

LA PROTEIN-QUINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK) PROMUEVE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) DURANTE EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO (EH): IMPACTO DEL NO SOBRE LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL.

Jl Burgos, M Morell, LA Gonano, M Vila Petroff

Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio E Cingolani CONICET-UNLP

juanignacioburgos@gmail.com

Introducción

Las células cardíacas normalmente no están sometidas a estrés osmótico pero en ciertas situaciones patológicas como estados de deshidratación severa, hiperglucemia, hiperlipidemia y diabetes, los cardiomiocitos sufren estrés hiperosmótico. La alteración del volumen celular inducido por el estrés osmótico tiene serias consecuencias sobre la función cardíaca. Entre ellas, disfunción contráctil, remodelamiento histológico y eléctrico, mayor tamaño de infarto y elevada incidencia de arritmias. Sin embargo, los mecanismos subcelulares involucrados en las alteraciones de la función cardíaca inducidos por estrés osmótico no han sido completamente dilucidados.

El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización altamente reactiva y a nivel cardíaco modula la contractilidad, la relajación, la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, el fenómeno de la escalera, la actividad del canal de rianodina y la respuesta de agonistas β -adrenérgicos.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio (Gonano LA, Morell M et al. *Cardiovasc Res* 2014) demostramos que el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO y que éste es capaz de reducir el efecto inotrópico negativo (EIN) asociado a este tipo de estrés. Sin embargo, si durante el estrés hiperosmótico también se libera NO, y si éste tiene algún impacto en la contractilidad, no ha sido estudiado hasta el momento.

Objetivos

Evaluar si el estrés hiperosmótico se asocia con un aumento en la producción de NO y determinar los mecanismos subyacentes. Así mismo, identificar si el NO tiene algún impacto en el EIN observado durante este tipo de estrés.

Materiales y métodos

Miocitos cardíacos de ratas Wistar se aislaron mediante digestión enzimática. El EH se logró perfundiendo los miocitos durante 5 min con una solución isosmótica (SI: 309 mOsm/L) y luego 20 min con una solución hiperosmótica (SH: 440 mOsm/L).

La producción de NO se evaluó en miocitos cargados con el indicador DAF-FM (sensor de NO) en presencia y ausencia de inhibidores. En paralelo, se tomaron imágenes de campo claro donde se midió el cambio en el volumen celular.

El acortamiento celular se midió mediante un sistema de detección de bordes en presencia y ausencia de inhibidores.

Se estudió el nivel de fosforilación de p-eNOS y p-nNOS a partir de anticuerpos específicos para los sitios fosforilables de estas proteínas.

Resultados

La perfusión de miocitos de ratas con SH provoca la disminución del volumen celular y el aumento de la fluorescencia de DAF-FM comparado con miocitos perfundidos con SI. Cuando se exponen las células a SH suplementada con L-NAME (inhibidor de las NOS), con Nitroguanidina (NG: inhibidor de la nNOS) y con Wortmanina (WT: inhibidor de la eNOS) sufren una reducción en su volumen en ausencia de liberación de NO, sugiriendo que el EH activa a la nNOS y a la eNOS, que resulta en un aumento de la producción de NO. Consistentemente, mediante análisis de Western blots, observamos que la perfusión de corazones enteros con SH promueve la fosforilación de eNOS y nNOS, comparado con corazones perfundidos con SI.

Teniendo en cuenta que la protein-quinasa dependiente de AMP (AMPK) puede ser activada por deformación de la membrana en el músculo cardíaco y que puede fosforilar a nNOS y a eNOS, examinamos si esta quinasa media la activación de las NOS inducida por EH. Dado que la exposición de los miocitos a SH en presencia de Dorsomorfina (inhibidor de AMPK) previno el aumento de NO, sugiere que esta quinasa sería la responsable de la activación de las isoformas de la NOS durante el EH.

En experimentos donde evaluamos el acortamiento celular observamos que el EH se asocia con un EIN. Por su parte, el EIN se exagera en presencia de L-NAME, AMPK, ODQ (inhibidor de Guanilato Ciclasa) y KT5823 (inhibidor de PKG), sugiriendo que el NO estaría generando el soporte contráctil vía GMPc/PKG.

Conclusiones

En conjunto los resultados indican que durante el estrés hiperosmótico la deformación del sarcolema activa a AMPK, que a su vez fosforila a nNOS y eNOS con la consecuente producción de NO. Este último genera soporte contráctil durante el EH a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente. Estos resultados sugieren que la disfunción contráctil que ocurre durante el estrés hiperosmótico podría estar exacerbada en patologías asociadas con una baja disponibilidad de NO, como por ejemplo en Hipertensión Arterial.