

El acondicionamiento isquémico preserva la distrofina a través de la inhibición de la metaloproteínasa de la matriz de tipo 2

Ischemic Preconditioning Preserves Dystrophin Through Matrix Metalloproteinase-2 Inhibition

NADEZDA SIACHOQUE^{1,*}, BRUNO BUCHHOLZ^{MTSAC, 1}, VERÓNICA MIKSZTOWICZ², CRISTIAN GARMENDIA¹, AILÍN GOYENECHÉ¹, GABRIELA BERG², MANUEL RODRÍGUEZ^{MTSAC, 1}, MARTÍN DONATO^{MTSAC, 1,**}

Recibido: 21/11/2012
Aceptado: 07/02/2013

Dirección para separatas:
Dr. Martín Donato
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
J. E. Uriburu 950 - 2º Piso (C1114AAD) Buenos Aires, Argentina
Tel./Fax: 54 11 4962 4945
e-mail: mdonato@fmed.uba.ar

RESUMEN

Introducción

La lesión por isquemia/reperfusión produce la muerte celular por diferentes vías, algunas de las cuales llevan a la rotura de la membrana plasmática. En los miocitos cardíacos, la distrofina, junto con la espectrina, otorga estabilidad a la membrana celular; al mismo tiempo que asocia el medio intracelular con el extracelular. La degradación de la distrofina produce fragilidad de la membrana. Se ha sugerido que el acondicionamiento isquémico es capaz de atenuar este daño; sin embargo, el mecanismo se desconoce.

Objetivo

Determinar si el acondicionamiento isquémico previene la degradación de la distrofina a través de la inhibición de la metaloproteínasa de la matriz de tipo 2 (MMP-2).

Material y métodos

Corazones aislados de conejo se trataron de la siguiente manera: G1 (n = 5): perfundidos por 30 min (Nx); G2 (n = 6): 30 min de isquemia global (GI) sin reperfusión; G3 (n = 5): se repitió el protocolo de G2 pero se reperfundió por 180 min (I/R); G4 (n = 5): los corazones se trataron con doxiciclina (inhibidor de las MMP) antes de la isquemia global; G5 (n = 6): corazones normóxicos tratados con SIN-1 (dador de ONOO⁻); G6 (n = 5): se administró doxiciclina durante 5 min, previo a la administración de SIN-1; G7 y G8 (n = 5): se realizó acondicionamiento previo a 30 min de isquemia con reperfusión y sin reperfusión, respectivamente. La expresión de la distrofina disminuyó durante la isquemia en un 21% respecto de los valores control (p < 0,05); la expresión de la espectrina se mantuvo sin cambios. La actividad de la MMP-2 aumentó en un 71% durante la isquemia en comparación con los valores control (p < 0,05). La administración de doxiciclina antes de la isquemia evitó la degradación de la distrofina. En corazones normóxicos, el SIN-1 aumentó las sustancias reactivas derivadas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en un 33% (p < 0,05) y la actividad de la MMP-2 en un 36% (p < 0,05); además, redujo significativamente la expresión de la distrofina a un 23% con respecto a los valores control. El acondicionamiento isquémico atenuó de manera significativa la degradación de la distrofina por inhibición de la actividad de la MMP-2.

Conclusiones

La activación de la MMP-2, debido a un aumento en el estrés oxidativo, es responsable de la degradación de la distrofina. El acondicionamiento isquémico atenúa la degradación de la distrofina mediante la inhibición de la actividad de la MMP-2.

REV ARGENT CARDIOL 2013;81:7-14. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v81.i1.2155>

Palabras clave > Precondicionamiento isquémico - Distrofina - Metaloproteínasa 2 de la matriz

Abreviaturas >

I/R	Isquemia/reperfusión	PKC	Proteínasina C
MMP-2	Metaloproteínasa de la matriz de tipo 2	PPC	Presión de perfusión coronaria
Nx	Normóxico	SIN-1	N-morfolinosidnonimina clorhidrato
Pc	Precondicionamiento	TBARS	Sustancias reactivas derivadas del ácido tiobarbitúrico

^{MTSAC} Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

² Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

* Becaria de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires

** Miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

FINANCIAMIENTO: Este trabajo fue financiado por subsidios de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT B069) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (05/PICT13069; 06/PICT01071).

INTRODUCCIÓN

La lesión por isquemia/reperfusión (I/R) produce la muerte celular por diferentes vías, algunas de las cuales tienen como punto final común la rotura de la membrana plasmática. En los miocitos cardíacos existen tres grupos importantes de proteínas estructurales del citoesqueleto que confieren estabilidad a la membrana celular, al mismo tiempo que unen el medio intracelular con el extracelular: el complejo de proteínas asociadas con la distrofina, el eje vinculina-integrina y el citoesqueleto submembranoso basado en espectrina. (1) En el contexto de la isquemia aguda, Armstrong y colaboradores (2) demostraron que la depleción de distrofina y espectrina es una manifestación temprana del daño miocárdico, coincidente con el desarrollo de fragilidad osmótica celular. Estos resultados fueron confirmados por Rodríguez y colaboradores, (3) quienes mostraron que existe una sensibilidad diferente de las proteínas relacionadas con la membrana frente a la lesión por I/R. Estos autores demostraron que los componentes submembranosos de los distintos complejos de proteínas citoesqueléticas fueron más afectados que las proteínas de transmembrana y que, entre ellas, la distrofina fue la más sensible al daño. Tales alteraciones ocurrieron durante la isquemia y no fueron revertidas por la reperfusión.

Dado que la distrofina se degrada durante la isquemia, es necesario un mecanismo de protección que se active antes de este período para intentar atenuar el daño de la membrana. En este sentido, se ha demostrado que el preconditionamiento (Pc) isquémico media la restauración de la distrofina durante la reperfusión, lo cual implicaría un efecto cardioprotector contra la lesión por I/R. (4) Sin embargo, el mecanismo por el cual atenúa la degradación de la distrofina no se conoce. Algunos autores sugieren que las calpaínas podrían degradar la distrofina durante el proceso de remodelación posinfarto de miocardio. (5) Sin embargo, en el contexto del daño por I/R, la activación de la calpaína no ocurre durante la isquemia, sino durante la reperfusión, causando fragilidad del sarcolema y degradación de otras proteínas tales como la espectrina y la ankirina. (6) Por el contrario, la metaloproteinasas de la matriz de tipo 2 (MMP-2) cumple un papel importante en la lesión miocárdica temprana por I/R (7) y es conocido que se activa durante la isquemia. Además, parece que existe una superposición de sustratos y acciones biológicas entre las calpaínas y la MMP-2. En consecuencia, no está completamente demostrado si la distrofina es degradada por las calpaínas o por la MMP-2 y si este efecto puede ser revertido por el Pc isquémico.

Con esto en mente realizamos el presente trabajo cuyo objetivo principal fue determinar si el Pc isquémico preserva a la distrofina a través de la inhibición de la actividad de la MMP-2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en 42 conejos machos neozelandeses de 1,8 a 2,5 kg. Los procedimientos utilizados en el estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Res. CD. 2079/07), en acuerdo con las Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicadas por los National Institutes of Health (USA). (8)

Procedimiento quirúrgico

Los conejos fueron sacrificados con pentobarbital (150 mg/kg IV). Cada corazón se extirpó rápidamente y fue montado por la raíz de la aorta en un sistema de perfusión para órgano aislado según la técnica de Langendorff. Los corazones se perfundieron con *buffer* Krebs-Henseleit que contiene: NaCl 118,5 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 24,8 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM y glucosa 10 mM, a un pH de 7,2-7,4. La temperatura se mantuvo en 37 °C, y además el *buffer* fue burbujeado con gas carbógeno (95% O₂ - 5% CO₂). Se colocaron dos electrodos que se conectaron a un marcapasos para mantener una frecuencia cardíaca constante de 200 latidos por minuto.

Se introdujo un balón de látex lleno con solución salina, conectado a un transductor de presión (Deltram II, Utah Medical System), en el ventrículo izquierdo. El volumen del balón se ajustó para alcanzar una presión de fin de diástole de entre 8 y 10 mm Hg. La presión de perfusión coronaria (PPC) también se registró con un transductor de presión conectado a la línea de perfusión. El flujo coronario se ajustó para obtener una PPC de aproximadamente 70 mm Hg. Este flujo coronario se mantuvo constante durante todo el experimento.

Protocolos experimentales (Figura 1)

Grupo 1 (n = 5): los corazones se perfundieron en condiciones normóxicas (Nx) durante 30 min.

Grupo 2 (n = 6): se indujo infarto del miocardio sometiendo a los corazones a 30 min de isquemia global sin reperfusión. Esta isquemia global fue provocada por una disminución brusca y total del flujo coronario suministrado por la bomba de perfusión.

Grupo 3 (n = 5): se realizó el mismo protocolo que en el grupo 2 seguido de una reperfusión de 180 min (I/R).

Grupo 4 (n = 5): se realizó el mismo protocolo que en el grupo 2 pero con administración de doxiciclina (50 µM) previo a los 30 min de isquemia. La droga se administró durante 5 min, seguidos de 5 min de lavado del corazón.

Grupo 5 (n = 6): se administró N-morfolinosisidnomina, clorhidrato (SIN-1, dador de ONOO⁻; 100 µM) y se monitorizó la función ventricular durante 30 min.

Grupo 6 (n = 5): se realizó el mismo protocolo que en el grupo 4 pero con administración de doxiciclina (50 µM) durante 5 min, previo a la administración de SIN-1.

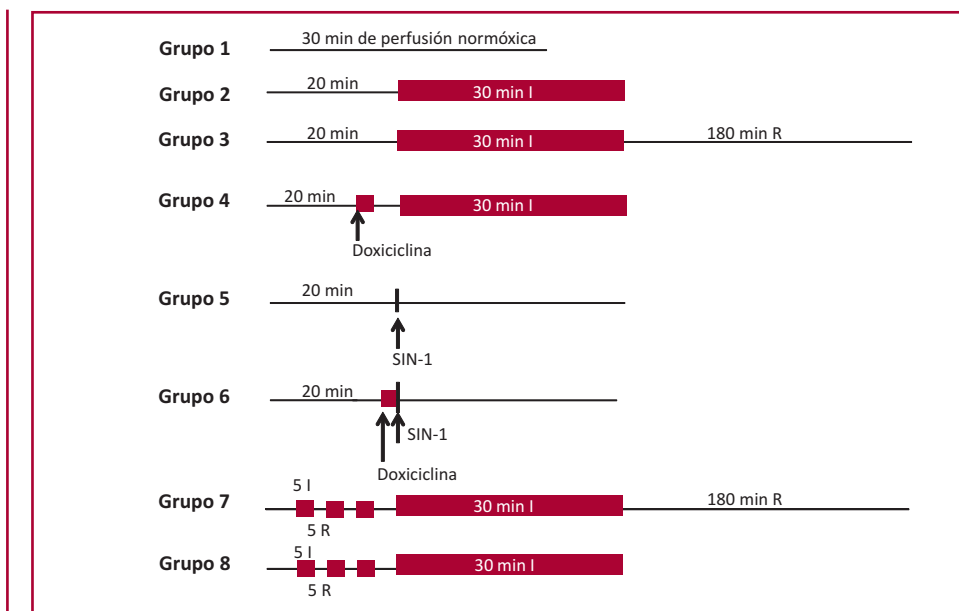
Grupo 7 (n = 5): se realizó un protocolo de Pc isquémico consistente en tres ciclos de I/R, previo a la isquemia global y 180 min de reperfusión (Pc con reperfusión).

Grupo 8 (n = 5): se realizó el mismo protocolo que en el grupo 7 pero sin reperfusión (Pc sin reperfusión).

Medición del tamaño del infarto

El tamaño del infarto se midió en los grupos 3 y 7. Luego de 3 horas de reperfusión los corazones se congelaron y se cortaron en secciones transversales de 4 mm de espesor, desde el ápex a la base. Los cortes se incubaron por 20 min en cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (pH 7,4, 37 °C) y luego se incubaron

Fig. 1. Diagrama de los protocolos experimentales usados en el presente estudio.



en formol al 10%. Esta técnica tiñe las secciones viables en rojo, mientras que las no viables permanecen sin teñirse. Las secciones se escanearon y, a partir de las imágenes, se midió (Image Pro Plus, versión 4.5) el tamaño del infarto, que fue expresado como porcentaje del área total del ventrículo izquierdo.

Medición de sustancias reactivas derivadas del ácido tiobarbitúrico

Las sustancias reactivas derivadas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se midieron en los grupos 1 y 5. Las muestras de ventrículo izquierdo se homogeneizaron en 5 volúmenes de *buffer* compuesto por KCl (140 mM) y KH_2PO_4 (20 mM), pH 7,4, con un cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasa compuesto por aprotinina (200 nM), bestatina (10 μM), E-64 (20 μM), leupeptina (100 μM), fluoruro de sodio (20 mM), ortovanadato de sodio (100 mM), pirofosfato de sodio (100 mM) y β -glicerofosfato (100 mM) (Thermo Scientific), usando un homogeneizador Pro-Scientific Pro 200. Una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min; 0,5 ml del sobrenadante se mezclaron con 1,5 ml de ácido tricloroacético al 10%, 1 ml con ácido tiobarbitúrico al 0,67% y 0,5 ml con agua destilada. Todo se mezcló e hirvió por 30 min y luego se centrifugó a 2.500 rpm por 10 min. Las TBARS se cuantificaron a 530 nm. Los resultados se expresaron en nM MDA/mg de proteínas; coeficiente de extinción: $1,56 \times 10^5 \text{ M}$.

Western blot

Muestras de tejido del ventrículo izquierdo de los grupos 1 a 6 y 8 se congelaron y homogeneizaron con un *buffer* a pH 7,6 compuesto por Tris (1,2 mM), NaCl (0,36 mM), SDS 0,1%, Tritón 1%, DTT (0,2 mM) y un cóctel de inhibidor de proteasas y fosfatasa compuesto por aprotinina (200 nM), bestatina (10 μM), E-64 (20 μM), leupeptina (100 μM), fluoruro de sodio (20 mM), ortovanadato de sodio (100 mM), pirofosfato de sodio (100 mM) y β -glicerofosfato (100 mM) (Thermo Scientific), usando un homogeneizador Pro-Scientific Pro 200. Una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm, 4 °C, por 20 min. La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante el ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad). Cantidades iguales de proteínas (100 μg) se sepa-

raron en geles de 5% a 10% de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Thermo Scientific). Las membranas se tiñeron con una solución al 0,1% de rojo Ponceau S para confirmar la carga de proteínas entre los grupos. Las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal de antidistrofina (1:1.000) (Sigma-Aldrich) y un anticuerpo monoclonal antiespectrina durante 12 horas a 4 °C. Luego, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario (1:10.000) (Millipore), a temperatura ambiente por una hora, seguido de aclarados con TBST. Las transferencias se desarrollaron con el método de quimioluminiscencia (Thermo Scientific). Los niveles relativos de distrofina y espectrina se cuantificaron por análisis de densitometría con el programa Image Gauge 4.0 (Fujifilm).

Análisis de zimografía

Muestras de tejido ventricular de los grupos 1, 2, 4, 5, 6 y 8 se congelaron, homogeneizaron y concentraron utilizando una ultracentrífuga Amicon 4 ml-30 K en vasos de concentración (5.000 g, 4 °C, Millipore, MA, USA). Luego de la concentración, las proteínas se midieron por el método de Lowry. Se separaron las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, adicionado con gelatina como sustrato de diferentes metaloproteinasas (Sigma-St. Louis-MO). Luego de la corrida electroforética, el gel se lavó con Tritón para eliminar restos de SDS y se incubó durante 24 horas a 37 °C en *buffer* Tris, en presencia de Ca^{2+} como cofactor enzimático. Finalmente, el gel se coloreó con Coomassie-Blue y las bandas gelatinolíticas se evaluaron por densitometría (identificadas según su PM con un control positivo). Los resultados se expresaron como actividad de metaloproteinasas en sus diversos tipos.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA de una vía) seguido por la prueba *t de student*, con el valor de *p* ajustado para múltiples comparaciones utilizando la prueba de Bonferroni. Las comparaciones de datos no se consideraron significativas a menos que el valor de *p* correspondiente fuera inferior a 0,05 / *k*, donde *k* representa el número de comparaciones.

RESULTADOS

En la Figura 2 (Panel A) se muestra la expresión de la distrofina en corazones Nx, en el grupo sometido a 30 min de ischemia y en el grupo sometido a 30 min de ischemia y 180 min de perfusión. Pueden verse la degradación de la distrofina durante la ischemia y ningún cambio significativo en su expresión cuando los corazones se reperfundieron. Dado que se ha sugerido que la calpaína podría ser responsable de la degradación de la distrofina, se evaluaron los niveles de espectrina, un sustrato específico de la calpaína (Figura 2, Panel B) que permite evaluar en forma indirecta la actividad de esta enzima. Nuestros resultados muestran que la expresión de la espectrina permaneció sin cambios durante la ischemia (sin actividad de la calpaína), pero disminuyó significativamente durante la perfusión (aumento de la actividad de la calpaína), descartando a la calpaína como la enzima responsable de la degradación de la distrofina durante la ischemia.

En la Figura 3 (Panel A) se muestra la actividad de la MMP-2 en el grupo de corazones Nx, en los sometidos a 30 min de ischemia y en los tratados con doxiciclina. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la actividad de la MMP-2 durante la ischemia y una actividad indetectable en los corazones

tratados con doxiciclina. De acuerdo con estos resultados, la expresión de la distrofina se preservó en los corazones tratados con doxiciclina (Figura 3, Panel B), demostrándose así que la inhibición de la actividad de la MMP-2 mediante la doxiciclina evita la degradación de la distrofina.

Para confirmar que la distrofina es un sustrato de la MMP-2, se administró un dador de ONOO⁻ (SIN-1). La peroxidación lipídica, como producto del daño inducido por un aumento del estrés oxidativo, se evaluó midiendo la formación de TBARS (Figura 4, Panel A). La administración de SIN-1 provocó un aumento significativo en la concentración de TBARS. Mientras que la actividad de la MMP-2 aumentó significativamente en los corazones perfundidos aeróbicamente y tratados con SIN-1, la administración combinada de SIN-1 y doxiciclina evitó la activación de la MMP-2 (Figura 4, Panel B). La expresión de la distrofina se evaluó en los mismos grupos experimentales (Figura 4, Panel C). Los resultados mostraron que la activación de la MMP-2 (sin ischemia) redujo significativamente la expresión de la distrofina y que la administración conjunta de SIN-1 y el inhibidor de la enzima (doxiciclina) impidió la degradación de la distrofina.

En la Figura 5 se muestra el tamaño del infarto en los corazones sometidos a 30 min de ischemia seguidos

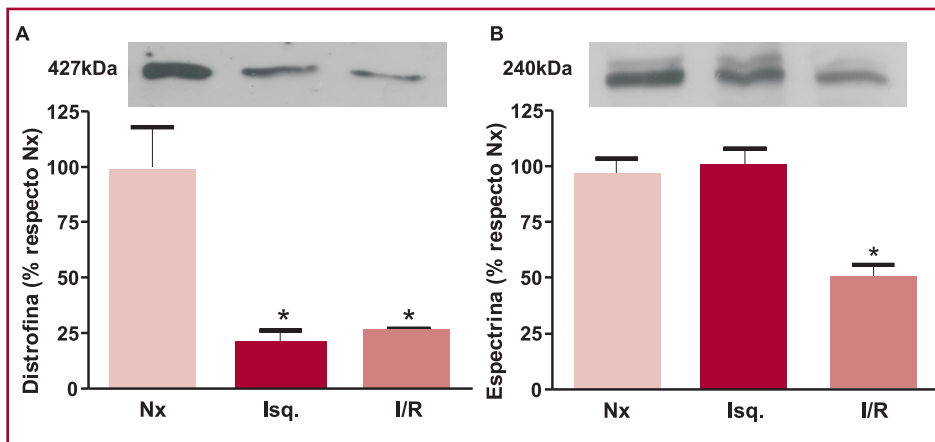


Fig. 2. Expresión de la distrofina (Panel A) y la espectrina (Panel B) en el grupo control (Nx), en un grupo sometido a 30 min de ischemia (Isq.) y en un tercer grupo sometido a 30 min de ischemia seguidos de 180 min de perfusión (I/R). La expresión de la distrofina disminuyó durante la ischemia y no fue recuperada durante la perfusión ($p < 0,05$ vs. Nx). A la inversa, la degradación de la espectrina se observó durante la perfusión ($p < 0,05$ vs. Nx e Isq.). Nx: Normóxicos. Isq.: Isquemia. I/R: Isquemia/reperfusión.

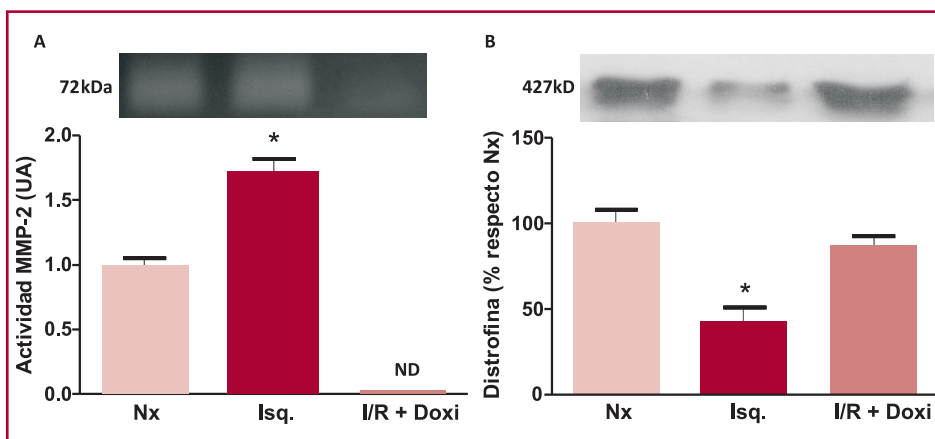


Fig. 3. Actividad de la MMP-2 (Panel A) y expresión de la distrofina (Panel B) en el grupo control (Nx), en un grupo sometido a 30 min de ischemia (Isq.) y en un grupo que recibió doxiciclina previo a los 30 min de ischemia (Isq. + Doxi). La ischemia aumentó la actividad de la MMP-2 ($p < 0,05$ vs. Nx) y en coincidencia con la degradación de la distrofina; este efecto fue abolido por la doxiciclina ($p < 0,05$ vs. Nx e Isq. + Doxi). MMP-2: Metaloproteinasas de la matriz de tipo 2. Nx: Normóxicos. Isq.: Isquemia. Doxi: Doxiciclina.

Fig. 4. El Panel A muestra la concentración de las TBARS en el grupo de corazones control (Nx) y en un grupo de corazones tratados con SIN-1. Se observó un aumento en las TBARS luego de la administración de SIN-1 ($p < 0,05$ vs. Nx). El Panel B muestra la actividad de la MMP-2 en corazones control (Nx), en un grupo de corazones tratados con SIN-1 y en un tercer grupo tratado con SIN-1 + doxiciclina. La administración de SIN-1 aumentó la actividad de la MMP-2; este efecto fue abolido por la doxiciclina ($p < 0,05$ vs. Nx y SIN-1 + Doxi). El Panel C muestra la expresión de la distrofina en el grupo control (Nx), en un grupo de corazones tratados con SIN-1 y en un tercer grupo de corazones tratados con SIN-1 + doxiciclina. La administración de SIN-1 dio por resultado la degradación de la distrofina; este efecto fue abolido por la doxiciclina ($p < 0,05$ vs. Nx y SIN-1 + Doxi). TBARS: Sustancias reactivas derivadas del ácido tiobarbitúrico. Nx: Normóxicos. SIN-1: N-morfolinosidnonimina, clorhidrato. MMP-2: Metaloproteinasas de la matriz de tipo 2. Doxi: Doxiciclina.

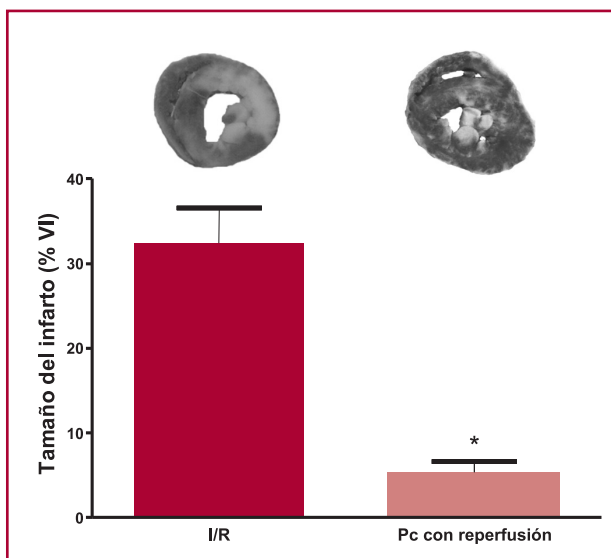
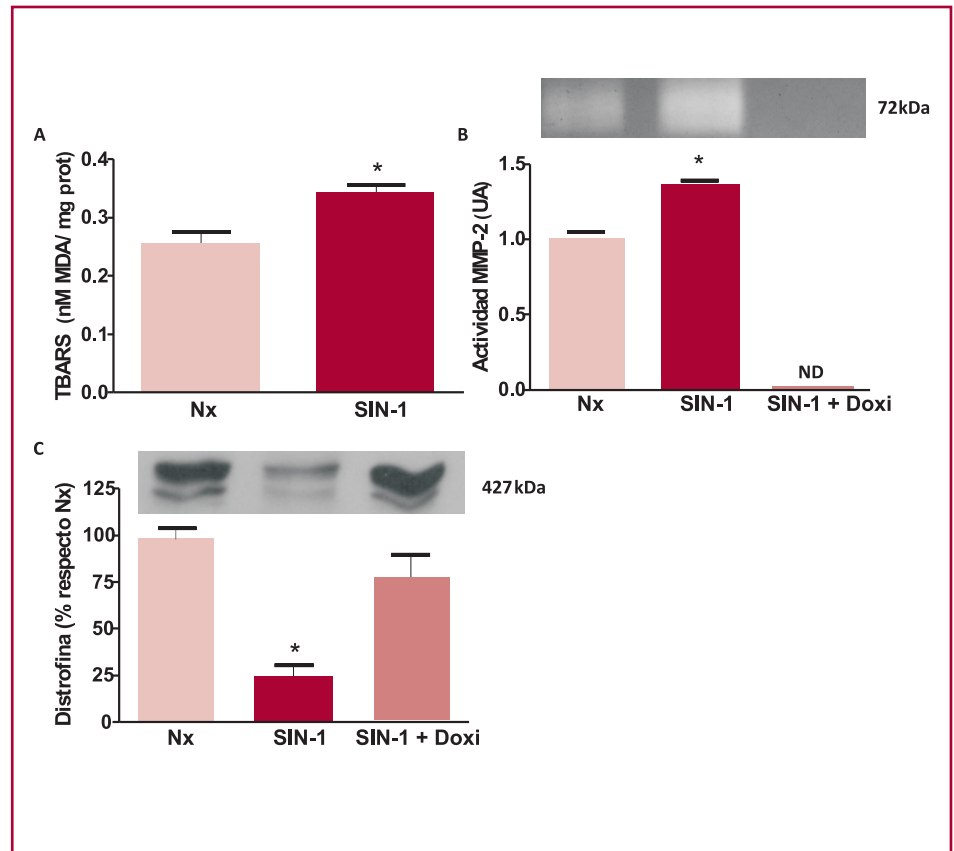


Fig. 5. Tamaño del infarto expresado como porcentaje del área total del ventrículo izquierdo. El preconditionamiento isquémico redujo visiblemente el tamaño del infarto provocado por 30 min de isquemia global ($p < 0,05$ vs. I/R). VI: Ventrículo izquierdo. I/R: Isquemia/reperfusion. Pc: Precondicionamiento.

de 180 min de reperfusion y en el grupo sometido a Pc y reperfusion. El Pc isquémico disminuyó de manera significativa el tamaño del infarto ($31,9 \pm 4,5$ vs. $5,3 \pm 1,3\%$; $p < 0,05$). Resulta interesante el hecho de que el

Pc isquémico (sin reperfusion) atenuó la actividad de la MMP-2 luego de 30 min de isquemia global (Figura 6, Panel A) y atenuó la degradación de la distrofina (Figura 6, Panel B).

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos demostrado que la proteína asociada con la membrana distrofina es degradada por la enzima MMP-2 durante la isquemia y que la doxiciclina, un inhibidor de la MMP-2, es capaz de prevenir la pérdida de distrofina. Además, el Pc isquémico inhibe la actividad de la MMP-2, previniendo de esta manera la degradación de la distrofina. Nuestros hallazgos ponen en evidencia, por un lado, un nuevo papel de la MMP-2 como factor de desestabilización de la membrana plasmática de los miocitos cardíacos que los hace más vulnerables a un daño posterior y, por otro, un nuevo mecanismo de protección para el Pc isquémico.

En el contexto de la isquemia aguda, Armstrong y colaboradores (2) demostraron que la depleción de distrofina y espectrina en microsomas y fracciones de membranas es una manifestación temprana del daño miocárdico, coincidente con el desarrollo de fragilidad osmótica celular. Estos resultados fueron confirmados por Rodríguez y colaboradores, (3) quienes también mostraron que una fuerte reducción o la ausencia de distrofina indican lesión isquémica grave o irreversible y que existe una diferente sensibilidad de las proteí-

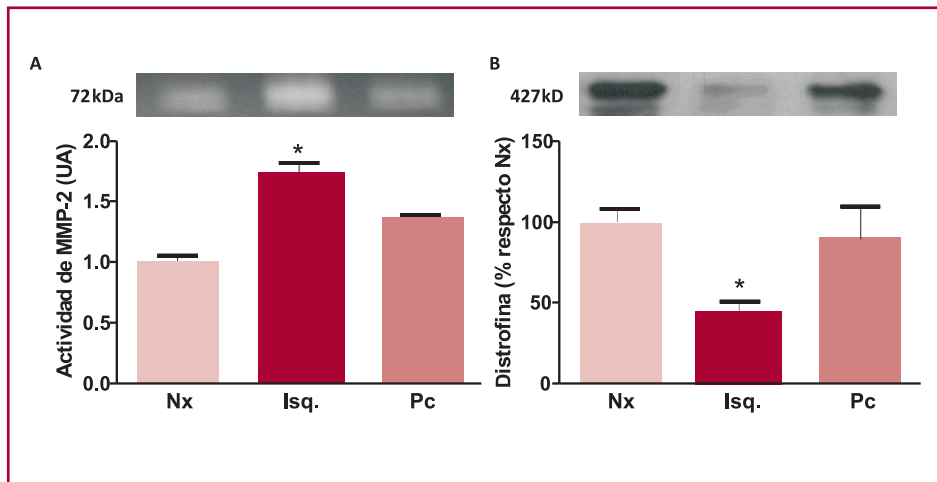


Fig. 6. Actividad de la MMP-2 (Panel A) y expresión de la distrofina (Panel B) en el grupo control (Nx), en un grupo sometido a 30 min de isquemia y en un tercer grupo sometido a un protocolo de preconditionamiento isquémico. La actividad de la MMP-2 aumentó durante la isquemia y disminuyó como resultado del preconditionamiento isquémico; el preconditionamiento también evitó la degradación de la distrofina ($p < 0,05$ vs. Nx y Pc). MMP-2: Metaloproteínasa de la matriz de tipo 2. Nx: Normóxicos. Isq. Isquemia. Pc: Precondicionamiento.

nas relacionadas con la membrana frente a la lesión por I/R. Sin embargo, estos autores no evaluaron el mecanismo de degradación de la distrofina ni el efecto de una intervención protectora como el Pc isquémico.

Utilizando tres modelos de insuficiencia cardíaca, Kawada y colaboradores (9) demostraron que la activación de las calpaínas, seguida de un aumento del calcio intracelular, induce específicamente la proteólisis de la distrofina y los α -sarcoglicanos. De forma similar, Yoshida y colaboradores (10) comunicaron alteraciones en la distrofina miocárdica seguida de infarto agudo de miocardio en ratas, sugiriendo que las calpaínas podrían contribuir a la disminución de la expresión de la distrofina. Así, algunos autores sugieren que el aumento de la actividad de la calpaína, secundario al incremento de la concentración de calcio intracelular, lleva al daño tisular. (11) Sin embargo, existe una superposición en las vías de señalización intracelular, entre los sustratos y las acciones biológicas de la MMP-2 y las calpaínas. (12) De hecho, muchas de las pruebas realizadas para evaluar sustratos de calpaína en las células cardíacas se basan en el uso de calpastatina (inhibidor de las calpaínas), que también inhibe la actividad de la MMP-2. (13) En nuestro trabajo hemos reproducido, utilizando un modelo *in vitro*, la pérdida de distrofina, y confirmamos que es degradada solo durante la isquemia y que la reperusión del corazón no modifica su expresión. Los niveles de espectrina (sustrato específico de la calpaína), por el contrario, no se modificaron durante la isquemia, mientras que disminuyeron durante la reperusión. (3, 6) Esto es importante, ya que en el contexto del daño agudo por I/R la activación de la calpaína no ocurre durante la isquemia, sino durante la reperusión, causando fragilidad del sarcolema y degradación de otras proteínas, como la espectrina y la ankirina. (6) Dado que la espectrina es un sustrato bien conocido de la calpaína, estos hechos indican claramente que durante la isquemia la calpaína se encuentra inactiva y que su actividad solo está presente durante la reperusión, lo que permite

descartar a esta enzima como responsable de la degradación de la distrofina.

Además de su acción bien conocida en la remodelación de la matriz extracelular, varios estudios han demostrado que la MMP-2 también tiene un papel importante a nivel intracelular. (12) La MMP-2 está presente y activa dentro de los miocitos cardíacos y participa en la patogenia de varias enfermedades cardíacas. A partir de su forma inactiva, la MMP-2 puede ser activada en el medio extracelular o en el ambiente intracelular mediante clivaje proteolítico, (12) por estrés oxidativo (14, 15) o por desfosforilación. (16) De este modo, la mayor actividad de la MMP-2 se asocia con el aumento del estrés oxidativo que ocurre durante la I/R. En este sentido, la presencia de MMP-2 activa en el efluente coronario de corazones sometidos a I/R está bien documentada. (17, 18)

Una vez activada, la MMP-2 puede clivar proteínas intracelulares como la troponina I, (19) la cadena liviana de la miosina (MLC-1), (20) la titina (21) y la α -actinina (22) y participar en el mecanismo de disfunción cardíaca contráctil en la I/R. (17) En nuestro trabajo hemos encontrado que durante la isquemia ocurre un aumento de la actividad de la MMP-2 en el tejido cardíaco. Trabajos previos que han estudiado la actividad de la MMP-2 durante la I/R han evaluado la actividad de la enzima a diferentes tiempos de reperusión (7) y, en general, esa actividad fue determinada en el perfusado y no en el tejido cardíaco. Aunque en nuestro estudio no hemos evaluado la actividad de la MMP-2 durante la reperusión, es importante señalar que Cheung y colaboradores (17) han demostrado que existe una disminución de la actividad de la MMP-2 a medida que transcurre la reperusión, llegando a normalizarse a los 20-30 min. Además, en coincidencia con la mayor actividad de la MMP-2 durante la isquemia, hemos observado la degradación de la distrofina durante el mismo período, y al inhibir a la MMP-2 con doxiciclina la degradación de la distrofina fue evitada. Para confirmar estos hallazgos, y considerando que el

principal mecanismo de activación intracelular de la MMP-2 es el estrés oxidativo, realizamos experimentos en los cuales los corazones fueron sometidos a un incremento del estrés oxidativo por administración de SIN-1. El SIN-1, al ser un donante de ONOO⁻, incrementó la actividad de la MMP-2, lo que se relacionó con una expresión menor de distrofina. Este efecto se previno cuando junto con el SIN-1 se administró doxiciclina. Estos datos confirman la participación de la MMP-2 en la degradación de la distrofina.

Recientemente, Sariahmetoglu y colaboradores (16) demostraron que el estado de fosforilación de la MMP-2 contribuye al daño por I/R. De esta manera, la MMP-2 en su estado fosforilado presentaría una actividad menor y esto repercutiría en una función mejor y en un daño celular menor. Es conocido que el Pc es capaz de activar la proteinasa C (PKC), (23) la cual fosforila diferentes proteínas intracelulares que intervienen en su mecanismo de protección. Además, se ha mostrado que el Pc disminuye la actividad de la MMP-2 en corazones sometidos a I/R. (24) Los resultados de nuestro estudio corroboran que el Pc atenúa la actividad de esta enzima y previene la degradación de la distrofina. Sin embargo, una limitación de nuestro trabajo es que no pudimos discriminar si la menor actividad de la MMP-2 en los corazones precondicionados se debe a un estrés oxidativo menor o a la fosforilación de la MMP-2 por parte de la PKC.

CONCLUSIONES

La activación de la MMP-2, debido a un aumento en el estrés oxidativo, es responsable de la degradación de la distrofina. El Pc isquémico atenúa la degradación de la distrofina mediante la inhibición de la actividad de la MMP-2.

Nuestros resultados son importantes, ya que confirman la pérdida isquémica de la distrofina, demuestran una nueva diana intracelular de la MMP-2 y un mecanismo por el cual el Pc isquémico previene el daño de la membrana celular.

ABSTRACT

Ischemic Preconditioning Preserves Dystrophin Through Matrix Metalloproteinase-2 Inhibition

Background

Ischemia/reperfusion injury produces cell death through different pathways, some of which induce plasma membrane rupture. In cardiomyocytes, dystrophin and spectrin provide stability to cell membrane and associate the intracellular environment with the extracellular environment. Dystrophin breakdown causes membrane fragility. Ischemic preconditioning has been suggested to attenuate this injury, yet, the mechanism is unknown.

Objective

To determine whether ischemic preconditioning prevents dystrophin breakdown through matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) inhibition.

Methods

Isolated rabbit hearts were treated as follows: G1 (n=5): 30-min perfusion (Nx); G2 (n=6): 30-min global ischemia (GI) without reperfusion; G3: same as G2, except for 180-min reperfusion (I/R); G4 (n=5): doxycycline (MMP inhibitor) before GI; G5 (n=6): normoxic hearts treated with SIN-1 (which stimulates ONOO⁻ production) with monitoring of ventricular function during 30 min; G6 (n=5): doxycycline during 5 min, before SIN-1 administration; G7 and G8 (n=5): ischemic preconditioning (n=5) before 30-min GI with/without reperfusion, respectively. Dystrophin expression decreased during ischemia, reaching 21% of control values (p < 0.05); spectrin expression remained unchanged. MMP-2 activity increased 71% during ischemia compared to control values (p < 0.05). The administration of doxycycline before ischemia prevented dystrophin breakdown. In normoxic hearts, SIN-1 increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by 33% (p < 0.05) and MMP-2 activity by 36% (p < 0.05), and significantly reduced dystrophin expression to 23% of control values (p < 0.05). Ischemic preconditioning significantly attenuated dystrophin breakdown by inhibiting MMP-2 activity.

Conclusions

Activation of MMP-2 due to increased oxidative stress is responsible for dystrophin breakdown. Ischemic preconditioning attenuates dystrophin breakdown by inhibiting MMP-2 activity.

Key words > Ischemic Preconditioning - Dystrophin - Matrix Metalloproteinase 2

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 2002;115:2801-3.
2. Armstrong SC, Latham CA, Shivell CL, Ganote CE. Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1165-79. <http://doi.org/b5j6xs>
3. Rodríguez M, Cai WJ, Kostin S, Lucchesi BR, Schaper J. Ischemia depletes dystrophin and inhibits protein synthesis in the canine heart: mechanisms of myocardial ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:723-33. <http://doi.org/ftq2kp>
4. Kido M, Otani H, Kyo S, Sumida T, Fujiwara H, Okada T, et al. Ischemic preconditioning-mediated restoration of membrane dystrophin during reperfusion correlates with protection against contraction-induced myocardial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H81-90. <http://doi.org/cz23gf>
5. Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, Romano MM, Ramos SG, Celes MR, et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol* 2011;670:541-53. <http://doi.org/c8p9rd>
6. Hernando V, Inserte J, Sartório CL, Parra VM, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:271-9. <http://doi.org/bbg462>
7. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002;106:1543-9. <http://doi.org/btdswm>
8. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Veterinary Care. En: Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington DC: The National Academies Press; 2010. p. 113-32.*

9. Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, Nakazawa M, et al. A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2005;1751:73-81.
10. Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyooka T, et al. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2003;59:419-27. <http://doi.org/fcs6p3>
11. Singh RB, Dandekar SP, Elimban V, Gupta SK, Dhalla NS. Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease. *Mol Cell Biochem* 2004;263:241-56. <http://doi.org/d4t6r2>
12. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res* 2010;85:413-23 <http://doi.org/fjxmm2>
13. Ali MA, Stepanko A, Fan X, Holt A, Schulz R. Calpain inhibitors exhibit matrix metalloproteinase-2 inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;423:1-5. <http://doi.org/kkc>
14. Ali MA, Schulz R. Activation of MMP-2 as a key event in oxidative stress injury to the heart. *Front Biosci* 2009;14:699-716.
15. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996;49:7-19.
16. Sariahmetoglu M, Skrzypiec-Spring M, Youssef N, Jacob-Ferreira AL, Sawicka J, Holmes C, et al. Phosphorylation status of matrix metalloproteinase 2 in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Heart* 2012;98:656-62. <http://doi.org/kkd>
17. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000;101:1833-9. <http://doi.org/kkf>
18. Donato M, D'Annunzio V, Buchholz B, Miksztowicz V, Carrión CL, Valdez LB, et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in the cardioprotective effect of ischaemic postconditioning. *Exp Physiol* 2010;95:274-81. <http://doi.org/cjhzbb>
19. Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003;57:426-33. <http://doi.org/dr9v96>
20. Cadete VJ, Sawicka J, Jaswal JS, Lopaschuk GD, Schulz R, Szczesna-Cordary D, et al. Ischemia/reperfusion-induced myosin light chain 1 phosphorylation increases its degradation by matrix metalloproteinase 2. *FEBS J* 2012;279:2444-54. <http://doi.org/kkg>
21. Ali MA, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010;122:2039-47. <http://doi.org/b3mrh3>
22. Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-López NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:429-36. <http://doi.org/ddw2p8>
23. Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24:225-34. <http://doi.org/dpwrj8>
24. Lalu MM, Csonka C, Giricz Z, Csont T, Schulz R, Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:937-41. <http://doi.org/c456mh>