

Artículo original

La ivabradina induce cardioprotección previniendo la degradación de la matriz extracelular inducida por *shock* cardiogénico

Laura Tesoro^{a,b,◇}, Rafael Ramirez-Carracedo^{b,◇}, Ignacio Hernandez^{a,b}, Javier Diez-Mata^{a,b}, Marina Pascual^c, Marta Saura^{b,d}, Marcelo Sanmartín^{b,c}, José Luis Zamorano^{b,c} y Carlos Zaragoza^{a,b,*}

^a Unidad de Investigación Cardiovascular, Departamento de Cardiología, Universidad Francisco de Vitoria, Hospital Ramón y Cajal (IRYCIS), Madrid, España

^b Centro de Investigación en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), España

^c Departamento de Cardiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), Madrid, España

^d Unidad de Fisiología, Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá (IRYCIS), Alcalá de Henares, Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 7 de marzo de 2020

Aceptado el 11 de septiembre de 2020

On-line el 24 de diciembre de 2020

Palabras clave:

Ivabradina

Shock cardiogénico

EMMPRIN

MMP-9

Caveolina-3

HCN4

RESUMEN

Introducción y objetivos: La ivabradina reduce el ritmo cardiaco bloqueando la corriente I(f) y conserva la presión sanguínea y el volumen sistólico por mecanismos aún desconocidos. La caveolina-3 induce cardioprotección formando complejos con varias proteínas, como el inductor de metaloproteinasas EMMPRIN y HCN4, la diana de la ivabradina. Consideramos que la cardioprotección de la ivabradina se basa en la inhibición la degradación de la matriz extracelular.

Métodos: En un modelo porcino de *shock* cardiogénico, se estudió la integridad del corazón, las concentraciones de MMP-9 y EMMPRIN y la estabilidad de los complejos proteicos caveolina-3/HCN4 con EMMPRIN en respuesta a la ivabradina.

Resultados: La administración de ivabradina 0,3 mg/kg redujo significativamente la necrosis y la expresión de MMP-9 tras el *shock* cardiogénico, mientras que el ARNm de EMMPRIN, su proteína y la glucosilación (requerida para la activación de las MMP) no se vieron afectados. Sin embargo, los complejos caveolina-3/LG-EMMPRIN (EMMPRIN poco glucosilado) y caveolina-3/HCN4 aumentaron, mientras que la ivabradina inhibió también el nuevo complejo encontrado entre HCN4 y el EMMPRIN muy glucosilado. Para comprobar si la caveolina-3 puede ser puente entre HCN4 y EMMPRIN, el complejo HCN4/EMMPRIN se mantuvo incluso tras el silenciamiento génico de la caveolina-3, lo que indica una interacción directa de ambas proteínas. De manera similar, el silenciamiento de EMMPRIN redujo significativamente el complejo caveolina-3/HCN4, que regula la I(f).

Conclusiones: Además de la inhibición de la I(f), la ivabradina puede inducir cardioprotección al inhibir la degradación de la matriz extracelular por conservar el complejo caveolina-3/LG-EMMPRIN y controlar el ritmo cardiaco estabilizando el complejo caveolina-3/HCN4.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Ivabradine induces cardiac protection by preventing cardiogenic shock-induced extracellular matrix degradation

ABSTRACT

Introduction and objectives: Ivabradine reduces heart rate by blocking the I(f) current and preserves blood pressure and stroke volume through unknown mechanisms. Caveolin-3 protects the heart by forming protein complexes with several proteins, including extracellular matrix (ECM)-metallopeptidase-inducer (EMMPRIN) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 (HCN4), a target of ivabradine. We hypothesized that ivabradine might also exert cardioprotective effects through inhibition of ECM degradation.

Methods: In a porcine model of cardiogenic shock, we studied the effects of ivabradine on heart integrity, the levels of MMP-9 and EMMPRIN, and the stability of caveolin-3/HCN4 protein complexes with EMMPRIN.

Results: Administration of 0.3 mg/kg ivabradine significantly reduced cardiogenic shock-induced ventricular necrosis and expression of MMP-9 without affecting EMMPRIN mRNA, protein, or protein glycosylation (required for MMP activation). However, ivabradine increased the levels of the caveolin-3/LG-EMMPRIN (low-glycosylated EMMPRIN) and caveolin-3/HCN4 protein complexes and decreased that of a new complex between HCN4 and high-glycosylated EMMPRIN formed in response to cardiogenic shock. We next tested whether caveolin-3 can bind to HCN4 and EMMPRIN and found that the HCN4/

Keywords:

Ivabradine

Cardiogenic shock

EMMPRIN

MMP-9

Caveolin-3

HCN4

* Autor para correspondencia: Universidad Francisco de Vitoria, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 3.100, 28322 Pozuelo de Alarcón, Madrid, España.

Correo electrónico: c.zaragoza.prof@ufv.es (C. Zaragoza).

◇ Ambos autores han contribuido por igual a este trabajo.

EMMPRIN complex was preserved when we silenced caveolin-3 expression, indicating a direct interaction between these 2 proteins. Similarly, EMMPRIN-silenced cells showed a significant reduction in the binding of caveolin-3/HCN4, which regulates the I(f) current, suggesting that, rather than a direct interaction, both proteins bind to EMMPRIN.

Conclusions: In addition to inhibition of the I(f) current, ivabradine may induce cardiac protection by inhibiting ECM degradation through preservation of the caveolin-3/LG-EMMPRIN complex and control heart rate by stabilizing the caveolin-3/HCN4 complex.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

EMMPRIN: inductor de metaloproteasas de la matriz extracelular
HCN4: canal 4 regulado por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización
MMP-9: metaloproteína 9 de matriz
SC: *shock* cardiogénico

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se han prescrito bloqueadores beta e inhibidores de los canales del calcio para reducir la frecuencia cardiaca de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica¹. Sin embargo, ha sido necesario desarrollar nuevos fármacos por varios motivos, entre los cuales pueden citarse la intolerancia del paciente a los bloqueadores beta y los efectos inotrópicos negativos de los fármacos.

La ivabradina es un inhibidor selectivo de la corriente I(f) del marcapasos en las células sinoauriculares. Al inhibir los canales 1 y 4 regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN1 y HCN4), la ivabradina reduce la frecuencia cardiaca al tiempo que mantiene la presión arterial y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI)², sin efectos adversos. El estado abierto de los canales de HCN, controlado por la concentración intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), regula la despolarización diastólica. Si bien la administración de bloqueadores beta reduce considerablemente la frecuencia cardiaca dependiente de la AMPc, la ivabradina mantiene la contractilidad cardiaca independientemente de la frecuencia cardiaca³, lo que hace de este fármaco uno de los más recomendados en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca crónica con FEVI < 35%. No obstante, su eficacia en la insuficiencia cardiaca aguda aún está por explorar.

El *shock* cardiogénico (SC) es la principal causa recurrente de muerte después de un infarto agudo de miocardio. La administración de fármacos vasoactivos en este contexto es necesaria para conseguir la adecuada perfusión de órganos, pero puede contribuir a la lesión miocárdica mediante taquicardia extensa, disminución de la eficiencia ventricular, aumento del estrés oxidativo y demanda miocárdica de oxígeno excesiva. Varios grupos de investigación⁴ han encontrado que la ivabradina mejora la taquicardia sinusal inducida por catecolaminas en el SC y corrige los parámetros hemodinámicos mediante mecanismos aún desconocidos.

Recientemente se ha propuesto que la ivabradina participa en la conservación de la matriz extracelular (MEC) en el contexto de la osteoartritis, la diabetes⁵ y la aterosclerosis⁶. Además, la ivabradina puede reducir la apoptosis de los cardiomiocitos en la miocarditis viral crónica⁷, en un modelo murino de hipertrofia cardiaca por constricción aórtica⁸, en la insuficiencia cardiaca

aguda y crónica^{9,10} y en la miocardiopatía diabética¹¹. Sin embargo, aún se desconoce cómo la ivabradina ayuda a inhibir la degradación de la MEC y reducir la muerte celular.

Aunque HCN4 es la diana principal de la ivabradina, no está claro a través de qué mecanismo HCN4 podría alterar la degradación de la MEC. HCN4 forma complejos macromoleculares con caveolina-3, una proteína que se expresa principalmente en las caveolas de los cardiomiocitos, con lo que se regula la actividad de marcapasos cardiaca. Asimismo, la caveolina-3 puede interactuar con otras proteínas para modular su función, como ya se ha descrito en el contexto de la isquemia/reperfusión cardiaca, en la que la caveolina-3 tiene función de cardioprotector al combinarse el inductor de metaloproteasas de la matriz extracelular (EMMPRIN), con lo que inhibe no solo la degradación de la MEC, sino también la apoptosis cardiaca⁸.

Para evaluar si la ivabradina puede mantener la contractilidad del miocardio más allá de la corriente I(f), se estudió la integridad del corazón en un modelo porcino con SC y se analizó la contribución de la ivabradina a la conservación de la MEC examinando las enzimas involucradas en la degradación de la MEC y los mecanismos moleculares subyacentes.

MÉTODOS

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron en los centros de cirugía experimental de nuestro instituto. La investigación se ajustó a la *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* publicada por los *US National Institutes of Health* (publicación de los NIH n.º 85-23, revisada en 1985) y el *Animal Welfare Ethics Committee* cumplió con la Directiva de la UE sobre animales de laboratorio (63/2010 UE) y la legislación española relacionada (RD 53/2013), y recibió la correspondiente aprobación local (PROEX 365-15). Los procedimientos detallados se presentan en la [figura 1 del material adicional](#).

Reactivos

En el [material adicional](#) se presenta una lista detallada de reactivos.

Animales e intervención por *shock* cardiogénico

Se indujo SC a 20 cerdas Yorkshire (37,8 ± 5,2 kg); la tasa de supervivencia fue del 90%. Al final de la intervención experimental, 10 animales recibieron ivabradina 0,3 mg/kg y 10 recibieron placebo (solución salina); 2 animales (1 de cada grupo) no sobrevivieron más de 24 h después del SC.

Se anestesió a los cerdos, previamente tratados con ketamina intramuscular (10 mg/kg) y midazolam (0,5 mg/kg), mediante inhalación de isoflurano con perfusión continua de propofol (2 ml/kg/h), fentanilo (50 mg/kg/h) y diazepam (10 mg/kg/h). Los animales fueron intubados y ventilados con una saturación de

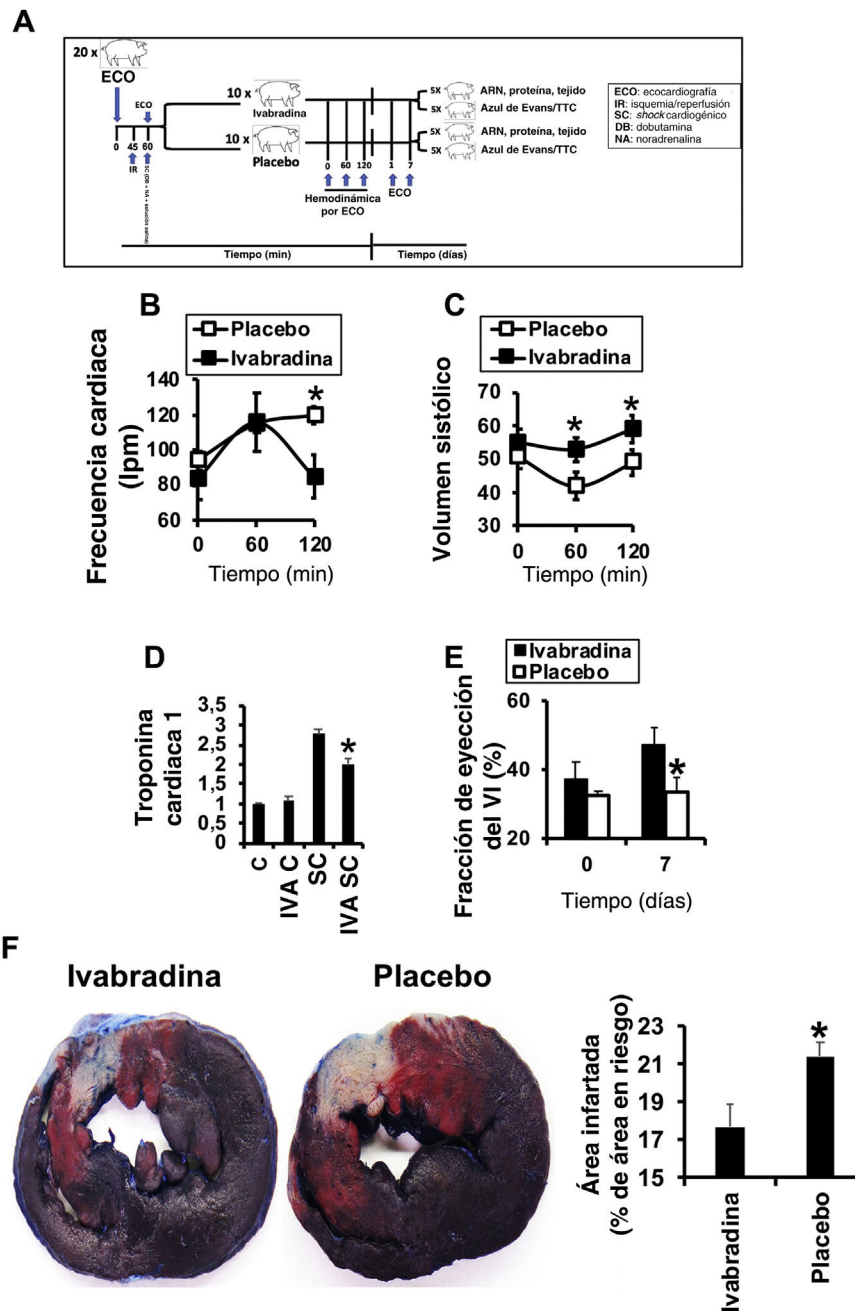


Figura 1. La ivabradina mejora la función cardíaca en un modelo porcino de SC. A: representación esquemática del ensayo. B y C: efectos de ivabradina 0,3 mg/kg o placebo en la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico después del SC. D: concentraciones de troponina cardíaca antes y a las 24 h del SC (n = 9 por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *ivabradina frente a placebo, $p < 0,05$). E: fracción de eyección del ventrículo izquierdo (N = 9/grupo) a los 7 días del SC. F: área necrótica (n = 5 por grupo) como porcentaje de tejido necrótico (pálido) frente al área en riesgo (rojo) a los 7 días del SC (media $\pm$ desviación estándar; *ivabradina frente a placebo, $p < 0,05$). SC: shock cardiogénico. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

oxígeno del 100%. Además, los animales recibieron 5.000 UI de heparina y amiodarona (2 mg/kg/h) para evitar la coagulación sanguínea en los catéteres y arritmias cardíacas malignas respectivamente.

Se indujo isquemia/reperfusión mediante la oclusión de la arteria descendente anterior izquierda durante 45 min con un catéter JL 3 de 6 Fr e inflado de balón a 5 atm; se indujo sobrecarga de volumen administrando 500 ml de hidroxietil-almidón y 1.500 ml de suero salino al 0,9%. En los casos en que se produjo fibrilación ventricular/taquicardia ventricular, se administró una descarga de CC bifásica (10-20 J) combinada con compresiones torácicas manuales directas. Las mediciones hemodinámicas se registraron a los 15, 30 y 45 min

de isquemia. Posteriormente, se administraron noradrenalina (20-80 μ g/kg/h), dobutamina (240-660 μ g/kg/h) y solución salina fisiológica (1.000-2.000 ml) hasta que la frecuencia cardíaca superó los 90 lpm. A los 45 min de oclusión de la arteria descendente anterior izquierda, se aleatorizó a los animales a un grupo de control o a otro con administración de ivabradina.

La ivabradina en polvo se pesó en una balanza de laboratorio de alta precisión y se diluyeron en agua destilada a un mínimo de 12 mg/ml. A continuación, la solución se traspasó a una jeringuilla de 10 ml para la administración intravenosa al animal de un bolo lento de 0,3 ml/kg. El grupo de control recibió un volumen equivalente de solución salina fisiológica.

Tinción con azul de Evans/trifenil tetrazolio

La extensión del infarto de miocardio se evaluó mediante perfusión con el reactivo azul de Evans al 5% (en suero) y tinción de trifenil tetrazolio (TTC) como se ha descrito con anterioridad¹² (para obtener más detalles, consulte el [material adicional](#)).

Determinación de las concentraciones plasmáticas de troponina I

La troponina I plasmática se midió con el *kit* comercial Human Cardiac Troponin 1 SimpleStep ELISA (Abcam, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ecocardiografía

Los corazones de cerdo se visualizaron mediante el ecocardiógrafo Vivid Q de GE Healthcare (Estados Unidos) equipado con un cabezal de exploración de 1,9 a 4,0 MHz, como se ha descrito con anterioridad¹³. Se ofrece más información en el [material adicional](#).

Células

Las células H9c2 y HL1B se cultivaron como se ha descrito con anterioridad¹⁴ y en el [material adicional](#). Las células se cultivaron en condiciones de hipoxia en cámaras de cultivo de hipoxia en atmósfera humidificada con un 1% de oxígeno, un 5% de dióxido de carbono y un 94% de nitrógeno. La reoxigenación se realizó en medio fresco.

Histología e inmunohistoquímica

Las técnicas de histológica, inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia se realizaron como se ha descrito con anterioridad^{13,14}.

Análisis de inmunoprecipitación e inmunotransferencia

El aislamiento de los lisados de proteínas, las inmunoprecipitaciones y las inmunotransferencias se realizaron como se ha descrito con anterioridad¹³.

Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se realizó como se ha descrito con anterioridad⁸. En el [material adicional](#) se ofrece más información. Se utilizaron los siguientes cebadores: EMMPRIN directo: 5'-GGC ACC ATC GTA ACC TCT GT-3'; EMMPRIN inverso: 5'-CAC TGG CGT GTT CCG ATT TC-3'; β -actina directa: 5'-CTT AGT TGC GTT ACA CCC TTT CT-3'; y β -actina inversa: 5'-CTG TCA CCT TCA CCG TTC CAG TT-3'.

Análisis estadísticos

Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 22.0 (SPSS Inc., Estados Unidos). Todos los valores se presentan como media $\pm$ desviación estándar. La significación se informa al nivel del 5%. Siempre que se establecieron comparaciones con un control común, la significación de las diferencias se probó mediante análisis de varianza seguido de la modificación de Dunnett de la prueba de la *t* de Student.

RESULTADOS

La ivabradina reduce la necrosis del ventrículo izquierdo después del shock cardiogénico

En cerdos sometidos a SC (figura 1A), la administración intravenosa de ivabradina 0,3 mg/kg o solución salina se asoció con una reducción considerable de la frecuencia cardíaca (figura 1B), conservación del volumen sistólico (figura 1C) y reducción de las concentraciones de troponina cardíaca, indicativas de lesión isquémica, 24 h después del SC (figura 1D). Los efectos de la ivabradina en la función cardíaca se determinaron mediante ecocardiografía, que reveló una mejora importante de la FEVI el séptimo día después del SC en animales tratados con ivabradina (figura 1E). Esta mejora se correlacionó estrechamente con una disminución del área necrótica del ventrículo izquierdo, detectado mediante la doble tinción con azul de Evans/TTC (figura 1F).

La ivabradina reduce la expresión cardíaca de enzimas que degradan la matriz extracelular

La isquemia/reperfusión coronaria induce la expresión de enzimas de degradación de la MEC cardíaca, incluidas las metaloproteinasas de la matriz (MMP). La administración de ivabradina 0,3 mg/kg redujo las concentraciones de MMP-9 en el área necrótica del ventrículo izquierdo el séptimo día después del SC, según lo detectado por inmunohistoquímica e inmunotransferencia con anticuerpos anti-MMP-9 (figura 2A,B respectivamente).

El papel de EMMPRIN como inductor de la expresión y actividad de MMP-9 se ha descrito con anterioridad³, aunque en nuestro modelo porcino la expresión inducida por SC del ARNm de EMMPRIN no se inhibió con la administración de ivabradina 0,3 mg/kg (figura 3A). Sin embargo, en respuesta al SC, la ivabradina fue capaz de reducir tanto la concentración de EMMPRIN como su glucosilación, sin afectar a su degradación proteolítica, como se observa tras la incubación de lisados celulares de miocitos H9c2 con el inhibidor del proteosoma MG-132 (figura 3B). Además, la incubación de células H9c2 en reposo con ivabradina no inhibió la glucosilación de EMMPRIN (un paso clave en la expresión y la actividad de las MMP mediada por EMMPRIN), como se observó con el tratamiento de células durante 24 h con tunicamicina 5 μ g/ml, un inhibidor farmacológico de la N-glucosilación (figura 3C), y se obtuvieron resultados semejantes en cultivos celulares de miocitos HL1B (figura 1 del [material adicional](#)). En cambio, *in vivo* y en respuesta al SC, en comparación con los cerdos sometidos a SC y tratados con placebo, la ivabradina redujo considerablemente las formas de EMMPRIN muy glucosiladas (HG-EMMPRIN), lo que originó la acumulación de formas de EMMPRIN poco glucosiladas (LG-EMMPRIN) mediante mecanismos aún desconocidos (figura 3D).

La ivabradina previene la interrupción del complejo caveolina-3/EMMPRIN inducida por shock cardiogénico

Las caveolas son vesículas enriquecidas con esfingolípidos y colesterol donde se localizan muchas vías de señalización que desempeñan funciones clave en la supervivencia, la muerte, la proliferación o la migración celulares. En el corazón, el componente principal de las caveolas es la caveolina-3, que ejerce funciones cardioprotectoras al unirse a varias proteínas. Previamente se demostró que el óxido nítrico induce cardioprotección al estabilizar el complejo caveolina-3/LG-EMMPRIN y, por lo tanto, prevenir la necrosis cardíaca inducida por MMP dependiente de HG-EMMPRIN¹⁴. En este caso, se ha detectado una fuerte

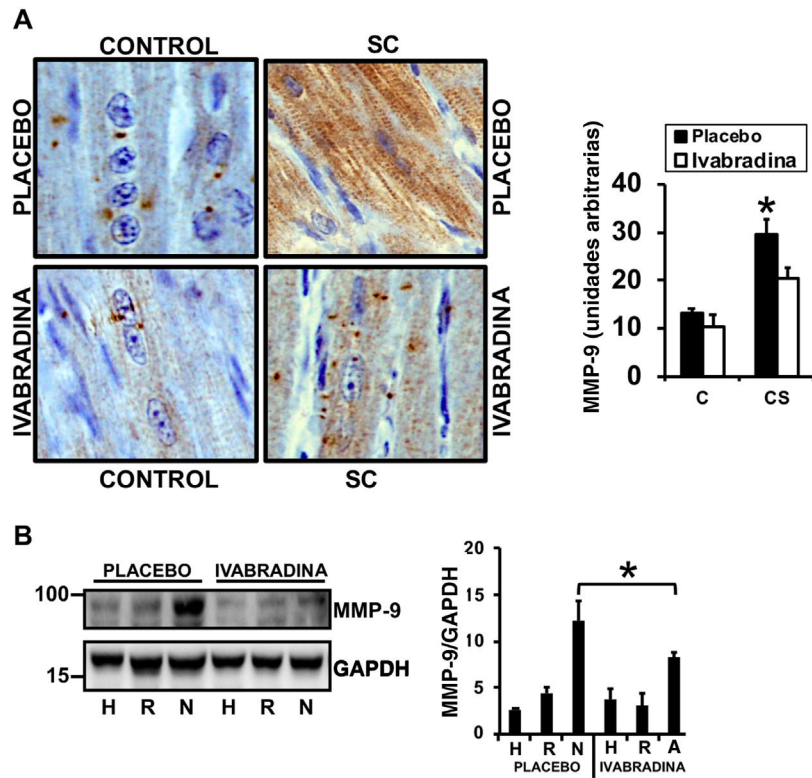


Figura 2. La ivabradina reduce la concentración de enzimas que degradan la matriz extracelular en el corazón. A: detección de MMP-9 en las áreas necróticas de corazones sometidos a SC en respuesta a placebo o ivabradina ($n = 5$ por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *necrosis e ivabradina frente a necrosis y placebo, $p < 0,05$). B: *immunoblot* de pro-MMP-9 de 92 kDa de secciones sanas (S), en riesgo (R) y necróticas (N) de corazones sometidos a SC ($n = 5$ por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *necrosis e ivabradina frente a necrosis y placebo, $p < 0,05$). MMP-9: metaloproteína 9 de matriz; SC: *shock* cardiogénico. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

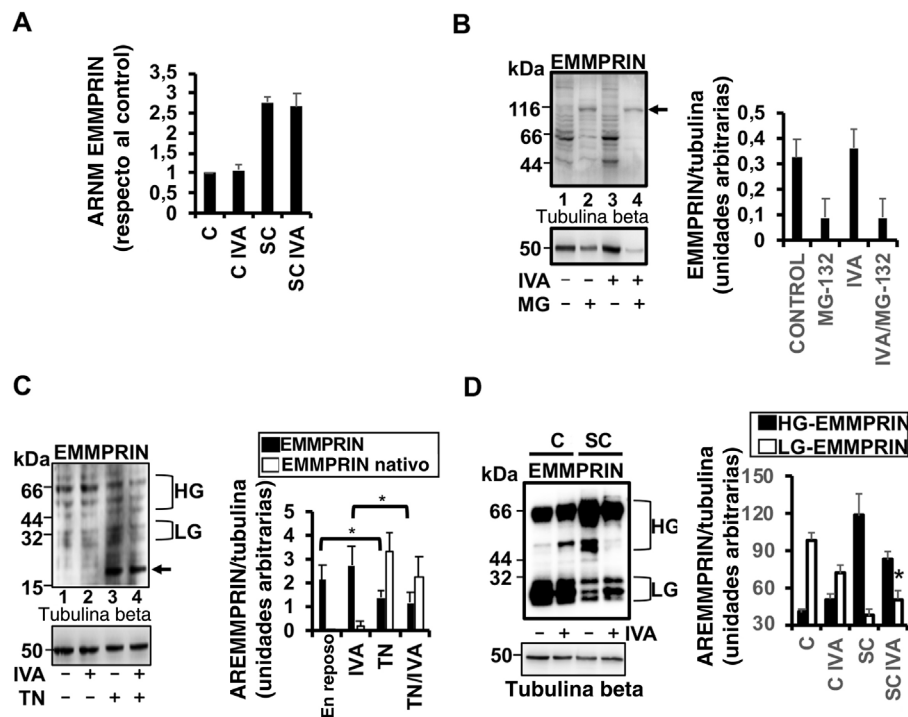


Figura 3. La ivabradina reduce la concentración de enzimas que degradan la matriz extracelular en el corazón. A: expresión por RT-PCR del ARNm de EMMPRIN en corazones de cerdos tratados con ivabradina 0,3 mg/kg. Se utilizó GAPDH como control ($n = 3$ por grupo; media $\pm$ desviación estándar). B: *immunoblot* de EMMPRIN en células cardíacas H9c2 incubadas con MG-132. C: *immunoblot* de EMMPRIN en células cardíacas H9c2 incubadas con tunicamicina; la flecha indica la localización de EMMPRIN no glucosilada nativa de bajo peso molecular de 20 kDa. D: expresión de EMMPRIN en áreas necróticas de corazones sometidos a SC e incubados con ivabradina ($n = 3$ por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *HG-EMMPRIN frente a LG-EMMPRIN con SC+ivabradina, $p < 0,05$). Se utilizó betatubulina como control (B-D). Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

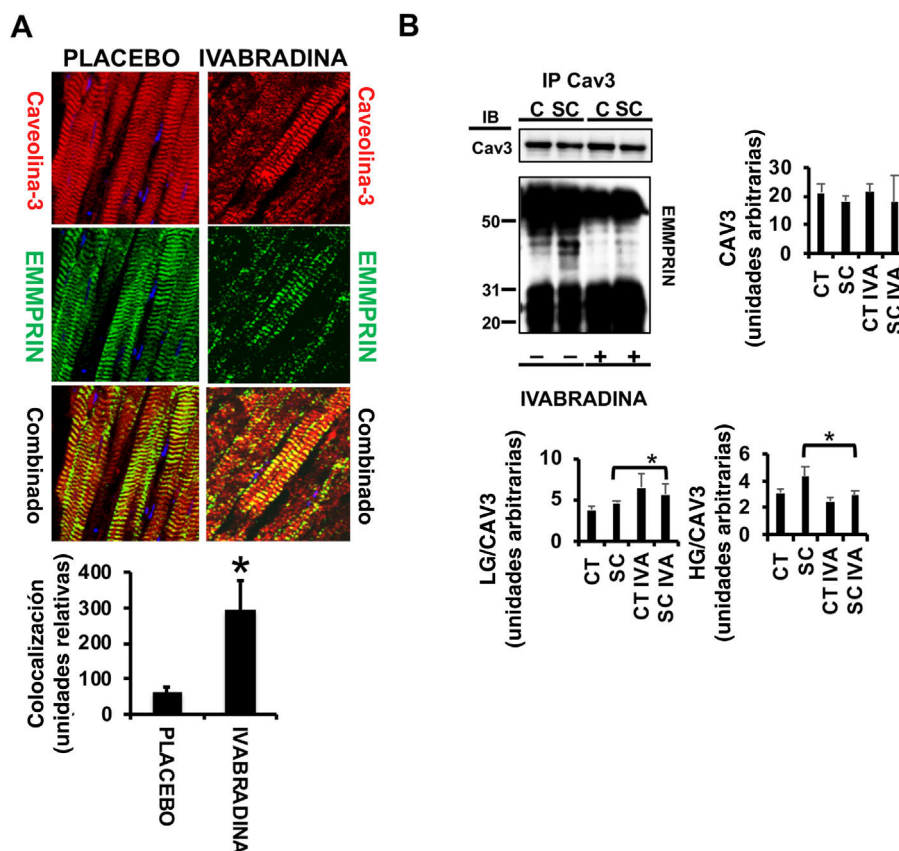


Figura 4. La ivabradina previene el desacoplamiento del complejo EMMPRIN/caveolina-3 en cerdos sometidos a *shock* cardiogénico. A: detección por microscopía confocal de caveolina-3 (Cy3, rojo) y EMMPRIN (FITC, verde) en secciones de corazón de cerdos tratados con ivabradina o placebo (colocalización en paneles combinados en amarillo) ($n = 3$ por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *ivabradina frente a placebo, $p < 0,002$). B: *immunoblot* de caveolina-3 y EMMPRIN en extractos inmunoprecipitados de caveolina-3 ($n = 3$ por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *SC frente a IVA SC, $p < 0,05$). Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

colocalización entre caveolina-3 y EMMPRIN en respuesta a ivabradina 0,3 mg/kg (figura 4A, panel combinado de ivabradina, amarillo); los análisis de coimmunoprecipitación revelaron un aumento de LG-EMMPRIN unido a caveolina-3 (figura 4B) en respuesta a ivabradina, lo que indica que la ivabradina puede reducir la degradación de la MEC inducida por SC al conservar el complejo caveolina-3/LG-EMMPRIN.

HCN4 forma parte del complejo caveolina-3/EMMPRIN de los cardiocitos

Además de EMMPRIN, la caveolina-3 también se une a HCN4¹⁵, diana principal de la ivabradina. La observación de caveolina-3 mediante microscopio confocal en secciones del ventrículo de corazones sanos permitió detectar un complejo proteico que incluye caveolina-3, EMMPRIN y HCN4 (figura 5A), aunque los más interesante es que se detectó que tras el SC, los complejos caveolina-3/EMMPRIN y caveolina-3/HCN4 aumentaron en presencia de ivabradina frente a placebo (figura 5B). Este resultado indica que la caveolina-3 puede ser un objetivo de la ivabradina en la cardioprotección, por una parte, al prevenir la degradación de la MEC mediante el aumento de la unión a EMMPRIN y, por la otra, al estabilizar el complejo con HCN4 y reducir la frecuencia cardíaca, como se ha observado anteriormente (figura 1). Además, por vez primera se ha desvelado el complejo proteico existente entre HCN4 y EMMPRIN y la capacidad de la ivabradina para su desacoplamiento.

Con el objetivo de demostrar si la caveolina-3 puede servir como punto de acoplamiento entre HCN4 y EMMPRIN, se silenció la expresión de caveolina-3 con ARN de interferencia (siRNA) específicos en células cardíacas H9c2, utilizando la concentración de 10 nM de siRNA por reducir la expresión de caveolina-3 en más del 75% frente a células no transfectadas o células transfectadas con una forma de siARN utilizada como control negativo (figura 6A). Se pudo confirmar que la HCN4 se unió a EMMPRIN tanto en células que expresan caveolina-3 como en células silenciadas, lo que indica que hay una interacción directa entre ambas proteínas (figura 6B), mientras que en presencia de ivabradina se produjo un desacoplamiento significativo, independientemente de la expresión de caveolina-3 (figura 6B). Asimismo, el silenciamiento de la caveolina-3 supuso la sobreexpresión de la MMP-9, que se inhibió en presencia de ivabradina (figura 6C), lo que indica que la ivabradina influye en la acción de la caveolina-3 preventiva de la degradación de la MEC.

De la misma manera, para investigar el papel de EMMPRIN en el complejo entre caveolina-3 y HCN4, se silenció la EMMPRIN mediante ARN de interferencia específicos (figura 7A), gracias a lo cual se pudo reducir las concentraciones del complejo HCN4/caveolina-3, detectado mediante inmunotransferencia de HCN4 en lisados celulares de H9c2 inmunoprecipitados con caveolina-3 (figura 7B, carril 3). Este resultado indica que se requiere EMMPRIN para mantener el complejo HCN4/caveolina-3 y que su interacción se restaura parcialmente mediante la incubación con ivabradina (figura 7B, carril 4), lo que señala que la unión entre caveolina-3 y HCN4 independiente de EMMPRIN se produce en respuesta a la ivabradina.

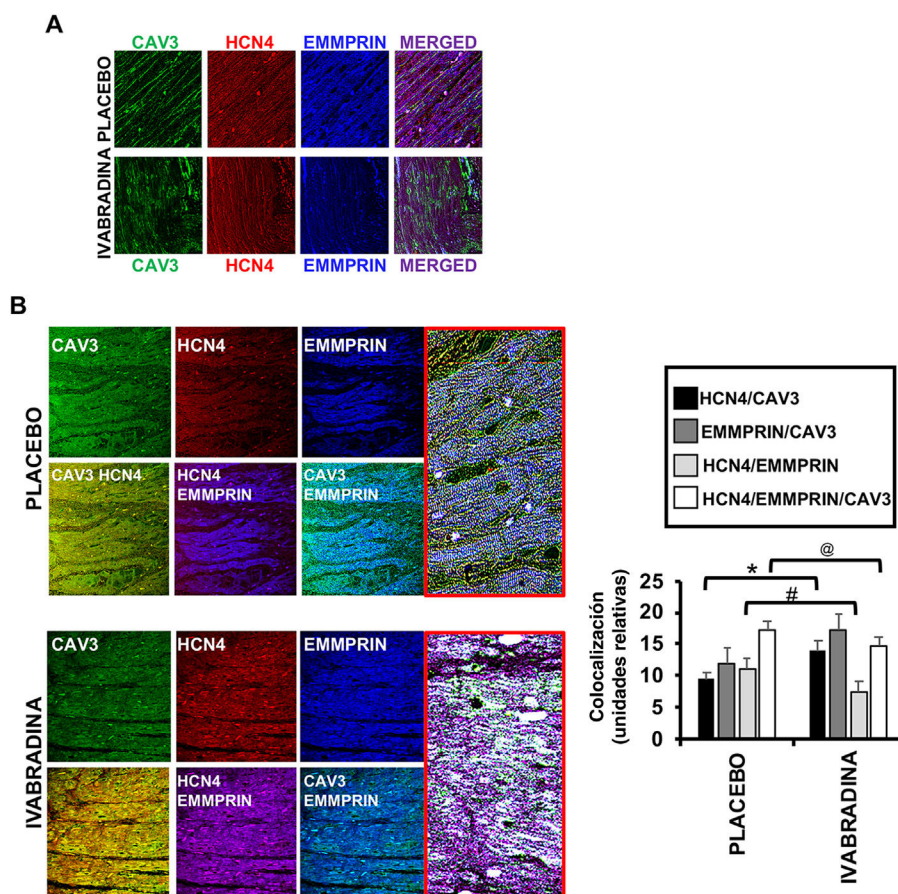


Figura 5. La ivabradina regula la unión de caveolina-3, HCN4 y EMMPRIN. A: detección por microscopia confocal de caveolina-3 (FITC [verde]), HCN4 (TRITC 561 [rojo]) y EMMPRIN (Alexa Fluor 350 [azul]) en secciones de corazón de cerdos sanos. B: a los 7 días del SC en cerdos tratados con ivabradina 0,3 mg/kg o placebo (n = 3 por grupo; media $\pm$ desviación estándar; *HCN4/CAV3 placebo frente a ivabradina, $p < 0,05$; #HCN4/EMMPRIN placebo frente a ivabradina, $p < 0,002$; @HCN4/EMMPRIN placebo frente a ivabradina, $p < 0,05$). FITC: isotiocianato de fluoresceína; TRITC: isotiocianato de tetrametilrodamina; SC: *shock* cardiogénico. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se ha observado que la ivabradina induce cardioprotección más allá de la corriente I(f). En condiciones de SC, la administración de ivabradina puede ayudar a prevenir la necrosis cardíaca al reducir las concentraciones de la enzima MMP-9 que degrada a MEC y de EMMPRIN, así como su glucosilación (necesaria para la degradación de la MEC inducida por MMP), mediante la estabilización del complejo caveolina-3/LG-EMMPRIN y la unión de HCN4, diana principal de la ivabradina, a LG-EMMPRIN. Asimismo se pudo comprobar que la ivabradina estabilizó el complejo HCN4/caveolina-3, lo que apunta a un efecto bradicárdico más allá de la corriente I(f). En conjunto, se propone un nuevo mecanismo molecular en que la administración de ivabradina promueve la cardioprotección frente al SC.

La lesión por isquemia/reperfusión induce la degradación de la MEC y la necrosis miocárdica mediante la expresión de MMP en las células cardíacas^{16–18}, al menos en parte a través de la activación de EMMPRIN¹³. La selección de EMMPRIN no solo reduce la expresión ventricular de MMP-9, sino que también previene con éxito la progresión de la necrosis, con lo cual mejora la FEVI tras la reperfusión¹⁹.

Se ha comprobado que la administración de ivabradina tras el SC mantiene la EMMPRIN unida a la caveolina-3 en un estado poco glucosilado, lo que explica el efecto de la ivabradina inhibitorio de la degradación de la MEC, ya que son las formas muy glucosiladas de EMMPRIN las que intervienen en la activación de las

metaloproteinasas, incluida la MMP-9^{13,14}. Todo ello indica que, además de la corriente I(f), y dado que la estimulación betaadrenérgica desencadena la expresión de EMMPRIN en los cardiomiocitos^{20,21}, la inhibición de EMMPRIN también puede tener efectos cardioprotectores al inhibir la estimulación betaadrenérgica de la frecuencia cardíaca en nuestro modelo de SC.

El efecto de la ivabradina en la expresión de las MMP ya se había hallado en ratones diabéticos²². En ese modelo, la ivabradina redujo la cantidad de MMP-2 y mejoró la función cardíaca por mecanismos aún desconocidos. En consonancia con esos hallazgos, nuestro trabajo ha descubierto un mecanismo cardioprotector con la ivabradina más allá de la corriente I(f) que implica una reducción *in vivo* de la cantidad de EMMPRIN y su glucosilación, necesaria para inducir la actividad de las MMP mediada por EMMPRIN.

Nuestros datos muestran que la EMMPRIN se induce en células cardíacas en condiciones de hipoxia, tal como sucede en células renales embrionarias humanas²³, de microglía²⁴ y en varios tipos de cultivos de células cancerosas^{25,26}. La hipoxia es un poderoso estímulo inductor de necrosis y apoptosis en varios tejidos, que en el caso de las células cardíacas responden activando varias rutas de señalización, como la estabilización de proteínas específicas inhibiendo la degradación mediada por ubiquitinación, como recientemente se detectó en el caso de la caveolina-3, lo que aclara su papel contra la lesión isquémica²⁷. Nuestro estudio ha demostrado que, en respuesta al SC, la ivabradina estabiliza el complejo caveolina-3/LG-EMMPRIN como mecanismo para evitar la degradación de la MEC dependiente de las MMP.

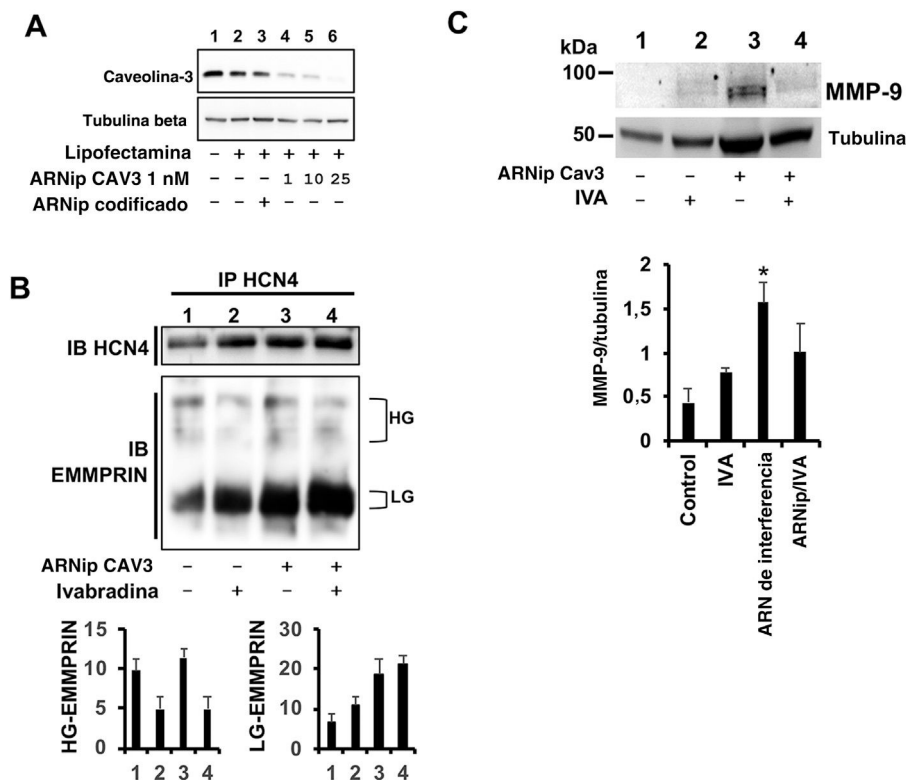


Figura 6. La falta de caveolina-3 altera la formación del complejo EMMPRIN/HCN4. A: *immunoblot* de caveolina-3 de células H9c2 transfectadas con lipofectamina (sin ARNip) o ARNip1 de caveolina-3 1, 10 y 25 nM. Se utilizó tubulina beta como control negativo. B: panel superior, *immunoblot* de HCN4 de extractos inmunoprecipitados con HCN4 de células H9c2 silenciadas con siARNi de caveolina-3 10 nM; panel inferior, *immunoblot* de EMMPRIN de los mismos extractos (n = 3). C: *immunoblot* de MMP-9 en células silenciadas con H9c2 incubadas con ivabradina 0,3 mg/kg (n = 3; media $\pm$ desviación estándar; *ARNip frente a ARNip + ivabradina, $p < 0,001$). MMP-9: metaloproteínasa de la matriz extracelular 9; siARN: ARN de interferencia. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

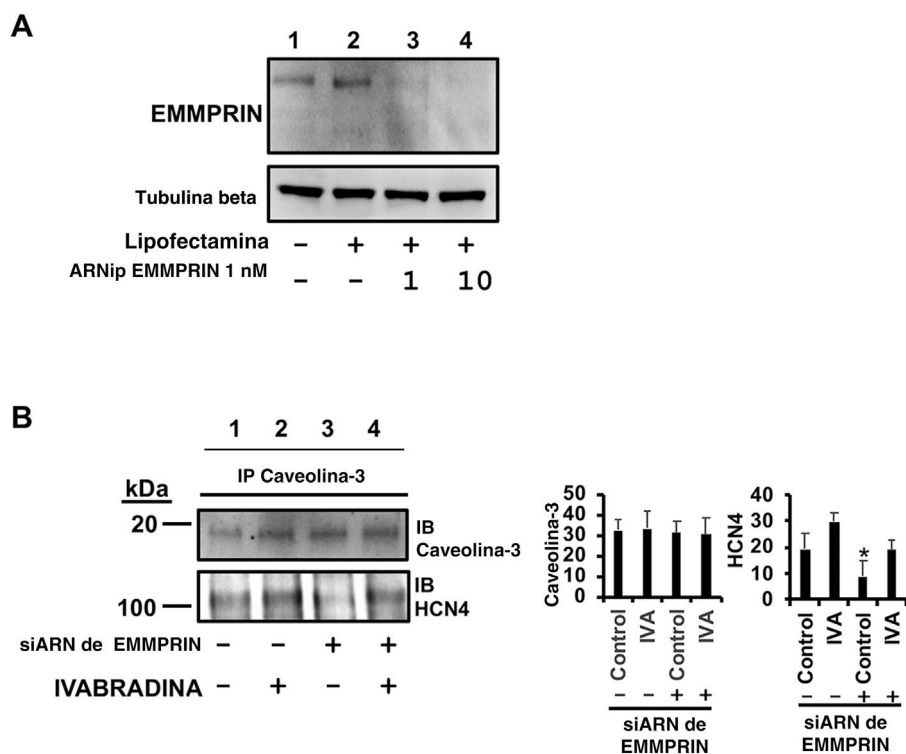


Figura 7. La falta de EMMPRIN altera la formación del complejo caveolina-3/HCN4. A: silenciamiento génico de EMMPRIN con siARN específico de EMMPRIN; Se empleó tubulina beta como control de carga. B: *immunoblot* de HCN4 de extractos inmunoprecipitados con anticaveolina-3 de células H9c2 silenciadas con siARN de EMMPRIN 10 nM (n = 3; media $\pm$ desviación estándar; *siARN de HCN4 frente a siARN + ivabradina, $p < 0,004$). siARN: ARN de interferencia. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

El empleo de la ivabradina se basa en su capacidad para inhibir la corriente I(f) dependiente de HCN4 en los cardiomiocitos mediante mecanismos hasta el momento aún por explorar. La caveolina-3 se une al HCN4 en las caveolas cardíacas, lo que le permite regular la actividad de marcapasos¹⁵, de modo que la desregulación del complejo caveolina-3/HCN4 se ha relacionado con varios tipos de comportamiento arritmogénico, como recientemente se ha evidenciado al detectar la expresión de la variante T78 M²⁸ de la caveolina-3 o en algunos fenotipos del síndrome de QT largo, mediante la aceleración de la cinética de activación de HCN4²⁹. En consonancia con la bibliografía, nuestros datos indican que la ivabradina induce cardioprotección y conserva la conductancia de la I(f) estabilizando el complejo caveolina-3/HCN4.

Hasta el momento, ningún estudio ha abordado la participación de EMMPRIN en el complejo caveolina-3/HCN4. Curiosamente, nuestros datos apuntan a una interacción directa entre HCN4 y EMMPRIN, en que la ivabradina participa en la desestabilización del complejo. La interacción entre HCN4 y EMMPRIN era desconocida hasta ahora, por lo que se necesitan más estudios para determinar si la unión es meramente circunstancial o si representa un nuevo objetivo en la necrosis. Por otro lado, no se puede excluir la posibilidad de que HCN4 y EMMPRIN se unan a socios comunes y no a través de una interacción directa. Tal es el caso de los receptores betaadrenérgicos, que se unen a HCN4³⁰ y EMMPRIN³¹, donde la estimulación betaadrenérgica activa la HCN4 y está relacionada con las acciones inflamatorias de EMMPRIN.

Limitaciones

Una de las limitaciones del estudio es haber empleado hembras, pues machos y hembras tienen diferentes fisiologías cardioprotectoras³², lo que puede comprometer el grado de lesión cardíaca e insuficiencia cardíaca relacionadas con el evento isquémico. El uso de cultivos de células H9c2 de rata también es una limitación, ya que el aislamiento de cardiomiocitos de cerdo sería el mejor enfoque experimental para probar los parámetros específicos abordados en este trabajo. Sin embargo, el aislamiento de cardiomiocitos porcinos entraña una complicación significativa, lo que llevó a utilizar células H9c2 y HL1B para evaluar la hipoxia y la reoxigenación.

CONCLUSIONES

La ivabradina induce cardioprotección más allá de la inhibición directa de la corriente I(f). Durante el SC, la ivabradina estabiliza el complejo HCN4/caveolina-3 y previene la necrosis cardíaca al mantener la EMMPRIN en su forma poco glucosilada. La ivabradina también estabiliza el complejo caveolina-3/HCN4, notificado ya como un mecanismo para regular la corriente I(f). Estudios adicionales estarán encaminados a explorar el papel molecular de la ivabradina en la dimerización de EMMPRIN y HCN4 como una nueva herramienta terapéutica.

FINANCIACIÓN

Este trabajo contó con el apoyo de la Universidad Francisco de Vitoria (número de subvención 2017/18), Fundación BBVA (2017) y Proyectos de I+D+i, del programa Investigación orientada a los retos de la sociedad (MINECO/AEI/FEDER/UE [SAF2017-87342-R] a CZ).

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- La ivabradina, un inhibidor selectivo de la corriente de marcapasos I(f) en las células sinoauriculares, inhibe los canales HCN1 y HCN4, reduce la frecuencia cardíaca y conserva la presión arterial y la función del ventrículo izquierdo, por lo que se recomienda para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica y la FEVI < 35%; sin embargo, no está clara su eficacia en la insuficiencia cardíaca aguda.
- El *shock* cardiogénico es una causa frecuente de muerte después de un infarto agudo de miocardio.
- Los fármacos vasoactivos pueden contribuir a la lesión miocárdica mediante una taquicardia extensa y un aumento del estrés oxidativo y la demanda de oxígeno.
- Ya se había hallado previamente que la ivabradina mejora la taquicardia sinusal inducida por catecolaminas en condiciones de *shock* cardiogénico y mejora los parámetros hemodinámicos mediante mecanismos desconocidos.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- La ivabradina inhibe la corriente I(f) dependiente de HCN mediante mecanismos que todavía no se han evaluado; la caveolina-3 se une a HCN4 en los cardiomiocitos para regular la actividad de marcapasos.
- Nuestros datos indican que la ivabradina ejerce efectos cardioprotectores al conservar la conductancia de la I(f) estabilizando el complejo caveolina-3/HCN4.
- La caveolina-3 induce cardioprotección al formar un complejo con LG-EMMPRIN, lo que proporciona un nuevo mecanismo molecular de cardioprotección que implica impedir la degradación de la MEC en el corazón.
- Se necesita más investigación para estudiar los hallazgos relacionados con el complejo HCN4/EMMPRIN durante el SC.

ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recresp.2020.09.018>

BIBLIOGRAFÍA

1. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:891–975.
2. Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D, Schulz R. Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J.* 2008;29:2265–2275.
3. Chaudhary R, Garg J, Krishnamoorthy P, et al. Ivabradine: heart Failure and beyond. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016;21:335–343.

4. Pascual Izco M, Castejón B, Piedras MJ, Zamorano JL, Sanmartín M, Zaragoza C. Effects of ivabradine on heart rate and hemodynamic parameters in a swine model of cardiogenic shock. *Rev Esp Cardiol.* 2017;70:1139–1141.
5. Xiang X, Zhou Y, Sun H, et al. Ivabradine abrogates TNF- α -induced degradation of articular cartilage matrix. *Int Immunopharmacol.* 2019;66:347–353.
6. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, et al. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H2081–H2092.
7. Li-Sha G, Li L, De-Pu Z, et al. Ivabradine treatment reduces cardiomyocyte apoptosis in a murine model of chronic viral myocarditis. *Front Pharmacol.* 2018;9:182.
8. Yu Y, Hu Z, Li B, Wang Z, Chen S. Ivabradine improved left ventricular function and pressure overload-induced cardiomyocyte apoptosis in a transverse aortic constriction mouse model. *Mol Cell Biochem.* 2019;450:25–34.
9. Sabbah HN, Gupta RC, Kohli S, Wang M, Zhang K, Rastogi S. Heart rate reduction with ivabradine improves left ventricular function and reverses multiple pathological maladaptations in dogs with chronic heart failure. *ESC Heart Fail.* 2014;1:94–102.
10. Becher PM, Lindner D, Miteva K, et al. Role of heart rate reduction in the prevention of experimental heart failure: comparison between If-channel blockade and β -receptor blockade. *Hypertension.* 2012;59:949–957.
11. Zuo G, Ren X, Qian X, et al. Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol.* 2019;234:1925–1936.
12. Rossello X, Rodriguez-Sinovas A, Vilahur G, et al. CIBER-CLAP (CIBERCV Cardio-protection Large Animal Platform): a multicenter preclinical network for testing reproducibility in cardiovascular interventions. *Sci Rep.* 2019;9:20290.
13. Cuadrado I, Castejon B, Martin AM, et al. Nitric oxide induces cardiac protection by preventing extracellular matrix degradation through the complex caveolin-3/EMMPRIN in cardiac myocytes. *PLoS One.* 2016;11:e0162912.
14. Tarin C, Lavin B, Gomez M, Saura S, Diez-Juan A, Zaragoza C. The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:387–395.
15. Ye B, Balijepalli RC, Foell JD, et al. Caveolin-3 associates with and affects the function of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4. *Biochemistry.* 2008;47:12312–12318.
16. Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2006;113:834–841.
17. Nie R, Xie S, Du B, Liu X, Deng B, Wang J. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is increased in human left ventricle after acute myocardial infarction. *Arch Med Res.* 2009;40:605–611.
18. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87:1285–1342.
19. Cuadrado I, Piedras MJGM, Herruzo I, et al. EMMPRIN-targeted magnetic nanoparticles for in vivo visualization and regression of acute myocardial infarction. *Theranostics.* 2016;6:545–557.
20. Reddy VS, Prabhu SD, Mummidi S, et al. Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H1242–H1254.
21. Murray DR, Mummidi S, Valente AJ, et al. β 2 adrenergic activation induces the expression of IL-18 binding protein, a potent inhibitor of isoproterenol induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro and myocardial hypertrophy in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:206–218.
22. Chen SL, Hu ZY, Zuo GF, Li MH, Li B. I(f) current channel inhibitor (ivabradine) deserves cardioprotective effect via down-regulating the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and attenuating apoptosis in diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:150.
23. Xie J, Li X, Zhou Y, et al. Resveratrol abrogates hypoxia-induced up-regulation of exosomal amyloid- β partially by inhibiting CD147. *Neurochem Res.* 2019;44:1113–1126.
24. Yin J, Xu WQ, Ye MX, et al. Up-regulated basigin-2 in microglia induced by hypoxia promotes retinal angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2017;21:3467–3480.
25. Zeng W, Su J, Wu L, et al. CD147 promotes melanoma progression through hypoxia-induced MMP2 activation. *Curr Mol Med.* 2014;14:163–173.
26. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:16663–16668.
27. Zhou Q, Peng X, Liu X, et al. FAT10 attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis by stabilizing caveolin-3. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;116:115–124.
28. Campostriani G, Bonzanni M, Lissoni A, et al. The expression of the rare caveolin-3 variant T78 M alters cardiac ion channels function and membrane excitability. *Cardiovasc Res.* 2017;113:1256–1265.
29. Motloch LJ, Larbig R, Darabi T, et al. Long-QT syndrome-associated caveolin-3 mutations differentially regulate the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 4. *Physiol Int.* 2017;104:130–138.
30. Greene D, Kang S, Kosenko A, Hoshi N. Adrenergic regulation of HCN4 channel requires protein association with β 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2012;287:23690–23697.
31. Maïssa N, Covarelli V, Janel S, et al. Strength of Neisseria meningitidis binding to endothelial cells requires highly-ordered CD147/ β 2-adrenoceptor clusters assembled by alpha-actinin-4. *Nat Commun.* 2017;8:15764.
32. Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature.* 2014;509:282–283.