

2010 Diciembre, 2(2): 1-1

## EL SILENCIAMIENTO DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE1) EN MITOCONDRIAS CARDÍACAS PREVIENE LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN MITOCONDRIAL

Villa-Abrille MC, Cingolani E, Cingolani HE, Álvarez BV

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas de La Plata – UNLP*

e-mail: [mcvillaabrille@med.unlp.edu.ar](mailto:mcvillaabrille@med.unlp.edu.ar)

### Introducción

Hasta el momento han sido descritas diez isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1-NHE10), las cuales difieren en sus estructuras, distribución, localización, y sensibilidad ante diferentes estímulos. La inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) reduce los daños producido por isquemia/reperfusión (I/R), hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Si bien entre los mecanismos que subyacen al efecto protector mediado por bloqueo del NHE1 involucran el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial, el enlentecimiento de la apertura del poro de transición mitocondrial (PTM), y la reducción de la producción de ión superóxido por la mitocondria, la posibilidad de que estos efectos protectores sean mediados por el NHE presente en la mitocondria no ha sido estudiada con detalle.

### Objetivo

Caracterizar la expresión y función del NHE mitocondrial mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular. Estudiar el efecto de la inhibición de la expresión del NHE mitocondrial y el bloqueo del NHE1 mitocondrial sobre la apertura del PTM y el hinchamiento mitocondrial, índices del daño mitocondrial.

### Materiales y métodos

La expresión del NHE1 fue estudiada en mitocondrias no-energizadas, aisladas de ventrículo izquierdo de corazones de rata. Utilizando anticuerpos específicos de la isoforma 1 del NHE, se pudo detectar al NHE1 en mitocondrias (NHE1m) mediante inmunoprecipitación seguida de análisis por inmunoblots (Western Blot, WB). La expresión del NHE1m fue confirmada por microscopía electrónica, mediante la técnica de inmunogold. La localización de las partículas de oro, mostraron la asociación del NHE1m con la membrana interna de la mitocondria. Finalmente, mediante inmunocitoquímica combinada con microscopía confocal en miocitos aislados de corazón de rata, se pudo demostrar la localización del NHE1 en discos intercalares y túbulos T; y co-localización del NHE1m con la proteína citocromo C oxidasa del Complejo 1 (COX1), un marcador específico de mitocondrias.

Para estudiar la expresión y función del NHE1m en mitocondrias cardíacas, un RNAi capaz de reducir la expresión del NHE1m (shNHE1) fue incorporado en lentivirus e inyectado en el miocardio de ratas. Como controles se inyectaron ratas con una secuencia desordenada (shSCR).

### Resultados

La transducción del shNHE1 redujo la expresión (WB) del NHE1 en lisados mitocondriales en un 60%, comparado con shSCR (n=4,  $P < 0.05$ ) al cabo de 2 semanas, confirmando la expresión del NHE1m. El rol funcional del NHE1m se examinó en suspensiones mitocondriales expuestas a concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  para inducir la apertura del PTM y el consecuente hinchamiento mitocondrial (HM). La transducción de shNHE1 en mitocondrias cardíacas redujo el HM inducido por  $\text{CaCl}_2$  en un  $64 \pm 4\%$  (n=7), mientras que HOE642 (10  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor de NHE1, redujo el HM en ratas tratadas con shSCR ( $37 \pm 6\%$ , n=4) sin tener efectos adicionales en ratas tratadas con shNHE1 (n=3).

### Conclusiones

Hemos caracterizado la expresión y función de una proteína típica de sarcolema, el NHE1, en mitocondrias cardíacas. Debido a que los animales tratados con shNHE1 presentan un umbral más elevado para la formación del PTM, los efectos beneficiosos de la inhibición del NHE1m en I/R y otras patologías cardíacas, podrían ser considerados.