

Artículo original

Efecto cardioprotector de la ranolazina en el proceso de isquemia-reperfusión en cardiomiocitos de rata adultos

Eva M. Calderón-Sánchez^a, Alejandro Domínguez-Rodríguez^{a,b}, José López-Haldón^c, Manuel F. Jiménez-Navarro^d, Ana M. Gómez^b, Tarik Smani^a y Antonio Ordóñez^{a,c,*}^a Grupo de Fisiopatología Cardiovascular, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, España^b Inserm, Université Paris Sud, Chatenay-Malabry, Francia^c Unidad de Imagen Cardiovascular, Área del Corazón, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España^d UGC del Corazón, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, RIC (Red de Investigación Cardiovascular), Málaga, España

Historia del artículo:

Recibido el 21 de noviembre de 2014

Aceptado el 27 de febrero de 2015

On-line el 14 de julio de 2015

Palabras clave:

Isquemia-reperfusión

Cardioprotección

Ca²⁺

Ranolazina

RESUMEN

Introducción y objetivos: La ranolazina se emplea como tratamiento complementario de la angina en pacientes sintomáticos insuficientemente controlados con los tratamientos antianginosos de primera línea. La ranolazina inhibe los canales de sodio operados por voltaje, lo cual indica su posible intervención en el proceso de reperusión al prevenir la sobrecarga de sodio y calcio que se produce durante la isquemia. En este estudio, se ha caracterizado el efecto de la ranolazina en la homeostasis del calcio en miocitos cardíacos adultos de ratas a las que se aplicó un protocolo de isquemia y reperusión simuladas.

Métodos: Se evaluaron los efectos de la ranolazina en los cambios de la concentración de calcio intracelular en diferentes momentos empleando electroestimulación de campo. El estudio del calcio intracelular se llevó a cabo mediante microfluorimetría utilizando el indicador fluorescente Fura-2 y por microscopia confocal utilizando el indicador Fluo-3.

Resultados: Se observó que los cardiomiocitos a los que se aplicaba la isquemia-reperusión mostraban un aumento de la concentración de calcio diastólica y una disminución de la amplitud de los transitorios de calcio intracelular. La aplicación de la ranolazina durante la isquemia mejoró significativamente la regulación del calcio evitando la sobrecarga de calcio intracelular, reduciendo la concentración de calcio diastólica, aumentando la carga de calcio en el retículo sarcoplásmico y preservando la amplitud del transitorio de calcio intracelular, lo cual se reflejaba en una recuperación satisfactoria en el proceso de acoplamiento de excitación-contracción durante la reperusión. Sin embargo, estos efectos de la ranolazina no se produjeron cuando el fármaco se aplicó solo durante la reperusión o cuando se aplicó tanto en la isquemia como en la reperusión.

Conclusiones: La ranolazina muestra unos efectos favorables en los cardiomiocitos expuestos a isquemia-reperusión, pero solo cuando se aplica durante la isquemia. Este efecto se alcanza mejorando la regulación del calcio durante la isquemia.

© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cardioprotective Effect of Ranolazine in the Process of Ischemia-reperfusion in Adult Rat Cardiomyocytes

ABSTRACT

Introduction and objectives: Ranolazine is used as a complementary treatment for angina in symptomatic patients who are inadequately controlled with first-line antianginal therapies. Ranolazine inhibits sodium voltage-dependent channels, suggesting their possible involvement in the reperfusion process by preventing the sodium and calcium overload that occurs during ischemia. In this study, we characterized the effect of ranolazine on calcium homeostasis in isolated adult cardiac myocytes from rats subjected to a simulated ischemia and reperfusion protocol.

Methods: The effects of ranolazine on changes in intracellular calcium concentration were evaluated at different times using field electrostimulation. The study of intracellular calcium was performed using microfluorimetry with the fluorescent indicator, Fura-2, and by confocal microscopy with the indicator, Fluo-3.

Results: We found that cardiomyocytes subjected to ischemia-reperfusion showed an increase in the diastolic calcium concentration and a decrease in the amplitude of intracellular calcium transients. The application of ranolazine during ischemia significantly improved intracellular calcium handling,

Keywords:

Ischemia-reperfusion

Cardioprotection

Ca²⁺

Ranolazine

* Autor para correspondencia: Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, España. Correos electrónicos: antorferman@us.es, tasmani@us.es (A. Ordóñez).

preventing intracellular calcium overload, decreasing the diastolic calcium concentration, increasing the sarcoplasmic reticulum calcium load, and preserving the amplitude of the intracellular calcium transient, which was reflected by successful recovery in the process of excitation-contraction coupling during reperfusion. However, these effects of ranolazine did not occur when it was applied during reperfusion or when applied in both ischemia and reperfusion.

Conclusions: Ranolazine shows beneficial effects in cardiomyocytes exposed to ischemia/reperfusion but only when applied during ischemia. This effect is achieved through its improvement of calcium handling during ischemia.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

I_{NaL} : corriente de Na^+ tardía
 IR: isquemia-reperusión
 NCX: intercambiador de Na^+/Ca^{2+}

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica es la primera causa de muerte en los países occidentales¹. La expresión más devastadora de esta enfermedad es el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, que se debe a una oclusión arterial coronaria aguda que se sabe que es causa de muerte isquémica de células del miocardio. Después de un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, la reperusión rápida del miocardio mediante un tratamiento trombolítico o una intervención coronaria percutánea primaria es la estrategia más eficaz para reducir el tamaño del infarto y mejorar, por lo tanto, los resultados clínicos². La terapia de reperusión tiene una repercusión sustancial en la mortalidad temprana tras un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Sin embargo, en un porcentaje elevado (20-30%) de los pacientes del hospital se produce un remodelado adverso³. Una reperusión temprana y efectiva limita el grado de necrosis del miocardio al reducir la incidencia del remodelado y la disfunción del ventrículo izquierdo pero, aun con el mejor tratamiento de reperusión, paradójicamente una parte de los cardiomiocitos muere a causa del restablecimiento del flujo sanguíneo⁴. Este fenómeno se denomina lesión por isquemia-reperusión (IR)⁵.

La privación de oxígeno y la sobrecarga de calcio durante la isquemia cardíaca y la producción de especies moleculares de oxígeno reactivas durante la reperusión causan la muerte de los cardiomiocitos mediante necrosis y apoptosis⁶. Los principales cambios adversos que se producen en el miocardio isquémico consisten en un aumento de la concentración de Na^+ intracelular a causa de un fallo de la bomba de Na^+/K^+ del sarcolema en ausencia de energía y acidificación del citosol por la glucólisis anaerobia. La célula intenta resolver este aumento de Na^+ intracelular a través de un intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (NCX) que actúa a la inversa, expulsando Na^+ e introduciendo Ca^{2+} en las células. Esto da lugar a una sobrecarga intracelular de Ca^{2+} y una mala regulación del Ca^{2+} por las células⁷.

La ranolazina es un derivado de piperazina con un mecanismo de acción novedoso que fue autorizada por primera vez por la *Food and Drug Administration* en 2006 para el tratamiento sintomático de pacientes con angina crónica. Dadas sus propiedades farmacológicas, es capaz de bloquear la corriente de Na^+ tardía (I_{NaL}) en los cardiomiocitos y desviar la oxidación de los ácidos grasos hacia la oxidación de la glucosa, lo cual hace que el uso de oxígeno en el corazón sea más eficiente^{8,9}. Sin embargo, el mecanismo de acción

de la ranolazina no se conoce con precisión. Los efectos beneficiosos de la ranolazina derivan de su acción de reducción de la entrada de Na^+ en las células del miocardio a través de los canales de Na^+ , que en situaciones patológicas falla durante su inactivación o vuelve a abrirse¹⁰. Se ha señalado que la ranolazina reduce la sobrecarga de calcio de las células miocárdicas durante la isquemia al bloquear la I_{NaL} ⁹. A las concentraciones plasmáticas terapéuticas ($\leq 10-21$ mmol/l), la ranolazina inhibe de forma selectiva la I_{NaL} , reduce la acumulación intracelular de Na^+ y la posterior sobrecarga de Ca^{2+} inducida por el Na^+ , así como las anomalías mecánicas, eléctricas y metabólicas en el miocardio isquémico o en insuficiencia¹¹. Sin embargo, a esta concentración¹², la ranolazina no modifica el máximo de la corriente de Na^+ encargado del paso 0 del potencial de acción, la corriente de entrada de Ca^{2+} , o la actividad del NCX y el intercambiador de Na^+/H^+ .

Actualmente el uso de la ranolazina está autorizado como tratamiento adyuvante de la angina sintomática de pacientes insuficientemente controlados con los tratamientos antianginosos de primera línea¹². El desarrollo de una sustancia capaz de inhibir o reducir los efectos nocivos de un aumento patológico de la concentración intracelular de Ca^{2+} en los cardiomiocitos durante los procesos de isquemia sería una contribución clínica y terapéutica de enorme importancia. En este estudio, se plantea la hipótesis de que la ranolazina pudiera tener una acción novedosa en las intervenciones de reperusión al prevenir la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} que se produce en el corazón isquémico y facilitar una mejor regulación del Ca^{2+} por las células en la reperusión.

MÉTODOS

La manipulación de los animales se atuvo a las recomendaciones del Real Decreto 53/2013 en consonancia con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Humana local del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Sevilla.

Aislamiento de miocitos ventriculares

Se utilizaron ratas adultas Wistar macho, de un peso aproximado de 250-350 g, que previamente fueron heparinizadas (4 UI/g por vía intraperitoneal) y anestesiadas mediante la administración intraperitoneal de tiopental sódico (1 ml/250 g). Se extrajo rápidamente el corazón y se montó en un sistema de perfusión Langendorff con flujo constante. Se aislaron cardiomiocitos ventriculares mediante perfusión de colagenasa de tipo II (251 UI/ml, Worthington Biochemical; Lakewood, New Jersey, Estados Unidos)¹³. Los cardiomiocitos se mantuvieron en solución de Tyrode (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1,1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, 1,8 CaCl₂ (pH 7,4), con un suplemento de 1,8 mM CaCl₂. Todos los experimentos se realizaron en células de forma alargada a temperatura ambiente (24-26 °C).

Determinación del Ca²⁺ intracelular con microfluorimetría

Se registraron los transitorios de Ca²⁺ intracelular con el sistema de imagen *Incyt high speed Im²* (Intracellular Imaging Inc.; Imsol, Reino Unido) en cardiomiocitos recién aislados cargados con el marcador de Ca²⁺ fluorescente Fura-2AM. Durante los experimentos, se realizó una perfusión continua de las células con solución de Tyrode normal (mM) o solución de isquemia simulada (mM): 140 NaCl, 3,6 KCl, 1,2 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 20 HEPES, 20 lactato-Na y 2 NaCN (pH = 6,22). Para provocar los transitorios de Ca²⁺ intracelular, se aplicó una estimulación de campo a los cardiomiocitos durante todo el experimento a 0,5 Hz empleando dos electrodos de platino en paralelo, según un método descrito con anterioridad¹⁴.

Determinación del Ca²⁺ intracelular con microscopia confocal

Los experimentos de microscopia confocal se realizaron en cardiomiocitos recién aislados y cargados con Fluo-3AM. Se obtuvieron imágenes con microscopia confocal (Leica TCS SP2 AOBS, objetivo W.I. 63 × y N.A. 1,2) mediante el examen de la célula con un láser de argón cada 1,54 ms. Con objeto de provocar los transitorios de Ca²⁺ intracelular, se aplicó a los cardiomiocitos una estimulación de campo a 0,5 Hz, según un método descrito con anterioridad¹⁴. La carga de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico se estimó mediante la aplicación rápida de cafeína a cardiomiocitos cargados con Fluo-3, utilizando el Leica SP5, objetivo 40 × W.I., N.A. 1,2, con un modo de escáner lineal a 700 Hz y un láser de luz blanca de 500 nm. En ambos casos, la emisión se detectó a más de 510 nm, tal como se ha descrito con anterioridad^{14,15}.

Protocolos de tratamiento

Grupo 1: IR. Después de la estabilización con solución de control, se expusieron las células a una isquemia simulada mediante la perfusión de solución isquémica durante 6 min, seguido de 10 min de reperfusion con solución de control.

Grupo 2: se aplicó la ranolazina al inicio de la reperfusion (IR+Ran). Las células se expusieron durante 6 min a isquemia simulada y 10 min de reperfusion con la solución de control, que contenía 10 μM de ranolazina.

Grupo 3: se aplicó la ranolazina en la isquemia y durante la reperfusion (I+Ran/R+Ran). Se expusieron las células a 6 min de isquemia simulada en presencia de 10 μM de ranolazina, seguidos de 10 min de reperfusion con solución de control, que contenía 10 μM de ranolazina.

Grupo 4: se aplicó la ranolazina solamente durante la isquemia (I+Ran/R). Se expusieron las células a 6 min de isquemia simulada con 10 μM de ranolazina, seguidos de 10 min de reperfusion con solución de control.

Empleando de estos protocolos, un 50-60% de los cardiomiocitos a los que se aplicó el protocolo de IR mostraron una hipercontracción significativa en comparación con las células de control.

Análisis de los datos

Los datos de los grupos se presentan en forma de media ± error estándar de la media. Se utilizó la prueba de la t de Student para datos únicos o apareados para determinar la significación estadística de los datos. Se evaluó la significación de la comparación de múltiples grupos empleando un análisis de la varianza seguido de la prueba de Tukey. Los resultados con un valor de p < 0,05 se consideraron significativos. Los fármacos se compraron a Sigma-Aldrich.

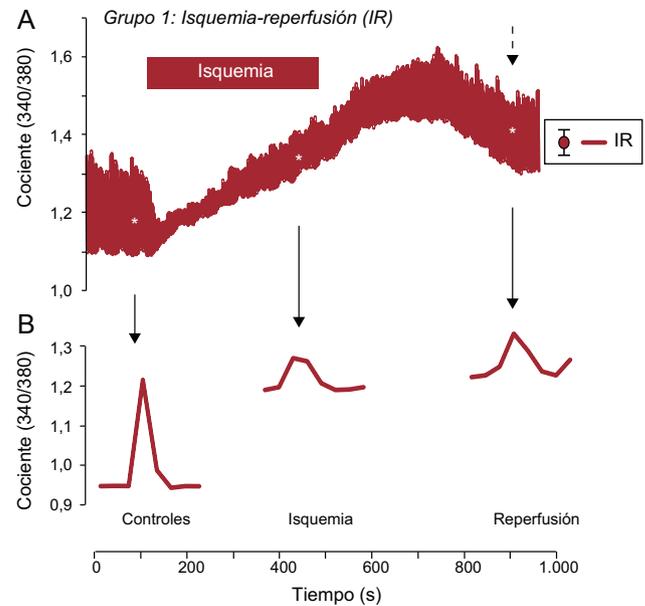


Figura 1. Efecto de la isquemia-reperfusion en los transitorios de Ca²⁺ intracelular. A: se muestra el trazado medio de los cambios en los transitorios de Ca²⁺ intracelular obtenidos en varios cardiomiocitos adultos aislados cargados con el indicador fluorescente Fura-2AM y sometidos a un protocolo de isquemia-reperfusion simulada; las células se estimularon a una frecuencia de 0,5 Hz. B: se muestra un solo aumento del transitorio de Ca²⁺ intracelular representativo, registrado en la solución de control, durante la isquemia y después de la reperfusion celular. IR: isquemia-reperfusion. La flecha discontinua indica el error estándar de la media, que se muestra a la derecha de la figura A. * p < 0,05.

RESULTADOS

Cambios de Ca²⁺ intracelular durante la isquemia-reperfusion

Se examinaron los cambios de Ca²⁺ intracelular en los cardiomiocitos sometidos a IR y a los que se aplicó una estimulación de campo a 0,5 Hz. La isquemia indujo una disminución significativa de la amplitud de los transitorios de Ca²⁺ intracelular, que se recuperó parcialmente después de la reperfusion (figura 1A). Este efecto se acompañó de un aumento de Ca²⁺ intracelular diastólico durante la isquemia y durante la fase inicial de la reperfusion, que no se restablecía al final de la reperfusion (figura 1B). Tal como se muestra, los valores basales de Ca²⁺ intracelular eran estables en la situación de control, pero continuaron aumentando durante la isquemia simulada, lo cual impedía la recuperacion del aumento transitorio del Ca²⁺ en la reperfusion.

La ranolazina modula el Ca²⁺ intracelular durante la isquemia-reperfusion

Con objeto de verificar el efecto de la ranolazina en la regulacion del Ca²⁺ intracelular, primero se intentó determinar el momento apropiado para su aplicacion. Para ello, se sometieron cardiomiocitos adultos aislados a un protocolo de IR en el que se aplicó el fármaco en tres etapas: a) en el momento de la reperfusion; b) durante la IR, y c) durante la isquemia solamente. En primer lugar, se aplicó la ranolazina (10 μM) al inicio de la reperfusion como tratamiento apropiado para la aplicacion clínica durante la angioplastia primaria y, por lo tanto, las células cardiacas se sometieron a una isquemia simulada durante 6 min y luego se expusieron a 10 min de reperfusion con una solución de control que contenía 1,8 mM de CaCl₂ y 10 μM de ranolazina (figura 2A).

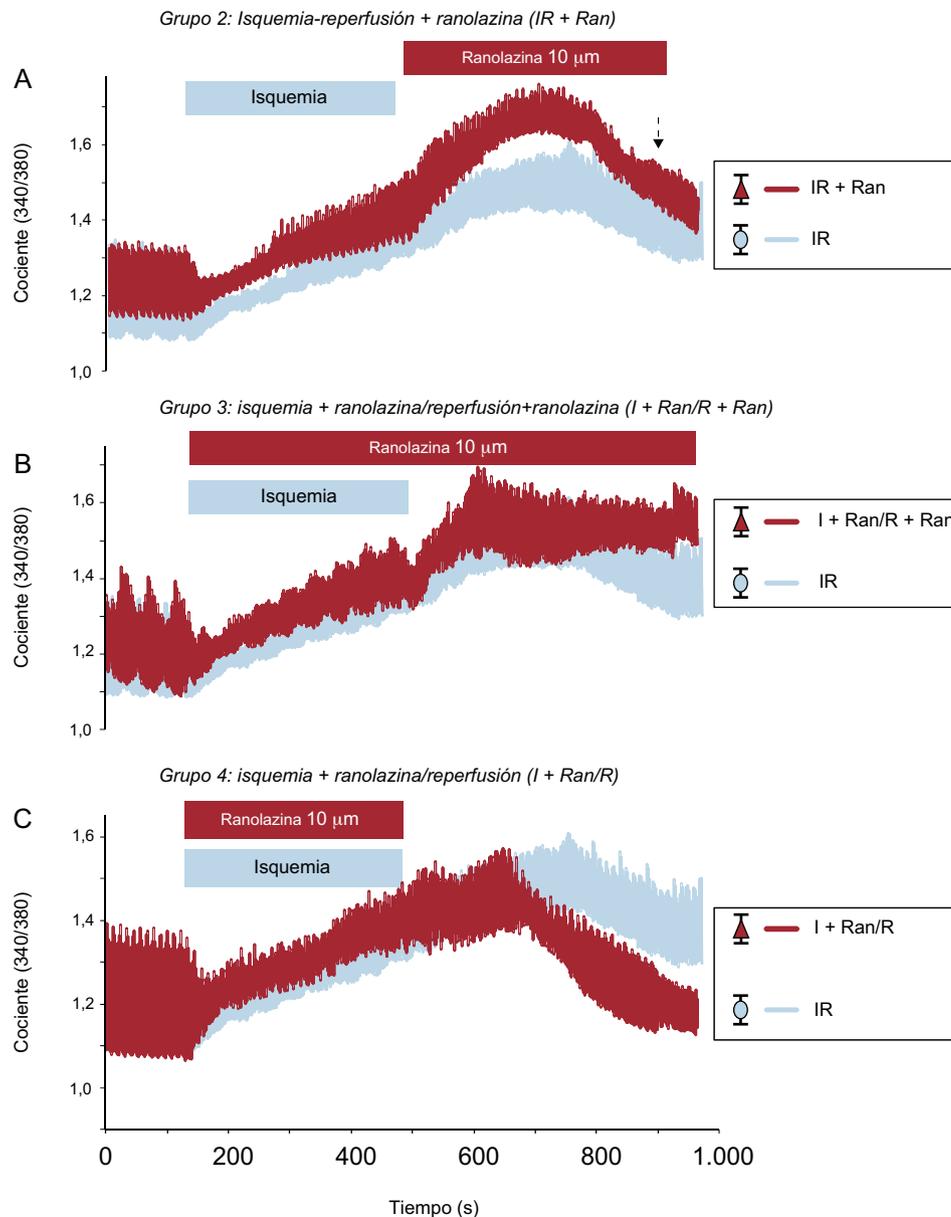


Figura 2. Efecto de la ranolazina aplicada a diferentes grupos experimentales. Los registros muestran la evolución temporal de los cambios de los valores medios de Ca^{2+} intracelular registrados en los cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusión (trazados en azul $n = 59$) y en células tratadas con ranolazina aplicada en diferentes momentos (trazados en rojo). A: ranolazina (10 μ M) aplicada al inicio de la perfusión ($n = 16$). B: ranolazina (10 μ M) añadida durante la isquemia y la perfusión ($n = 24$). C: ranolazina (10 μ M) aplicada solo durante la isquemia ($n = 31$). I+Ran/R: isquemia + ranolazina/reperfusión; I+Ran/R+Ran: isquemia + ranolazina/reperfusión + ranolazina; IR: isquemia-reperfusión; IR+Ran: isquemia-reperfusión + ranolazina. La flecha discontinua indica el error estándar de la media, que se muestra a la derecha. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

Empleando este protocolo, no se observó mejora alguna en el cambio de Ca^{2+} intracelular. Además, el aumento de Ca^{2+} intracelular diastólico causado por la isquemia aumentó en mayor medida con la aplicación del fármaco en el momento de la perfusión.

A continuación, con objeto de determinar si la ranolazina tenía un mayor efecto protector cuando se aplicaba durante la IR, se trataron los cardiomiocitos con una solución de isquemia simulada con un suplemento de 10 μ M de ranolazina durante 6 min y se reperfundieron luego con solución de control, también con un suplemento de ranolazina durante 10 min. Como resultado de este experimento, se observó un aumento progresivo y sostenido del Ca^{2+} intracelular diastólico, que no mejoró en ningún momento durante la perfusión (figura 2B). Por último, se sometieron los cardiomiocitos adultos a 6 min de isquemia simulada con un contenido de 10 μ M de ranolazina, seguidos de 10 min de perfusión en ausencia del fármaco. El aumento de Ca^{2+} intracelular diastólico generado

durante la isquemia se redujo significativamente en la perfusión con la solución de control (figura 2C). Después de la aplicación de la ranolazina durante la isquemia simulada solamente, el aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular mejoró significativamente en las células cardíacas en comparación con los demás protocolos (figura 3). De hecho, la sobrecarga de Ca^{2+} generada por la isquemia se redujo significativamente durante la perfusión en este grupo. Además, la amplitud del transitorio de Ca^{2+} intracelular se recuperó significativamente durante la perfusión sin ranolazina (figura 3B).

La ranolazina previene la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular al reducir el Ca^{2+} intracelular diastólico en cardiomiocitos isquémicos

Un análisis detallado del Ca^{2+} intracelular diastólico mostró que aumentaba progresivamente, que era mayor en el grupo de IR, y

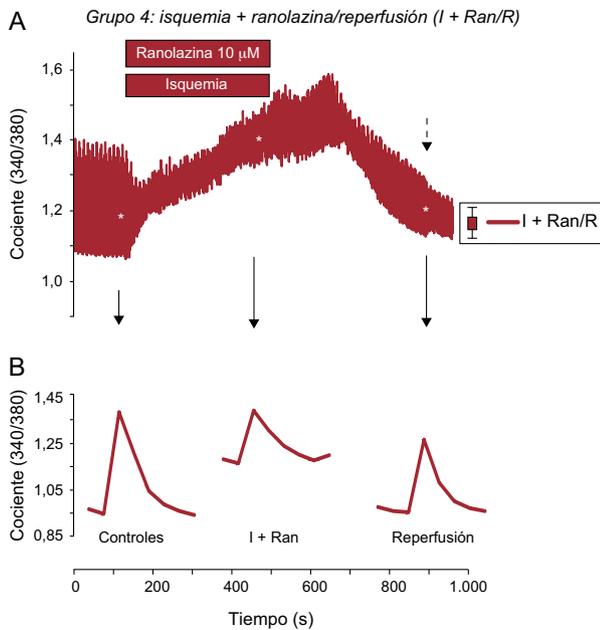


Figura 3. La adición de ranolazina durante la isquemia restableció la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} intracelular. A: los trazados muestran la media del registro de los transitorios de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos tratados con ranolazina aplicada durante la isquemia (trazo rojo). B: registro representativo de un solo aumento de los transitorios de Ca^{2+} intracelular que muestra una recuperación significativa en la reperfusion. I+Ran: isquemia + ranolazina; I+Ran/R: isquemia + ranolazina/reperfusion. La flecha discontinua indica el error estándar de la media, que se muestra a la derecha. *Significación estadística. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

que no recuperaba los valores iniciales en la reperfusion. Mientras tanto, la adición de ranolazina a la solución isquémica produjo un aumento del Ca^{2+} intracelular diastólico similar durante la isquemia, pero en este caso hubo una recuperación de los valores preisquémicos en la reperfusion sin ranolazina (figura 4A). El tratamiento de las células con ranolazina durante la isquemia restableció el aumento sistólico de Ca^{2+} intracelular a valores similares a los preisquémicos (figura 4B). El Ca^{2+} intracelular diastólico se redujo durante la reperfusion en el grupo de I+Ran/R ($105,86 \pm 3,07\%$) y fue significativamente inferior a la del grupo de IR ($116,65 \pm 1,83\%$) (figura 4C).

La ranolazina mejora la amplitud del aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusion. Registros con microscopia confocal

Con objeto de disponer de una mejor perspectiva respecto al proceso de contracción de los cardiomiocitos, se repitieron los experimentos con métodos de imagen confocales utilizando el modelo de escáner lineal¹⁴. Mediante el escáner del eje largo de los cardiomiocitos, puede realizarse un seguimiento del «rigor» de las células contracturadas durante la diástole. En primer lugar, se analizaron los transitorios de Ca^{2+} intracelular, que confirmaron los resultados de las determinaciones del Ca^{2+} realizadas con microfluorimetría (figura 5). Se observó una notable recuperación de los transitorios de Ca^{2+} intracelular después de someter a los cardiomiocitos al protocolo de IR empleando ranolazina ($10 \mu\text{M}$) durante la isquemia y retirándola al inicio de la reperfusion (figura 5A). El gráfico de barras de la figura 5B indica una disminución significativa de las amplitudes de los

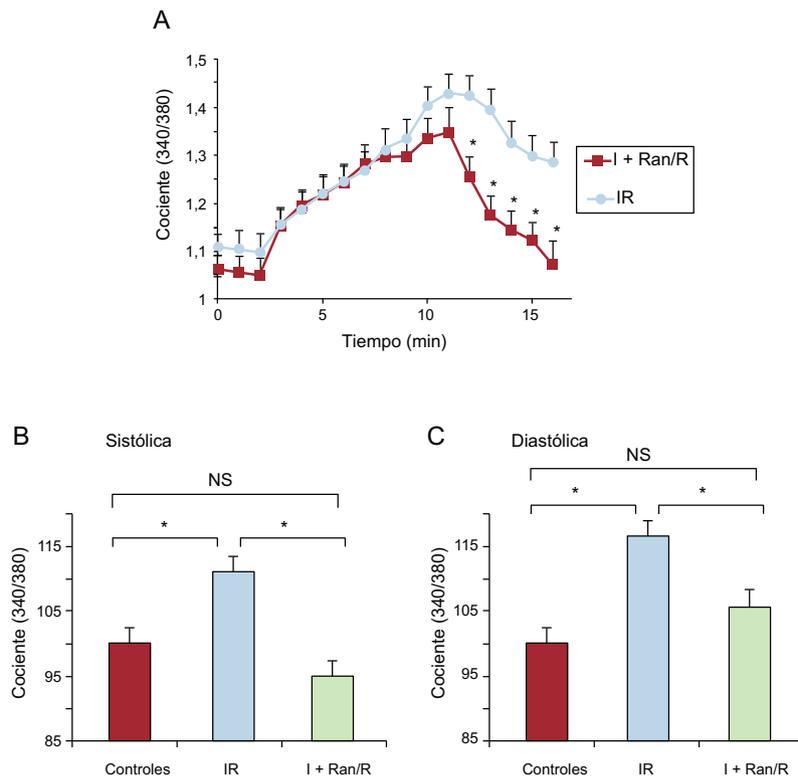


Figura 4. La ranolazina restableció los transitorios de Ca^{2+} intracelular diastólico en la reperfusion, después de la isquemia. A: representación gráfica de los cambios de Ca^{2+} intracelular diastólico durante el experimento en cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusion y cardiomiocitos sometidos a I+Ran/R; la concentración de Ca^{2+} diastólica se recuperó significativamente en las células tratadas con ranolazina. B: el gráfico de barras resume la amplitud de Ca^{2+} intracelular telesistólica en la solución de control, en isquemia-reperfusion ($n = 59$) y en I+Ran/R ($n = 30$). C: el gráfico de barras resume la amplitud de Ca^{2+} intracelular telediastólica en la solución de control, en isquemia-reperfusion ($n = 59$) y en I+Ran/R ($n = 30$). I+Ran/R: isquemia + ranolazina/reperfusion; IR: isquemia-reperfusion; NS: no significativo. * $p < 0,05$.

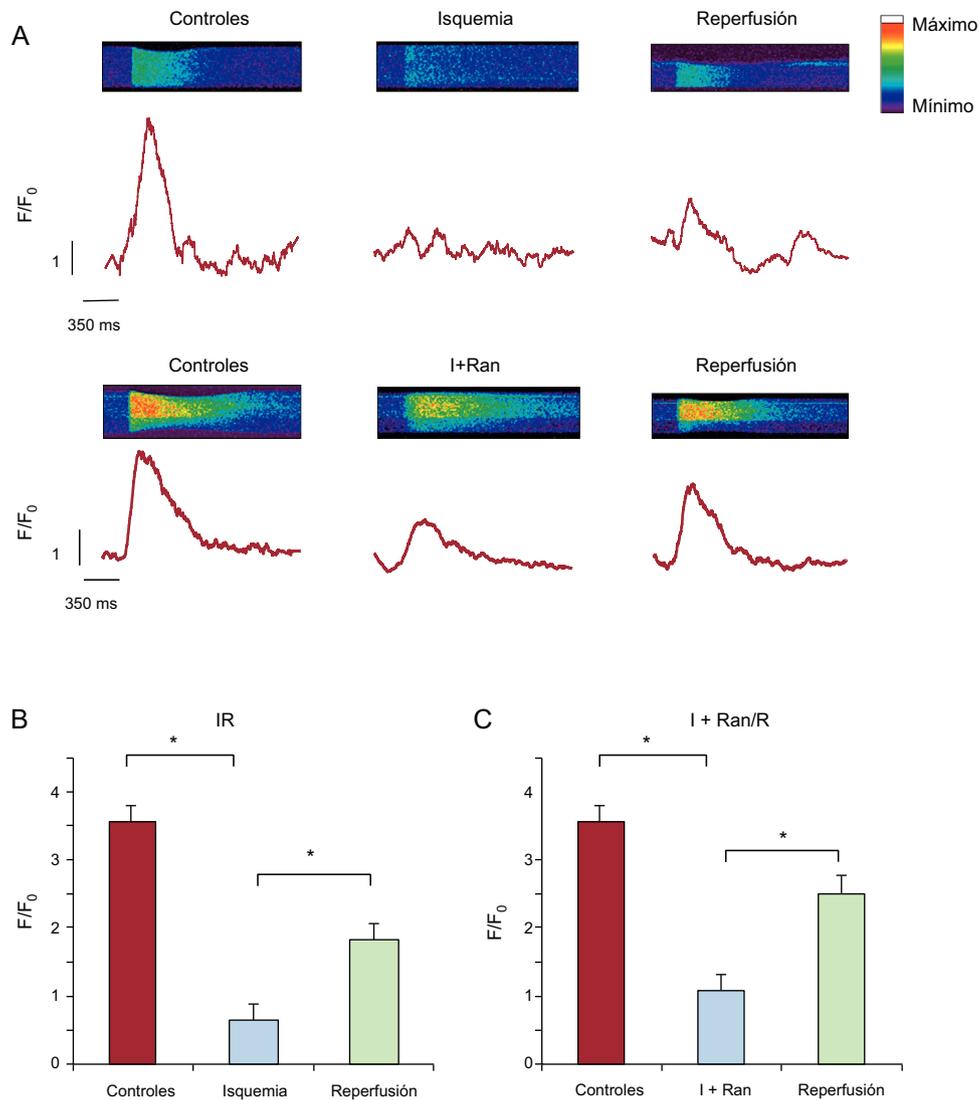


Figura 5. Efecto de la ranolazina en los transitorios de Ca^{2+} intracelular medido con microscopía confocal. A: imágenes del escáner lineal representativas (parte superior) que muestran los transitorios de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos de isquemia-reperusión y de I+Ran/R estimulados a una frecuencia de 0,5 Hz y la amplitud correspondiente de los transitorios (parte inferior). B y C: los gráficos de barras muestran los datos de resumen del cambio de amplitud de los transitorios de Ca^{2+} intracelular en un experimento como en A ($n = 4-6$). I+Ran: isquemia + ranolazina; I+Ran/R: isquemia + ranolazina/reperusión; IR: isquemia-reperusión. * $p < 0,05$. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

transitorios de Ca^{2+} intracelular, que se recuperó en parte durante la reperusión. Al mismo tiempo, en la [figura 5C](#) se muestra la recuperación significativa de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} intracelular que corresponden al protocolo de I+Ran/R. En la [figura 5C](#) se muestra también que la amplitud de los aumentos transitorios de Ca^{2+} intracelular durante la isquemia se mantuvo en presencia de ranolazina, pero no en su ausencia.

Además, el patrón de Ca^{2+} intracelular diastólico por microscopía confocal mostró un aumento significativo de Ca^{2+} intracelular diastólico durante la isquemia y una recuperación mínima con la reperusión en las células sometidas a IR ([figura 6A](#)). Sin embargo, en comparación con el protocolo de I+Ran/R, el aumento de Ca^{2+} intracelular diastólico durante la isquemia y en la reperusión fue inferior a los valores obtenidos en el grupo de IR. Por último, la ranolazina no mejoró la recuperación del acortamiento celular en las células sometidas al protocolo de I+Ran/R en comparación con las sometidas a IR ([figura 6B](#)).

La ranolazina aumentó la carga de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, pero no estimuló el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Dado que el NCX es muy importante para la homeostasis del Ca^{2+} en el cardiomiocito adulto, se estudió su intervención en la regulación del Ca^{2+} durante el protocolo de I+Ran/R. Para ello, utilizó I+Ran/R y, 3 min después de la reperusión, se aplicaron 10 mM de cafeína. En presencia de cafeína, se estudió el tau de la recuperación hasta llegar al valor basal del Ca^{2+} , que se debió principalmente a la expulsión de Ca^{2+} a través del NCX. La ranolazina no modificó este parámetro, lo cual indica que el intercambiador NCX no interviene en el aumento de Ca^{2+} intracelular producido por la ranolazina durante la isquemia ([figura 7A](#)). Sin embargo, el análisis de la carga de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, estimado mediante los transitorios de Ca^{2+} intracelular provocados por la cafeína, indica que fue mayor en las células tratadas con ranolazina que en las no tratadas, lo cual indica que la ranolazina fomentó la carga del retículo sarcoplásmico en los cardiomiocitos ([figura 7B](#)).

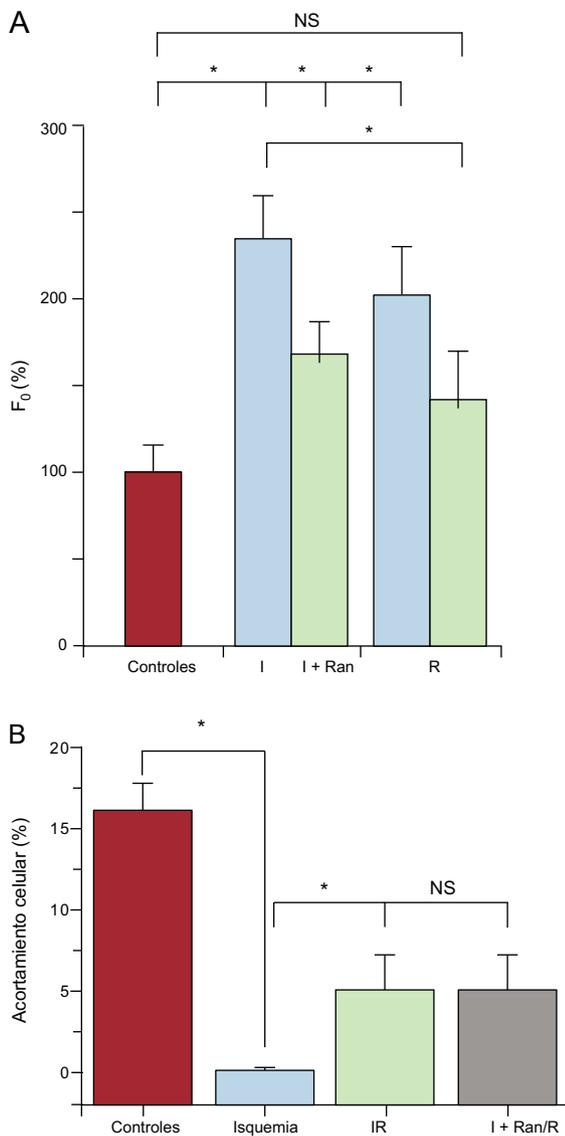


Figura 6. Cambios en el Ca^{2+} intracelular diastólico en células tratadas con ranolazina. A: gráfico de barras que compara la amplitud de la concentración de Ca^{2+} diastólica registrada en la solución de control (rojo), la isquemia y la reperusión en la isquemia-reperusión (trazado en azul, $n = 6$) y en la isquemia + ranolazina/reperusión (trazado en verde, $n = 4$) empleando microscopia confocal. B: acortamiento celular en los cardiomiocitos ($n = 10$) de la solución de control (rojo), la isquemia (azul), la isquemia-reperusión (verde) y la isquemia + ranolazina/reperusión (gris). I+Ran: isquemia + ranolazina; I+Ran/R: isquemia + ranolazina/reperusión; IR: isquemia-reperusión; NS: no significativo. * $p < 0,05$. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

DISCUSIÓN

Desde comienzos de la década de los años cincuenta, se ha realizado una intensa investigación en el campo de la protección del miocardio, con el objetivo principal de caracterizar los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en la protección miocárdica después de que el miocardio haya experimentado un proceso de IR¹⁵. En primer lugar, en un estudio previo¹⁴, se confirmó la viabilidad del modelo experimental de IR en cardiomiocitos aislados, en los que se pudo analizar los cambios estructurales *in vivo* y de Ca^{2+} intracelular que se producen en el proceso de IR¹⁴. A continuación, en este estudio se presentan nuevas evidencias que indican que la ranolazina, un fármaco ampliamente utilizado en los tratamientos antianginosos¹⁶, puede

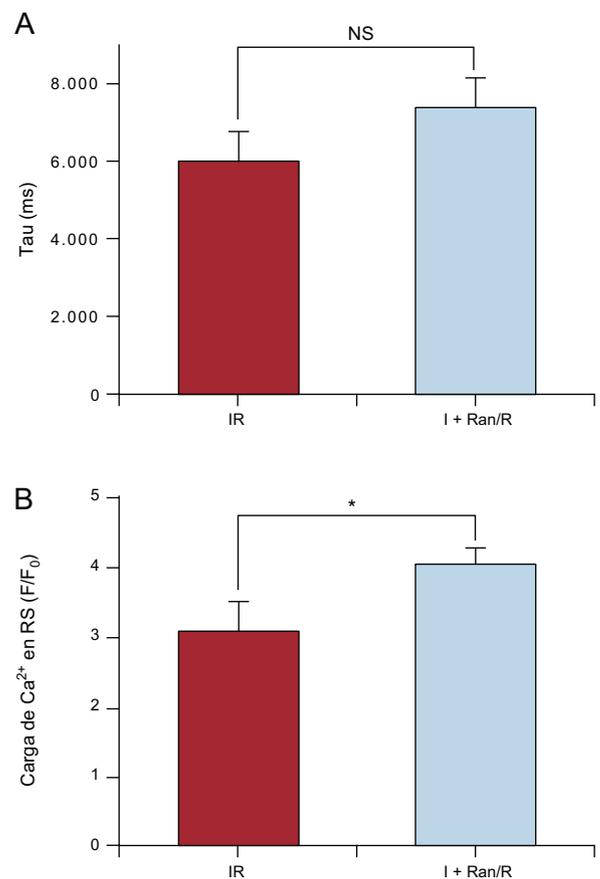


Figura 7. Efecto de la ranolazina en el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la carga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. A: el gráfico de barras muestra el análisis de la reducción de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} intracelular (tau, en milisegundos) inducida por 10 mM de cafeína, que eleva la función del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. B: valor máximo de los transitorios de Ca^{2+} provocados por la cafeína, que estiman la carga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. I+Ran/R: isquemia + ranolazina/reperusión; IR: isquemia-reperusión; NS: no significativo; RS: retículo sarcoplásmico. Los datos proceden de células sometidas al protocolo de isquemia-reperusión y de células tratadas con ranolazina en la isquemia (isquemia + ranolazina/reperusión). Datos de resumen procedentes de 37 células. * $p < 0,05$.

proporcionar a los cardiomiocitos protección contra la lesión por IR regulando el Ca^{2+} intracelular de manera independiente de su efecto en la I_{NaL} . Empleando dos enfoques diferentes para analizar los cambios de Ca^{2+} intracelular, se estudiaron los cambios de Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos sometidos a isquemia y/o reperusión y el papel de la ranolazina, que es capaz de reducir la sobrecarga de Ca^{2+} generada en los procesos de IR. En este estudio, se confirma que la aplicación de ranolazina durante la isquemia miocárdica restablece de forma significativa la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} intracelular en la reperusión. Además, no solo se observó una mejora de la amplitud de los transitorios, sino también que el Ca^{2+} intracelular diastólico, que se mantenía elevado durante todo el periodo de isquemia, volvía a valores basales después del tratamiento con ranolazina durante la isquemia. Estos datos concuerdan con lo indicado por los estudios de Hwang et al¹⁷, en corazones de rata perfundidos en un sistema de Langendorff, a los que se aplicó ranolazina antes de la isquemia. Esos autores observaron que los transitorios de Ca^{2+} intracelular, abolidos por la interrupción de la función del ventrículo izquierdo después de cierto periodo de isquemia, se restablecían rápidamente durante la reperusión posisquémica con ranolazina¹⁷. Sin embargo, en este estudio, el Ca^{2+} intracelular residual se mantuvo significativamente alto en comparación con el valor basal previo a

la inducción de la isquemia¹⁷. Además, en este estudio, el análisis de los transitorios de Ca^{2+} intracelular provocados por cafeína indica que la ranolazina aumenta la eficiencia de la carga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, lo cual es esencial para conservar un acoplamiento eficiente de la excitación-contracción en los cardiomiocitos después de un periodo de isquemia. Además, el análisis de la constante de tiempo de reducción de los transitorios de Ca^{2+} intracelular (τ) puso de manifiesto que el tratamiento con ranolazina durante la isquemia no aumentaba la expulsión de Ca^{2+} a través del NCX. Así pues, el NCX no parece involucrado en el aumento del Ca^{2+} intracelular diastólico en la reperfusión, cuando se trata a las células con ranolazina durante la isquemia. En consecuencia, debe haber otros mecanismos alternativos que expliquen este efecto de la ranolazina en el Ca^{2+} intracelular, que será útil investigar.

La mayoría de los estudios previos han aplicado la ranolazina antes de la isquemia^{17,18}. En este caso se aplicó el fármaco una vez iniciada la isquemia y/o en la reperfusión. El objetivo era reproducir lo que podría ocurrir en la situación clínica en que los fármacos deberán administrarse al inicio de la reperfusión. Se observaron efectos beneficiosos significativos en la regulación del Ca^{2+} intracelular solo cuando la ranolazina se aplicó durante la isquemia, lo cual podría limitar su uso en una aplicación clínica para pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Sin embargo, se cree que sigue siendo importante comprender estos efectos en la homeostasis del Ca^{2+} de los cardiomiocitos en la IR.

En las últimas décadas, ha habido una verdadera explosión de información respecto a los cambios de la contractilidad tras el síndrome de IR, como en el caso de los procesos denominados de «miocardio aturdimiento» (aturdimiento) y de hibernación del corazón^{19,20}. El Ca^{2+} desempeña un papel central en la regulación de la contracción y la frecuencia cardíaca y se ha asociado a la presencia de cardiopatía, de manera directa o indirecta, y a cambios de comportamiento del Ca^{2+} intracelular²¹⁻²³. La sobrecarga de Ca^{2+} intracelular causa un aumento de la interacción diastólica de los miofilamentos de actina/miosina y el aumento de la presión diastólica ventricular izquierda (p. ej., «rigidez», incapacidad de relajación normal). Este trastorno diastólico se produce a causa de la prolongación de los potenciales de acción y el funcionamiento lento de las bombas bioquímicas, que son necesarias para la recaptación del calcio intracelular^{24,25}. En consecuencia, el trabajo de contracción del miocardio, el consumo de oxígeno y la compresión del espacio vascular durante la diástole pueden ser anormalmente altos. La compresión del espacio vascular da lugar a una reducción del flujo sanguíneo miocárdico, que reduce el aporte de oxígeno, especialmente en la región subendocárdica del ventrículo izquierdo, al tiempo que aumenta la demanda de oxígeno para respaldar el trabajo contráctil. Este patrón de causa-efecto tiene las características de un sistema de «realimentación» positiva nocivo, en el que la isquemia genera aún más isquemia^{26,27}. Con los experimentos realizados con la presente investigación, se demostró que el Ca^{2+} intracelular diastólico se recuperó de manera significativa en los cardiomiocitos de rata adultos sometidos a un protocolo de IR cuando se aplicó la ranolazina durante la isquemia. Estos datos son coherentes con los resultados de otros estudios^{18,28}, en los que el efecto de la ranolazina se produjo con la inhibición de la I_{NaL} utilizando un modelo de corazón completo. La ranolazina redujo la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, restableciendo unos valores diastólicos posisquémicos próximos a los basales previos a la isquemia. Sossalla et al²⁹ estudiaron el posible efecto de la ranolazina en la sobrecarga diastólica de Na^+ y Ca^{2+} intracelulares y su capacidad de mejorar la función diastólica en las fibras de músculo de los ventrículos de corazones humanos procedentes de pacientes con insuficiencia cardíaca en fase terminal tratados con trasplante de

corazón²⁹. Además, para investigar el efecto beneficioso de la ranolazina en la presión diastólica, utilizaron la toxina II de *Anemonia sulcata* (40 nM) para aumentar la concentración de Na^+ intracelular en miocitos ventriculares del conejo. En presencia de ranolazina, la I_{NaL} , al igual que los valores diastólicos de Na^+ y Ca^{2+} intracelulares, disminuyó en todas las frecuencias de marcapasos. Además, la ranolazina aceleró significativamente la disminución de los transitorios de Ca^{2+} , que inicialmente había pasado a ser más lenta por la acción de la toxina II de *A. sulcata*³⁰.

CONCLUSIONES

Estos resultados ponen claramente de manifiesto que, cuando se administra durante la isquemia, la ranolazina protege a los cardiomiocitos de rata adultos aislados del daño causado por la IR, con lo que mejora el proceso de acoplamiento de excitación-contracción y reduce la sobrecarga de Ca^{2+} en la reperfusión, lo cual es de gran interés para preservar la contractilidad del corazón contra las lesiones por IR.

AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a Florence Lefebvre por su ayuda en el aislamiento de las células.

FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (BFU2013-45564-C2-2), el Instituto de Salud Carlos III (PI12/00941) y la RIC (Red de Investigación Cardiovascular) (RD12/0042/0041; RD12/0042/0030), el Gobierno de Andalucía (PI-0108-2012; P10-CVI-6095) y la ANR (*Agence Nationale de la Recherche*) francesa (ANR-13-BSV1-0023-01).

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Townsend N, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Smolina K, Nichols M, Leal J, et al; British Heart Foundation Health Promotion Research Group. Coronary heart disease statistics. A compendium of health statistics 2012 edition. Oxford: University of Oxford Edition British Heart Foundation; 2012.
2. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey Jr DE, Chung MK, De Lemos JA, et al. American College of Emergency Physicians; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:e78-140.
3. Urbano-Moral JA, Lopez-Haldon JE, Fernandez M, Mancha F, Sanchez A, Rodriguez-Puras MJ, et al. Prognostic value of different serum biomarkers for left ventricular remodelling after ST-elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart.* 2012;98:1153-9.
4. Prescimone T, Lionetti V, Cabiati M, Caselli C, Aquaro GD, Matteucci M, et al. Apoptotic transcriptional profile remains activated in late remodeled left ventricle after myocardial infarction in swine infarcted hearts with preserved ejection fraction. *Pharmacol Res.* 2013;70:41-9.
5. Eltzhig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004;70:71-86.
6. Kristian T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 1998;29:705-18.
7. Ruiz-Meana M, David García-Dorado D. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:199-209.
8. Hale SL, Leeka JA, Kloner RA. Improved left ventricular function and reduced necrosis after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits treated with ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:418-23.
9. Cheng JW. Ranolazine for the management of coronary artery disease. *Clin Ther.* 2006;28:1996-2007.
10. Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H. The mechanism of ranolazine action to reduce ischemia-induced diastolic dysfunction. *Eur Heart J Suppl.* 2006;8:A10-3.

11. Cordero A, Agudo P, Bertomeu-Martínez V. Utilidades terapéuticas de la ranolazina en la cardiopatía isquémica. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2010;10(B):55–61.
12. Tamargo J, Amorós I, Barana A, González M, Dolz P, Gómez R, et al. Farmacología clínica de la ranolazina, un nuevo fármaco en el tratamiento de la angina crónica estable. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013;10(B):41–54.
13. Calderón-Sánchez E, Delgado C, Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Cachafeiro V, Rodríguez-Moyano M, et al. Uroctin induces positive inotropic effect in rat heart. *Cardiovasc Res.* 2009;83:717–25.
14. Calderón-Sánchez EM, Ruiz-Hurtado G, Smani T, Delgado C, Benitah JP, Gómez AM, et al. Cardioprotective action of uroctin in postconditioning involves recovery of intracellular calcium handling. *Cell Calcium.* 2011;50:84–90.
15. Calderón Sánchez EM. Potenciación de los mecanismos endógenos de protección miocárdica frente al síndrome de isquemia-reperfusión [tesis doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2009.
16. Kloner R, Dowl J, Bhandari A. The antianginal agent ranolazine is a potent antiarrhythmic agent that reduces ventricular arrhythmias: through a mechanism favoring inhibition of late sodium channel. *Cardiovasc Ther.* 2011;29:e36–41.
17. Hwang H, Arcidi Jr JM, Hale SL, Simkhovich BZ, Belardinelli L, Dhalla AK, et al. Ranolazine as a cardioplegia additive improves recovery of diastolic function in isolated rat hearts. *Circulation.* 2009;120(11 Suppl):S16–21.
18. Soliman D, Wang L, Hamming KS, Yang W, Fatehi M, Carter CC, et al. Late sodium current inhibition alone with ranolazine is sufficient to reduce ischemia- and cardiac glycoside-induced calcium overload and contractile dysfunction mediated by reverse-mode sodium/calcium exchange. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343:325–32.
19. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation.* 2001;104:2981–9.
20. Duncker DJ, Schulz R, Ferrari R, García-Dorado D, Guarnieri C, Heusch G, et al. "Myocardial stunning" remaining questions. *Cardiovasc Res.* 1998;38:549–58.
21. Hove-Madsen L. Asociación de la miocardiopatía chagásica con el comportamiento anormal del calcio diastólico. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:451–2.
22. Marban E, Koretsune Y, Corretti M, Chacko VP, Kusuoka H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1989;80(6 Suppl):IV17–22.
23. Lee JA, Allen DG. Mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart. Role of intracellular calcium. *J Clin Invest.* 1991;88:361–7.
24. Armondas AA, Rose J, Aggarwal R, Stuyvers BD, O'Rourke B, Kass DA, et al. Cellular and molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in the failing rabbit heart: primary defects in SR Ca^{2+} uptake and release mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1607–18.
25. Wickenden AD, Kaprielian R, Kassiri Z, Tsoporis JN, Tsushima R, Fishman GI, et al. The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37:312–23.
26. Luna Ortiz P, Serrano Valdes X, González Chon O, Santibañez Escobar F. Disfunción ventricular izquierda en el perioperatorio de cirugía cardiaca. *Rev Mex Anest.* 2002;25:112–28.
27. Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H. Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart.* 2006;92:IV6–14.
28. Aldakkak M, Camara AKS, Heisner JS, Yang M, Stowe DF. Ranolazine reduces Ca^{2+} overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2011;64:381–92.
29. Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, et al. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts—role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45:32–43.
30. Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeigh JJ, Clanachan AS. Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:1031–8.