de catabolitos y la sobrecarga iónica favorecen el desarrollo de la permeabilidad mitocondrial, pero la acidosis desarrollada durante la isquemia previene la apertura del PTPm. Durante la reperfusión, la normalización del pH intracelular y la síntesis de nuevo de ATP favorecen la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la generación de radicales libres de oxígeno. La elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico favorece la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, que junto con la presencia de radicales libres de oxígeno promueve la apertura del PTPm, fenómeno que se ve favorecido por la depleción en la concentración intracelular de glicina, probablemente como consecuencia de los mecanismos reguladores del volumen celular. La administración de glicina exógena durante la reoxigenación inhibiría la apertura del PTPm a pesar de la corrección de la acidosis, previniendo la muerte celular por necrosis.

## **6. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Nuestros resultados sugieren un efecto citoprotector directo de la glicina al modular la apertura del PTPm, un mecanismo implicado en la muerte celular apoptótica y necrótica que se produce durante la isquemia/reperfusión. La posibilidad de interferir farmacológicamente sobre la actividad del PTPm representa una aproximación terapéutica muy prometedora en la prevención del daño celular letal en el miocardio reperfundido. Aunque serán necesarios estudios adicionales para determinar exactamente cuál de las distintas subunidades del PTPm están implicadas en el mecanismo de acción de la glicina y así poder establecer dianas terapéuticas específicas, los estudios experimentales realizados en modelos animales a los que se les administró un complemento dietético de glicina y en los que se observó una mejora en la viabilidad frente a una variedad de estados patológicos (Thurman *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 1999b), representan una posibilidad real de la futura utilización de la glicina como fármaco útil y seguro en humanos. En este sentido, recientemente se ha publicado un estudio clínico realizado en humanos sometidos a trasplante hepático, en el que se demuestra por primera vez el efecto beneficioso de la administración intravenosa de una infusión de glicina en la recuperación funcional tras el trasplante, ofreciendo resultados muy prometedores (Schemmer *et al.*, 2001).

## **VI.CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

De los resultados derivados de este trabajo puede concluirse que:

1. Se ha identificado un nuevo mecanismo de muerte celular aguda por reoxigenación independiente de la hipercontractura y de carácter mayoritariamente necrótico, en un modelo celular de cardiomiocitos adultos en cultivo (células HL-1) en respuesta a un protocolo de isquemia/reoxigenación in vitro.
2. Esta muerte celular se asocia a la normalización del pH y puede prevenirse con una reoxigenación ácida (paradoja del pH). Además esta es regulada por un mecanismo independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.
3. La administración de glicina 3 mM durante la reoxigenación es capaz de abolir la muerte celular asociada a la normalización del pH. Su efecto es dosis-dependiente, con una  $\text{EC}_{50}$  de 1.2 mM.
4. El efecto citoprotector de la glicina no está relacionado con la modificación del pH o del  $\text{Na}^+$  intracelulares, ni con la prevención de la activación de fosfolipasas o proteasas o con la generación de radicales libres.
5. El bloqueo del VDAC, canal localizado en la membrana externa de la mitocondria e implicado en la apertura del PTPm, con Ruthenium Red es capaz de reducir la muerte celular asociada a la corrección del pH. El efecto observado por el Ruthenium Red sobre el daño por reoxigenación podría reflejar que éste se produce por la apertura del PTPm.
6. La reoxigenación a pH 7.2 tras 60 minutos de isquemia simulada se asocia a una abrupta apertura del PTPm, determinada por una reducción de la absorbancia observada a 550 nm (edema mitocondrial).
7. La acidosis inhibe la apertura del PTPm durante la reoxigenación.

8. La glicina, a concentraciones 3–10 mM inhibe eficazmente la apertura del PTPm asociada a la normalización del pH durante la reoxigenación, como a la exposición a concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones normóxicas.
  
9. La concentración intracelular de glicina cae durante la isquemia simulada/reoxigenación. La adición de glicina 3 mM al medio extracelular durante la reoxigenación eleva la concentración intracelular del aminoácido y permite alcanzar valores en el rango necesario para inhibir la apertura del PTPm.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abello, P. A., Buchman, T. G., & Bulkley, G. B. (1994). Shock and multiple organ failure. *Adv.Exp.Med.Biol* **366:253-68.**, 253-268.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walters, P. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, 4a edición ed. Garland Publishing (USA).
- Aleo, M. D. & Schnellmann, R. G. (1992). The neurotoxicants strychnine and bicuculline protect renal proximal tubules from mitochondrial inhibitor-induced cell death. *Life Sci* **51**, 1783-1787.
- Allshire, A., Piper, H. M., Cuthbertson, K. S., & Cobbold, P. H. (1987). Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem.J* **244**, 381-385.
- Amin, K., Li, J., Chao, W. R., Dewhirst, M. W., & Haroon, Z. A. (2003). Dietary glycine inhibits angiogenesis during wound healing and tumor growth. *Cancer Biol Ther.* **2**, 173-178.
- Aprison, M. H. & Werman, R. (1965). The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci* **4**, 2075-2083.
- Bachmann, S., Peng, X. X., Currin, R. T., Thurman, R. G., & Lemasters, J. J. (1995). Glycine in Carolina rinse solution reduces reperfusion injury, improves graft function, and increases graft survival after rat liver transplantation. *Transplant.Proc* **27**, 741-742.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* **14:649-83.**, 649-683.
- Barrabés, J. A., Garcia-Dorado, D., Oliveras, J., Gonzalez, M. A., Ruiz-Meana, M., Solares, J., Burillo, A. G., Lidon, R. M., Antolin, M., Castell, J., & Soler-Soler, J. (1996a). Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Pflugers Arch.* **432**, 663-670.
- Barrabés, J. A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Piper, H. M., Solares, J., Gonzalez, M. A., Oliveras, J., Herrejon, M. P., & Soler, S. J. (1996b). Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch.* **431**, 519-526.

- Blaustein, M. P. & Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev.* **79**, 763-854.
- Bond, J. M., Chacon, E., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1993). Intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am.J Physiol* **265**, C129-C137.
- Bond, J. M., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1991a). Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **179**, 798-803.
- Bond, J. M., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1991b). Recovery of cultured rat neonatal myocytes from hypercontracture after chemical hypoxia. *Res Commun.Chem Pathol Pharmacol.* **71**, 195-208.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72:248-54.**, 248-254.
- Breitinger, H. G. & Becker, C. M. (2002). The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. *Chembiochem.* **3**, 1042-1052.
- Carini, R., Bellomo, G., Grazia, D. C., & Albano, E. (1997). Glycine protects against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na<sup>+</sup> overload in the rat. *Hepatology* **26**, 107-112.
- Cesura, A. M., Pinard, E., Schubanel, R., Goetschy, V., Friedlein, A., Langen, H., Polcic, P., Forte, M. A., Bernardi, P., & Kemp, J. A. (2003). The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **278**, 49812-49818.
- Chatterjee, S. S., Kondratskaya, E. L., & Krishtal, O. A. (2003). Structure-activity studies with Ginkgo biloba extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1:S68-77.**, S68-S77.
- Chaudary, N., Shuralyova, I., Liron, T., Sweeney, G., & Coe, I. R. (2002). Transport characteristics of HL-1 cells: a new model for the study of adenosine physiology in cardiomyocytes. *Biochem.Cell Biol* **80**, 655-665.
- Clarke, S. J., McStay, G. P., & Halestrap, A. P. (2002). Sangliferhin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* **20; 277**, 34793-34799.

- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., & Izzo, N. J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **95**, 2979-2984.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem.J* **341**, 233-249.
- Cummings, B. S., McHowat, J., & Schnellmann, R. G. (2000). Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **294**, 793-799.
- Currin, R. T., Caldwell-Kenkel, J. C., Lichtman, S. N., Bachmann, S., Takei, Y., Kawano, S., Thurman, R. G., & Lemasters, J. J. (1996). Protection by Carolina rinse solution, acidotic pH, and glycine against lethal reperfusion injury to sinusoidal endothelial cells of rat livers stored for transplantation. *Transplantation* **62**, 1549-1558.
- Currin, R. T., Gores, G. J., Thurman, R. G., & Lemasters, J. J. (1991). Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB J* **5**, 207-210.
- Davidoff, R. A., Graham, L. T., Jr., Shank, R. P., Werman, R., & Aprison, M. H. (1967). Changes in amino acid concentrations associated with loss of spinal interneurons. *J Neurochem.* **14**, 1025-1031.
- De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M. K., Schubert, A., Grimm, S., Hanson, G. T., Remington, S. J., Youle, R. J., & Ichas, F. (2002). The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* **16**, 607-609.
- Dekker, L. R., Fiolet, J. W., VanBavel, E., Coronel, R., Opthof, T., Spaan, J. A., & Janse, M. J. (1996). Intracellular Ca<sup>2+</sup>, intercellular electrical coupling, and mechanical activity in ischemic rabbit papillary muscle. Effects of preconditioning and metabolic blockade. *Circ Res* **79**, 237-246.
- Deters, M., Strubelt, O., & Younes, M. (1997). Protection by glycine against hypoxia-reoxygenation induced hepatic injury. *Res.Commun.Mol.Pathol Pharmacol.* **97**, 199-213.
- Di Lisa, F., Menabo, R., Canton, M., Barile, M., & Bernardi, P. (2001). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* **276**, 2571-2575.

- Dong, Z., Patel, Y., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (1998). Development of porous defects in plasma membranes of adenosine triphosphate-depleted Madin-Darby canine kidney cells and its inhibition by glycine. *Lab Invest* **78**, 657-668.
- Duchen, M. R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* **516**, 1-17.
- Duchen, M. R., McGuinness, O., Brown, L. A., & Crompton, M. (1993). On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **27**, 1790-1794.
- Edelstein, C. L., Ling, H., Gengaro, P. E., Nemenoff, R. A., Bahr, B. A., & Schrier, R. W. (1997). Effect of glycine on prelethal and postlethal increases in calpain activity in rat renal proximal tubules. *Kidney Int.* **52**, 1271-1278.
- Estacion, M., Weinberg, J. S., Sinkins, W. G., & Schilling, W. P. (2003). Blockade of maitotoxin-induced endothelial cell lysis by glycine and L-alanine. *Am.J Physiol Cell Physiol* **284**, C1006-C1020.
- Frank, A., Rauen, U., & de Groot, H. (2000). Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J Hepatol.* **32**, 58-66.
- Froh, M., Thurman, R. G., & Wheeler, M. D. (2002). Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **283**, G856-G863.
- Ganote, C. E. (1983). Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol.Cell Cardiol.* **15**, 67-73.
- Garcia-Dorado, D. (2003). Myocardial Cell Protection in Acute Coronary Syndromes. In *Acute Coronary Syndromes. A Companion to Braunwald's Heart Disease*, ed. Théroux P, pp. 453-472. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Garcia-Dorado, D., Gonzalez, M. A., Barrabés, J. A., Ruiz-Meana, M., Solares, J., Lidon, R. M., Blanco, J., Puigfel, Y., Piper, H. M., & Soler-Soler, J. (1997a). Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na(+)-H+ exchange. *Cardiovasc Res* **35**, 80-89.
- Garcia-Dorado, D., Inserte, J., Ruiz-Meana, M., Gonzalez, M. A., Solares, J., Julia, M., Barrabés, J. A., & Soler-Soler, J. (1997b). Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **96**, 3579-3586.

- Garcia-Dorado, D., Oliveras, J., Gili, J., Sanz, E., Perez-Villa, F., Barrabés, J., Carreras, M. J., Solares, J., & Soler-Soler, J. (1993). Analysis of myocardial oedema by magnetic resonance imaging early after coronary artery occlusion with or without reperfusion. *Cardiovasc Res* **27**, 1462-1469.
- Garcia-Dorado, D. & Ruiz-Meana, M. (2000). Propagation of Cell Death During Myocardial Reperfusion. *News Physiol Sci* **15:326-330.**, 326-330.
- Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Desco, M., Solares, J., Elizaga, J., Fernandez-Aviles, F., Alonso, J., & Soriano, J. (1989). Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am.J Physiol* **256**, H1266-H1273.
- Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Duran, J. M., Solares, J., Alonso, J., Sanz, E., Munoz, R., Elizaga, J., Botas, J., Fernandez-Aviles, F., & . (1992a). Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* **85**, 1160-1174.
- Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Munoz, R., Alonso, J., Elizaga, J., Fernandez-Aviles, F., Botas, J., Solares, J., Soriano, J., & Duran, J. M. (1992b). Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am.J Physiol* **262**, H17-H22.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., & Schindler, P. A. (1996). The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* **271**, 8796-8799.
- Gincel, D., Zaid, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem.J* **358**, 147-155.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev.* **83**, 731-801.
- Gonzalez-Juanatey, J. R., Iglesias, M. J., Alcaide, C., Pineiro, R., & Lago, F. (2003). Doxazosin induces apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro by a mechanism that is independent of alpha1-adrenergic blockade. *Circulation* **107**, 127-131.
- Gores, G. J., Nieminen, A. L., Wray, B. E., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1989). Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin.Invest* **83**, 386-396.

- Granville, D. J. & Gottlieb, R. A. (2003). The mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) as a therapeutic target for initiating cell death. *Curr.Med.Chem* **10**, 1527-1533.
- Greferath, U., Brandstatter, J. H., Wassle, H., Kirsch, J., Kuhse, J., & Grunert, U. (1994). Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Vis.Neurosci.* **11**, 721-729.
- Griffiths, E. J. (2000). Use of ruthenium red as an inhibitor of mitochondrial Ca(2+) uptake in single rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* **486**, 257-260.
- Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem.J* **307**, 93-98.
- Grotz, M. R., Pape, H. C., van Griensven, M., Stalp, M., Rohde, F., Bock, D., & Krettek, C. (2001). Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats. *Shock* **16**, 116-121.
- Halestrap, A. P. (1991). Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem.J* **278**, 715-719.
- Halestrap, A. P., Clarke, S. J., & Javadov, S. A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**, 372-385.
- Hall, J. C. (1998). Glycine. *JPEN J Parenter.Enteral Nutr.* **22**, 393-398.
- Hanada, T. & Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 413-421.
- Harper, I. S., Bond, J. M., Chacon, E., Reece, J. M., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1993). Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange preserves viability, restores mechanical function, and prevents the pH paradox in reperfusion injury to rat neonatal myocytes. *Basic Res Cardiol.* **88**, 430-442.
- Herman, B., Nieminen, A. L., Gores, G. J., & Lemasters, J. J. (1988). Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability. *FASEB J* **2**, 146-151.

- Heyman, S., Spokes, K., Rosen, S., & Epstein, F. H. (1992). Mechanism of glycine protection in hypoxic injury: analogies with glycine receptor. *Kidney Int.* **42**, 41-45.
- Holmuamedov, E. L., Jovanovic, S., Dzeja, P. P., Jovanovic, A., & Terzic, A. (1998). Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am.J Physiol* **275**, H1567-H1576.
- Ichas, F., Jouaville, L. S., & Mazat, J. P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**, 1145-1153.
- Iimuro, Y., Bradford, B. U., Forman, D. T., & Thurman, R. G. (1996). Glycine prevents alcohol-induced liver injury by decreasing alcohol in the rat stomach. *Gastroenterology* **110**, 1536-1542.
- Ikejima, K., Iimuro, Y., Forman, D. T., & Thurman, R. G. (1996). A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am.J Physiol* **271**, G97-103.
- Ikejima, K., Qu, W., Stachlewitz, R. F., & Thurman, R. G. (1997). Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am.J Physiol* **272**, G1581-G1586.
- Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., Barrabés, J. A., Pina, P., Agullo, L., Piper, H. M., & Soler-Soler, J. (2002). Effect of inhibition of Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* **55**, 739-748.
- Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Solares, J., & Soler, J. (1997). The role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange occurring during hypoxia in the genesis of reoxygenation-induced myocardial oedema. *J Mol.Cell Cardiol.* **29**, 1167-1175.
- Jacob, T., Ascher, E., Hingorani, A., & Kallakuri, S. (2003). Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Surgery* **134**, 457-466.
- Javadov, S. A., Lim, K. H., Kerr, P. M., Suleiman, M. S., Angelini, G. D., & Halestrap, A. P. (2000). Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* **45**, 360-369.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* **82**, 503-568.
- Jordan, J. E., Zhao, Z. Q., & Vinten-Johansen, J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **43**, 860-878.

- Kandel, E. R., Schwartz J.H., Jessel T.M., & . (2000). *Principles of neural science*, 4th Edition ed. McGraw-Hill, New York.
- Kim, J. S., He, L., & Lemasters, J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **304**, 463-470.
- Klein, H. H., Nebendahl, K., Schubothe, M., & Kreuzer, H. (1985). Intracoronary hyperosmotic mannitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Basic Res Cardiol.* **80**, 251-259.
- Klein, H. H., Pich, S., Bohle, R. M., Wollenweber, J., & Nebendahl, K. (1995). Myocardial protection by Na(+)-H+ exchange inhibition in ischemic, reperfused porcine hearts. *Circulation* **92**, 912-917.
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R., & Wallace, D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**, 461-465.
- Kondratskaya, E. L., Lishko, P. V., Chatterjee, S. S., & Krishtal, O. A. (2002). BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel. *Neurochem.Int.* **40**, 647-653.
- Koretsune, Y. & Marban, E. (1990). Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of  $[Ca^{2+}]_i$  elevation and ATP depletion. *Am.J Physiol* **258**, H9-16.
- Kruman, I. I. & Mattson, M. P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem.* **72**, 529-540.
- Kuhse, J., Betz, H., & Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr.Opin.Neurobiol.* **5**, 318-323.
- Ladilov, Y. V., Siegmund, B., Balsler, C., & Piper, H. M. (1997). Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* **80**, 69-75.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lemasters, J. J. (1999). V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am.J Physiol* **276**, G1-G6.



- Lemasters, J. J., Bond, J. M., Chacon, E., Harper, I. S., Kaplan, S. H., Ohata, H., Trollinger, D. R., Herman, B., & Cascio, W. E. (1996). The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* **76:99-114.**, 99-114.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., & Herman, B. (1997). The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol.Cell Biochem.* **174**, 159-165.
- Li, X., Bradford, B. U., Wheeler, M. D., Stimpson, S. A., Pink, H. M., Brodie, T. A., Schwab, J. H., & Thurman, R. G. (2001). Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infect.Immun.* **69**, 5883-5891.
- Llebadot González, J. (2004). *Síndromes Coronarios AGudos*, 1ª edición ed. Elsevier (España).
- Majno, G. & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am.J Pathol* **146**, 3-15.
- Mangino, J. E., Kotadia, B., & Mangino, M. J. (1996). Characterization of hypothermic intestinal ischemia-reperfusion injury in dogs. Effects of glycine. *Transplantation* **62**, 173-178.
- Marin-Garcia, J. & Goldenthal, M. J. (2002). [The mitochondrial organelle and the heart]. *Rev.Esp.Cardiol.* **55**, 1293-1310.
- Marsh, D. C., Vreugdenhil, P. K., Mack, V. E., Belzer, F. O., & Southard, J. H. (1993). Glycine protects hepatocytes from injury caused by anoxia, cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. *Hepatology* **17**, 91-98.
- Matilla, B., Mauriz, J. L., Culebras, J. M., Gonzalez-Gallego, J., & Gonzalez, P. (2002). [Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient]. *Nutr.Hosp.* **17**, 2-9.
- Mauriz, J. L., Matilla, B., Culebras, J. M., Gonzalez, P., & Gonzalez-Gallego, J. (2001). Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radic.Biol Med.* **31**, 1236-1244.
- McWhinney, C. D., Hansen, C., & Robishaw, J. D. (2000). Alpha-1 adrenergic signaling in a cardiac murine atrial myocyte (HL-1) cell line. *Mol.Cell Biochem.* **214**, 111-119.
- Meizel, S. (1997). Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod.* **56**, 569-574.

- Miller, G. W. & Schnellmann, R. G. (1993). Cytoprotection by inhibition of chloride channels: the mechanism of action of glycine and strychnine. *Life Sci* **53**, 1211-1215.
- Miller, G. W. & Schnellmann, R. G. (1994). A putative cytoprotective receptor in the kidney: relation to the neuronal strychnine-sensitive glycine receptor. *Life Sci* **55**, 27-34.
- Miller, G. W. & Schnellmann, R. G. (1995). Inhibitors of renal chloride transport do not block toxicant-induced chloride influx in the proximal tubule. *Toxicol.Lett.* **76**, 179-184.
- Neilan, C. L., Kenyon, E., Kovach, M. A., Bowden, K., Claycomb, W. C., Traynor, J. R., & Bolling, S. F. (2000). An immortalized myocyte cell line, HL-1, expresses a functional delta -opioid receptor. *J Mol.Cell Cardiol.* **32**, 2187-2193.
- Nichols, J. C., Bronk, S. F., Mellgren, R. L., & Gores, G. J. (1994). Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes. *Gastroenterology* **106**, 168-176.
- Nishimura, Y. & Lemasters, J. J. (2001). Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death.Differ.* **8**, 850-858.
- Nissim, I., Hardy, M., Pleasure, J., Nissim, I., & States, B. (1992). A mechanism of glycine and alanine cytoprotective action: stimulation of stress-induced HSP70 mRNA. *Kidney Int.* **42**, 775-782.
- Omasa, M., Fukuse, T., Toyokuni, S., Mizutani, Y., Yoshida, H., Ikeyama, K., Hasegawa, S., & Wada, H. (2003). Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model. *Transplantation* **75**, 591-598.
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., & Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys.J* **76**, 725-734.
- Pfeiffer, F. & Betz, H. (1981). Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Res* **226**, 273-279.
- Pfeiffer, F., Graham, D., & Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* **257**, 9389-9393.

- Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G., & Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **81**, 7224-7227.
- Phillis, J. W. & O'Regan, M. H. (2003). Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem.Int.* **43**, 461-467.
- Piper, H. M., Abdallah, Y., & Schafer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**, 365-371.
- Piper, H. M., Balsler, C., Ladilov, Y. V., Schafer, M., Siegmund, B., Ruiz-Meana, M., & Garcia-Dorado, D. (1996). The role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol.* **91**, 191-202.
- Piper, H. M. & Garcia-Dorado, D. (1999). Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *Ann.Thorac.Surg.* **68**, 1913-1919.
- Piper, H. M., Garcia-Dorado, D., & Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **38**, 291-300.
- Qian, T., Nieminen, A. L., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1997). Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am.J Physiol* **273**, C1783-C1792.
- Qu, W., Ikejima, K., Zhong, Z., Waalkes, M. P., & Thurman, R. G. (2002). Glycine blocks the increase in intracellular free Ca<sup>2+</sup> due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **283**, G1249-G1256.
- Rajendra, S., Lynch, J. W., & Schofield, P. R. (1997). The glycine receptor. *Pharmacol.Ther.* **73**, 121-146.
- Rajendran, V. M., Geibel, J., & Binder, H. J. (1995). Chloride-dependent Na-H exchange. A novel mechanism of sodium transport in colonic crypts. *J Biol Chem* **270**, 11051-11054.
- Rasmusson, R. L., Davis, D. G., & Lieberman, M. (1993). Amino acid loss during volume regulatory decrease in cultured chick heart cells. *Am.J Physiol* **264**, C136-C145.
- Rodriguez-Sinovas, A., Garcia-Dorado, D., Padilla, F., Inserte, J., Barrabés, J. A., Ruiz-Meana, M., Agullo, L., & Soler-Soler, J. (2003). Pre-treatment with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* **58**, 109-117.

- Rose, M. L., Cattley, R. C., Dunn, C., Wong, V., Li, X., & Thurman, R. G. (1999a). Dietary glycine prevents the development of liver tumors caused by the peroxisome proliferator WY-14,643. *Carcinogenesis* **20**, 2075-2081.
- Rose, M. L., Madren, J., Bunzendahl, H., & Thurman, R. G. (1999b). Dietary glycine inhibits the growth of B16 melanoma tumors in mice. *Carcinogenesis* **20**, 793-798.
- Roth, E., Zellner, M., Wessner, B., Strasser, E., Manhart, N., Oehler, R., & Spittler, A. (2003). Glycine--an inert amino acid comes alive. *Nutrition* **19**, 817-818.
- Ruiz-Meana M. (1997). Mecanismo del daño mecánico letal por reoxigenación en miocitos cardíacos. Tesis Doctoral. Hospital Universitario Vall d'Hebrón. UAB.
- Ruiz-Meana M, Pina P, Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., Barba I, Miro E, Mirabet, M., & Soler-Soler, J. (2004). Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J.Physiol.*(2<sup>a</sup> Revisión).
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Gonzalez, M. A., Barrabés, J. A., & Soler-Soler, J. (1995). Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res* **30**, 64-69.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Hofstaetter, B., Piper, H. M., & Soler-Soler, J. (1999). Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res* **85**, 280-287.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Lane, S., Pina, P., Inserte, J., Mirabet, M., & Soler-Soler, J. (2001). Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia. *Am.J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2563-H2571.
- Sartiani, L., Bochet, P., Cerbai, E., Mugelli, A., & Fischmeister, R. (2002). Functional expression of the hyperpolarization-activated, non-selective cation current I(f) in immortalized HL-1 cardiomyocytes. *J Physiol* **545**, 81-92.
- Schafer, C., Ladilov, Y. V., Siegmund, B., & Piper, H. M. (2000). Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am.J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1457-H1463.
- Schemmer, P., Bradford, B. U., Rose, M. L., Bunzendahl, H., Raleigh, J. A., Lemasters, J. J., & Thurman, R. G. (1999). Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am.J Physiol* **276**, G924-G932.

- Schemmer, P., Golling, M., Kraus, T., Mayatepek, E., Herfarth, C., & Klar, E. (2001). Glycine reduces reperfusion injury in human liver transplantation: our first patients. *Transplant.Proc* **33**, 3750-3752.
- Schmieden, V. & Betz, H. (1995). Pharmacology of the inhibitory glycine receptor: agonist and antagonist actions of amino acids and piperidine carboxylic acid compounds. *Mol.Pharmacol.* **48**, 919-927.
- Siegmund, B., Kliez, T., Schwartz, P., & Piper, H. M. (1991). Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am.J Physiol* **260**, H426-H435.
- Siegmund, B., Schlack, W., Ladilov, Y. V., Balsler, C., & Piper, H. M. (1997). Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* **96**, 4372-4379.
- Siegmund, B., Zude, R., & Piper, H. M. (1992). Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca<sup>2+</sup> overload. *Am.J Physiol* **263**, H1262-H1269.
- Simpson, R. K., Jr., Robertson, C. S., & Goodman, J. C. (1993). Glycine: an important potential component of spinal shock. *Neurochem.Res* **18**, 887-892.
- Solares, J., Garcia-Dorado, D., Oliveras, J., Gonzalez, M. A., Ruiz-Meana, M., Barrabés, J. A., Gonzalez-Bravo, C., & Soler-Soler, J. (1995). Contraction band necrosis at the lateral borders of the area at risk in reperfused infarcts. Observations in a pig model of in situ coronary occlusion. *Virchows Arch.* **426**, 393-399.
- Song, D., O'Regan, M. H., & Phillis, J. W. (1998a). Amino acid release during volume regulation by cardiac cells: cellular mechanisms. *Eur.J Pharmacol.* **341**, 273-280.
- Song, D., O'Regan, M. H., & Phillis, J. W. (1998b). Mechanisms of amino acid release from the isolated anoxic/reperfused rat heart. *Eur.J Pharmacol.* **351**, 313-322.
- Spittler, A., Reissner, C. M., Oehler, R., Gornikiewicz, A., Gruenberger, T., Manhart, N., Brodowicz, T., Mittlboeck, M., Boltz-Nitulescu, G., & Roth, E. (1999). Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF- $\alpha$  production and accelerated IL-10 expression. *FASEB J* **13**, 563-571.
- Spray, D. C., White, R. L., Mazet, F., & Bennett, M. V. (1985). Regulation of gap junctional conductance. *Am.J Physiol* **248**, H753-H764.

- Stachlewitz, R. F., Li, X., Smith, S., Bunzendahl, H., Graves, L. M., & Thurman, R. G. (2000). Glycine inhibits growth of T lymphocytes by an IL-2-independent mechanism. *J Immunol.* **164**, 176-182.
- Stachlewitz, R. F., Seabra, V., Bradford, B., Bradham, C. A., Rusyn, I., Germolec, D., & Thurman, R. G. (1999). Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology* **29**, 737-745.
- Steenbergen, C., Hill, M. L., & Jennings, R. B. (1985). Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* **57**, 864-875.
- Steenbergen, C., Murphy, E., Watts, J. A., & London, R. E. (1990). Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* **66**, 135-146.
- Tani, M. & Neely, J. R. (1989). Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ Res* **65**, 1045-1056.
- Tariq, M. & Al Moutaery, A. R. (1997). Studies on the antisecretory, gastric anti-ulcer and cytoprotective properties of glycine. *Res Commun.Mol.Pathol Pharmacol.* **97**, 185-198.
- Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **279**, L1005-L1028.
- Thurman, R. G., Zhong, Z., von Frankenberg, M., Stachlewitz, R. F., & Bunzendahl, H. (1997). Prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity with dietary glycine. *Transplantation* **63**, 1661-1667.
- Tijssen, M. J., Peters, S. M., Bindels, R. J., van Os, C. H., & Wetzels, J. F. (1997). Glycine protection against hypoxic injury in isolated rat proximal tubules: the role of proteases. *Nephrol.Dial.Transplant.* **12**, 2549-2556.
- Tokutomi, N., Kaneda, M., & Akaike, N. (1989). What confers specificity on glycine for its receptor site? *Br.J Pharmacol.* **97**, 353-360.
- Tsao, P. S., Aoki, N., Lefer, D. J., Johnson, G., III, & Lefer, A. M. (1990). Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* **82**, 1402-1412.

- Tsune, I., Ikejima, K., Hirose, M., Yoshikawa, M., Enomoto, N., Takei, Y., & Sato, N. (2003). Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology* **125**, 775-785.
- Venkatachalam, M. A., Weinberg, J. M., Patel, Y., Saikumar, P., & Dong, Z. (1996). Cytoprotection of kidney epithelial cells by compounds that target amino acid gated chloride channels. *Kidney Int.* **49**, 449-460.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol.Methods* **184**, 39-51.
- Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **61**, 481-497.
- Waters, S. L. & Schnellmann, R. G. (1996). Extracellular acidosis and chloride channel inhibitors act in the late phase of cellular injury to prevent death. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **278**, 1012-1017.
- Waters, S. L. & Schnellmann, R. G. (1998). Examination of the mechanisms of action of diverse cytoprotectants in renal cell death. *Toxicol.Pathol* **26**, 58-63.
- Weinberg, J. M., Davis, J. A., Abarzua, M., & Rajan, T. (1987). Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J Clin.Invest* **80**, 1446-1454.
- Weinbrenner, C., Baines, C. P., Liu, G. S., Armstrong, S. C., Ganote, C. E., Walsh, A. H., Honkanen, R. E., Cohen, M. V., & Downey, J. M. (1998). Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* **98**, 899-905.
- Weiss, J. N., Korge, P., Honda, H. M., & Ping, P. (2003). Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ.Res.* **93**, 292-301.
- Wheeler, M., Stachlewitz, R. F., Yamashina, S., Ikejima, K., Morrow, A. L., & Thurman, R. G. (2000a). Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J* **14**, 476-484.
- Wheeler, M. D., Ikejima, K., Enomoto, N., Stacklewitz, R. F., Seabra, V., Zhong, Z., Yin, M., Schemmer, P., Rose, M. L., Rusyn, I., Bradford, B., & Thurman, R. G. (1999). Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol.Life Sci* **56**, 843-856.

- Wheeler, M. D., Rose, M. L., Yamashima, S., Enomoto, N., Seabra, V., Madren, J., & Thurman, R. G. (2000b). Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **279**, L390-L398.
- White, S. M., Constantin, P. E., & Claycomb, W. C. (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **286**, H823-H829.
- Yadid, G., Goldstein, D. S., Pacak, K., Kopin, I. J., & Golomb, E. (1995). Functional alpha 3-glycine receptors in rat adrenal. *Eur.J Pharmacol.* **288**, 399-401.
- Yamashina, S., Konno, A., Wheeler, M. D., Rusyn, I., Rusyn, E. V., Cox, A. D., & Thurman, R. G. (2001). Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr.Cancer* **40**, 197-204.
- Yin, M., Currin, R. T., Peng, X. X., Mekeel, H. E., Schoonhoven, R., & Lemasters, J. J. (2002). Carolina rinse solution minimizes kidney injury and improves graft function and survival after prolonged cold ischemia. *Transplantation* **73**, 1410-1420.
- Yin, M., Ikejima, K., Arteel, G. E., Seabra, V., Bradford, B. U., Kono, H., Rusyn, I., & Thurman, R. G. (1998). Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **286**, 1014-1019.
- Young, A. B. & Snyder, S. H. (1973). Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **70**, 2832-2836.
- Yu, L., Netticadan, T., Xu, Y. J., Panagia, V., & Dhalla, N. S. (1998). Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced increase in intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **286**, 1-8.
- Zamzami, N. & Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol* **2**, 67-71.
- Zhang, Y., Ikejima, K., Honda, H., Kitamura, T., Takei, Y., & Sato, N. (2000). Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology* **32**, 542-546.
- Zhong, Z., Arteel, G. E., Connor, H. D., Yin, M., Frankenberg, M. V., Stachlewitz, R. F., Raleigh, J. A., Mason, R. P., & Thurman, R. G. (1998). Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am.J Physiol* **275**, F595-F604.



Zhong, Z., Enomoto, N., Connor, H. D., Moss, N., Mason, R. P., & Thurman, R. G. (1999). Glycine improves survival after hemorrhagic shock in the rat. *Shock* **12**, 54-62.

Zhong, Z., Li, X., Yamashina, S., von Frankenberg, M., Enomoto, N., Ikejima, K., Kolinsky, M., Raleigh, J. A., & Thurman, R. G. (2001). Cyclosporin A causes a hypermetabolic state and hypoxia in the liver: prevention by dietary glycine. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **299**, 858-865.

Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B., & Lemasters, J. J. (2003). L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* **6**, 229-240.

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol.Ther.* **92**, 57-70.