



# OXIDACIONES DEL RECEPTOR DE RIANODINA EN EL MODELO DE CORAZÓN ATONTADO

Román B.<sup>1</sup>, Schinella G.<sup>2</sup>, Becerra R.<sup>1</sup>, Said M.<sup>1</sup>, Mundiña-Weilenmann C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-CONICET La Plata. Cátedra de Fisiología y Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.  
<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, CIC-PBA.

## INTRODUCCIÓN

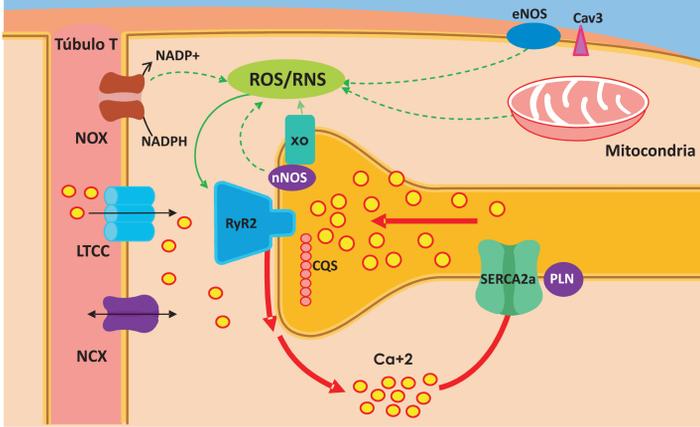


Figura 1. Esquema representativo de las principales fuentes de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RSN) en el miocito cardíaco: NADPH oxidasa (NOX), óxido nítrico sintasa (NOS), xantina oxidasa (XO) y la mitocondria.

Cuando el corazón es sometido a un breve período de isquemia seguido de perfusión (I/R) el restablecimiento del flujo sanguíneo provoca una sobrecarga de  $Ca^{2+}$  y un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) (Fig. 1) que conducen a daños que van desde una disminución transitoria de la contractilidad (atontamiento), hasta la aparición de arritmias e incluso muerte celular (1). Estos trastornos aparecen asociados a alteraciones postraduccionales (como fosforilación y oxidación) de proteínas que manejan el  $Ca^{2+}$  intracelular (2). Nosotros demostramos que el aumento de la fosforilación del canal liberador de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplasmático o receptor de rianodina (RyR2) es un factor proaritmogénico (3). Además el RyR2, es altamente sensible a los cambios redox, debido a la gran cantidad de grupos sulfhidrilos (SH) que posee (Fig. 2). Estas oxidaciones pueden ser reversibles (como la S-Glutationilación, S-Nitrosilación) o irreversibles y poco se conoce sobre los efectos que estos cambios pueden tener sobre la actividad del canal y la generación de arritmias de reperfusion (posdespolarizaciones tardías).

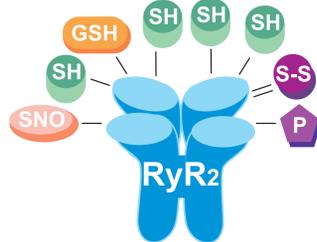


Figura 2. Cambios postraduccionales que pueden ocurrir sobre el RyR2: fosforilación (P), S-Glutationilación (GSH), S-Nitrosilación (SNO) y formación de puentes disulfuros (S-S).

## OBJETIVO

Nuestro objetivo fue estudiar las oxidaciones del RyR2 que ocurren durante la reperfusion y su relación con la aparición de arritmias.

## MÉTODOS

Corazones de ratas Wistar aislados y perfundidos por la técnica de Langendorff se sometieron a I/R (20min/30min), en presencia y ausencia de: L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) Apocinina (APO, inhibidor de la NADPH oxidasa) MPG (atrapador de ROS).

Durante el protocolo se evaluaron parámetros mecánicos (presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, LVDP) y eléctricos (potenciales monofásicos epicárdicos, MAPs). Luego de 1 minuto de reperfusion, como indica la flecha, los corazones fueron congelados en  $N_2$  líquido para realizar los ensayos bioquímicos determinándose cambios redox del RyR2 por inmunodetección y cantidad de glutatión reducido (GSH) en homogenatos de tejido ventricular.

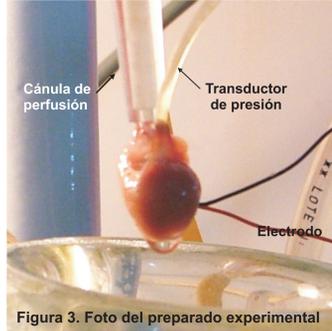


Figura 3. Foto del preparado experimental

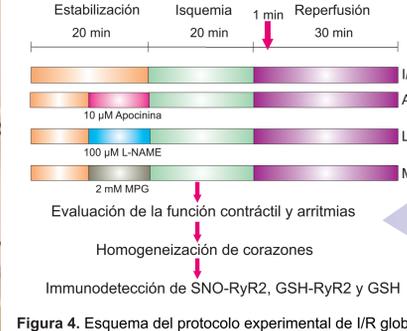
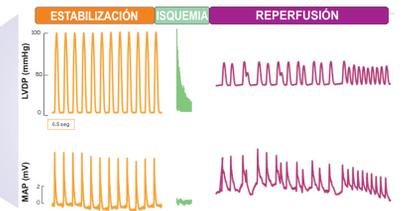


Figura 4. Esquema del protocolo experimental de I/R global

Figura 5. Registro representativo obtenido durante el protocolo de I/R a través del cual se evalúan los parámetros mecánicos y eléctricos simultáneamente, y se observan las arritmias típicas.



## RESULTADOS

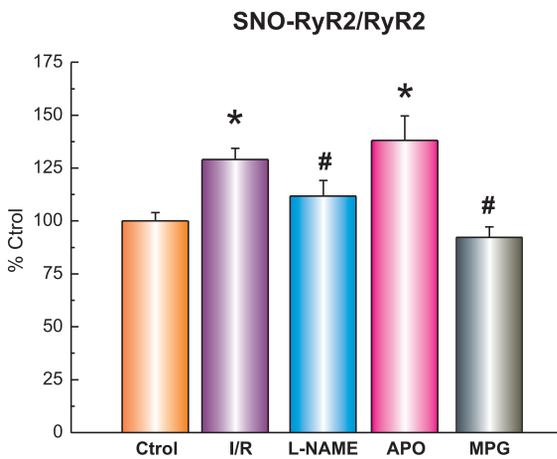


Figura 6. Resultados totales de la S-Nitrosilación (SNO-RyR2/RyR2) en Control y luego de 1 minuto de reperfusion en ausencia (I/R) y presencia de L-NAME, APO y MPG. Al minuto de reperfusion se detectó un aumento de la S-Nitrosilación del RyR2. La presencia de L-NAME y MPG disminuyeron la S-Nitrosilación, mientras que la perfusion con APO no tuvo ningún efecto con respecto a I/R. \* p< 0.05 vs. Control y # p<0.05 vs. IR. n=5-9 por intervención.

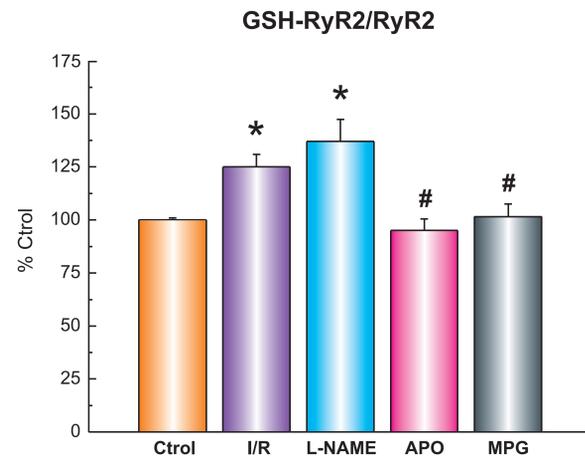


Figura 7. Resultados totales de la S-Glutationilación del RyR2 (GSH-RyR2/RyR2), en Control y luego de 1 minuto de reperfusion en ausencia (I/R) y presencia de L-NAME, APO y MPG. Al minuto de reperfusion se detectó un aumento de la S-Glutationilación del RyR2. La perfusion con APO y MPG disminuyeron la S-Glutationilación significativamente, mientras que con L-NAME los niveles permanecieron sin cambios respecto I/R. \* p< 0.05 vs. Control y # p<0.05 vs. IR. n=5-9 por intervención.

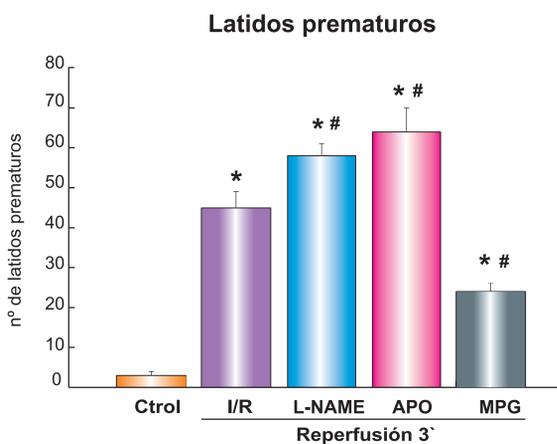


Figura 8. Número de arritmias contadas como latidos prematuros (LP) observados en Control y luego de 3 minutos de reperfusion en ausencia y en presencia de L-NAME, APO y MPG. Se detectó un aumento de LP durante la I/R, que fue aún mayor en los corazones tratados con L-NAME y APO, mientras que el tratamiento con MPG lo disminuyó. \* p< 0.05 vs. Control y # p< 0.05 vs. reperfusion en ausencia de los inhibidores. n=5-7 por intervención.

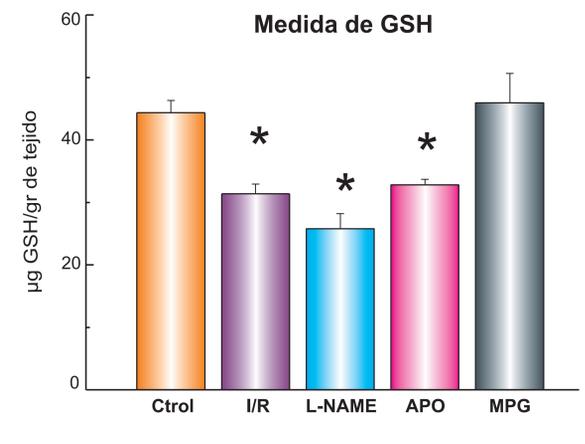
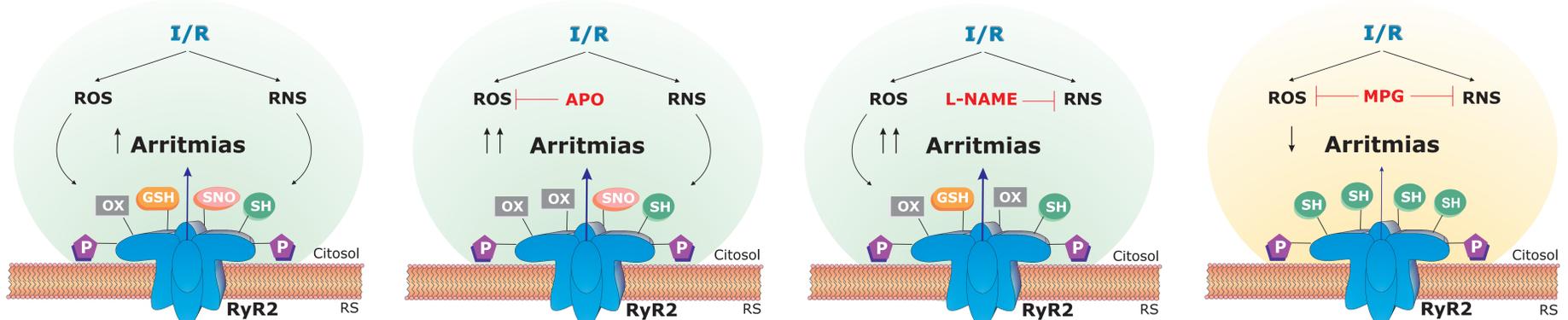


Figura 9. Cantidad de GSH libre expresado en µg/gr de tejido. El contenido de GSH libre disminuyó en los corazones sometidos a I/R. Mientras que el tratamiento con APO y L-NAME no modificó los valores obtenidos en I/R, la perfusion con MPG impidió esa caída. \* p< 0.05 vs. pre-isquemia y # p< 0.05 vs. reperfusion en ausencia de los inhibidores n=3-6 por intervención.

## CONCLUSIÓN

Los resultados muestran que la remoción de las oxidaciones reversibles al inicio de la reperfusion acentúa la generación de arritmias sólo en un entorno pro-oxidante (APO y L-NAME). Estos hallazgos sugieren que la S-Glutationilación y S-Nitrosilación del RyR2 surgen como un mecanismo que protege a la proteína de cambios oxidativos irreversibles que conducen a la arritmogénesis. El tratamiento con MPG, que evita el aumento de la producción de ROS/RNS en la I/R, limita las oxidaciones del RyR2 y las arritmias de reperfusion.



## REFERENCIAS

1. Bolli R. et al. *Physiol Rev.* 1999;79:609-34.
2. Fauconnier J. et al. *Pharmacol Ther.* 2013;138(3):323-32.
3. Said M. et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:936-44.