



LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE Ca^{2+} Y CALMODULINA SOSTIENE EL EFECTO INOTRÓPICO POSITIVO DE LA ESTIMULACIÓN β -ADRENÉRGICA PROLONGADA

Quiroga D.; Said M.; Vittone L.; Mundiña-Weilenmann C.



Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-CONICET La Plata. Cátedra de Fisiología y Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso simpático es un regulador fundamental de la función cardíaca. La unión de catecolaminas a receptores β -adrenérgicos (β -AR) produce un drástico aumento en la frecuencia, contractilidad y relajación miocárdicas. Durante mucho tiempo se consideró que estos efectos se debían exclusivamente a la activación de la proteína quinasa A (PKA) mediada por AMPc. A partir de la década del '80, varios laboratorios sugirieron la participación de la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) en la vía de señalización β -adrenérgica (1) debido a su activación como consecuencia del aumento del Ca^{2+} intracelular producido por PKA. La CaMKII, como la PKA, promueve la fosforilación de varias proteínas que regulan el manejo del Ca^{2+} intracelular como los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCC), el receptor de rianodina (RyR2) y la fosfolamban (PLN). En particular, la fosforilación dependiente de CaMKII de PLN (sitio Thr17) puede, a través de la activación de la bomba de Ca^{2+} (SERCA2a) del retículo sarcoplásmico (RS), contribuir al incremento del contenido de Ca^{2+} del RS y en consecuencia al aumento del transitorio de Ca^{2+} y la contractilidad miocárdica (efecto inotrópico positivo) (2). Si bien la participación de CaMKII en situaciones patológicas con tono simpático aumentado como la insuficiencia cardíaca es reconocida, el rol que desempeña esta vía en la respuesta β -adrenérgica en condiciones fisiológicas es cuestionado (3). (Figura 1)

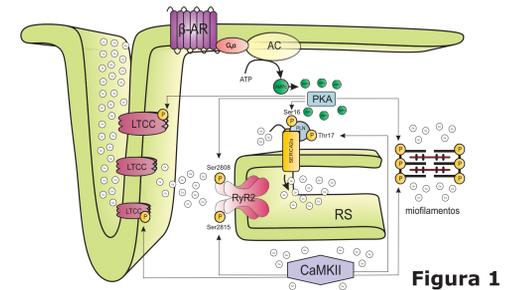


Figura 1

MÉTODOS

Se aislaron miocitos de rata (Figura 2) y se cargaron con un indicador fluorescente de Ca^{2+} . Los miocitos se trataron durante distintos tiempos en ausencia y presencia de una concentración submáxima del agonista β -adrenérgico, isoproterenol (ISO, 10 nM), con y sin el agregado de un inhibidor de CaMKII, KN-93 (3 μ M) o de su análogo inactivo KN-92 (5 μ M). Se midieron el acortamiento sarcomérico (expresado como % longitud en reposo) y la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (expresado como relación de fluorescencia 380/340). Los corazones aislados (Figura 3) se perfundieron por la técnica de Langendorff y se trataron con 3 nM ISO en presencia y ausencia de KN-93. Se midió la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PVI) y la velocidad máxima de desarrollo de presión (+dP/dt, expresada como % del control). En homogenatos de tejido ventricular obtenidos de estos corazones se inmunodetectó la fosforilación de PLN en el sitio Thr17, sustrato específico de CaMKII, y en el sitio Ser16, sustrato específico de PKA.

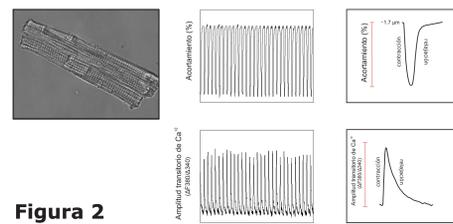


Figura 2

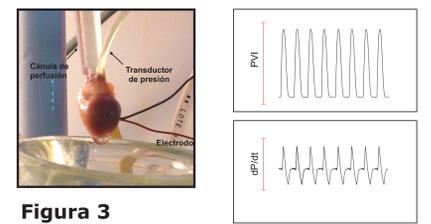


Figura 3

RESULTADOS

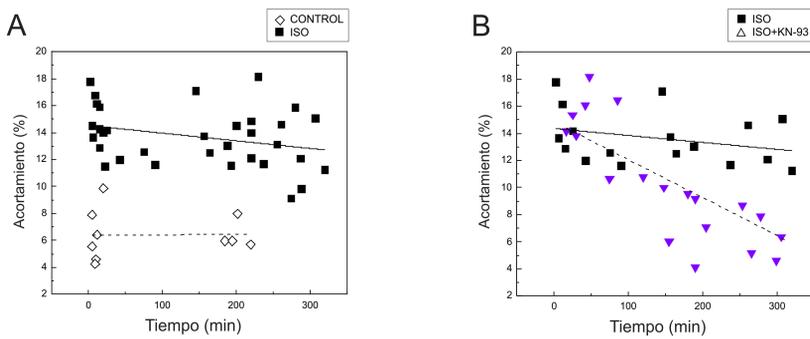


Figura 4. Curso en el tiempo del acortamiento sarcomérico de miocitos tratados en ausencia (CONTROL) y presencia de 10 nM ISO (ISO) (A) o de 10 nM ISO en ausencia (ISO) y presencia de 3 μ M KN-93 (ISO+KN-93) (B). La contractilidad de miocitos que no recibieron ningún tratamiento, así como el efecto inotrópico del ISO se conservaron invariables hasta 5 hs (A). La inhibición de CaMKII produjo una disminución progresiva del aumento de contractilidad del ISO que se hizo significativa a partir de los 200 min (B). Consideramos este tiempo como representativo de una "respuesta tardía", y seleccionamos las determinaciones realizadas alrededor de los 20 min como representativas de un "respuesta temprana". Cada punto representa el acortamiento de un miocito. Los miocitos se obtuvieron de 3 corazones.

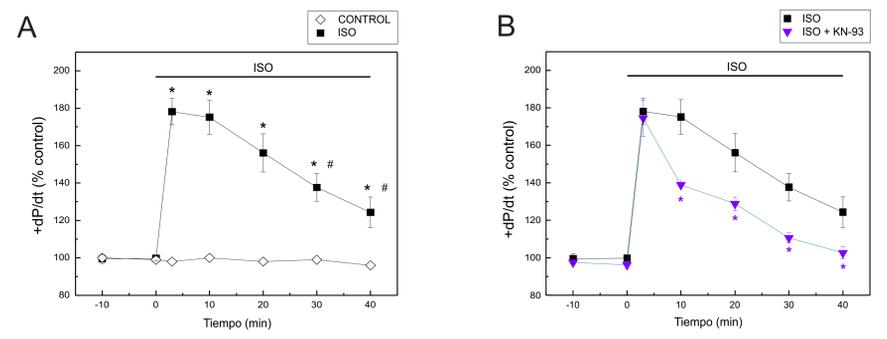


Figura 6. Resultados totales de +dP/dt en corazón perfundido en ausencia (CONTROL) y presencia de 3 nM ISO (A) o en presencia de 3 nM ISO con o sin KN-93 (B). El aumento de contractilidad inducido por ISO fue máximo a los 3-10 min y comenzó a decaer hacia los 20 min, disminución que se hizo significativa respecto al máximo, a partir de los 30 min en presencia de la droga. Estos resultados indicarían que en el corazón entero el proceso de desensibilización de los receptores β aparece antes que en el miocito aislado. También es más temprana la contribución de CaMKII a la contractilidad que resulta significativa a partir de los 10 min de tratamiento con ISO y se mantiene constante. Consideramos este tiempo como representativo de una "respuesta tardía", y seleccionamos las determinaciones realizadas alrededor de los 3 min como representativas de un "respuesta temprana". n=3-8. *p<0.05 vs control, #p<0,05 vs. 3 nM ISO 3 min.

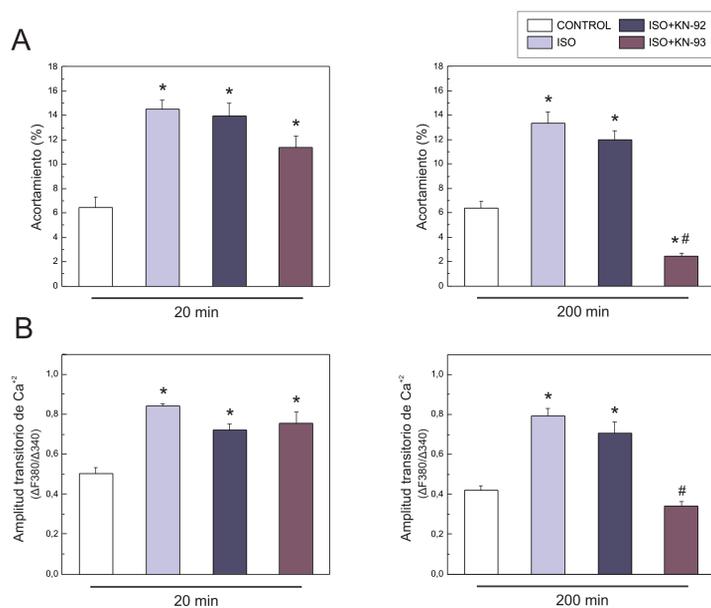


Figura 5. Amplitud del transitorio de Ca^{2+} (A) y acortamiento sarcomérico (B) de miocitos luego de 20 y 200 minutos de tratamiento sin drogas (CONTROL), con 10 nM ISO (ISO), con 10 nM ISO con el agregado de 5 μ M KN-92, análogo inactivo del KN-93 (ISO+KN-92) y con 10 nM ISO con el agregado de 3 μ M KN-93, inhibidor de la CaMKII (ISO+KN-93). A los 20 min, el efecto inotrópico positivo del ISO no se vio afectado por la presencia de KN-92 ni por el KN-93. Sin embargo a los 200 min, los aumentos del acortamiento y el transitorio de Ca^{2+} inducidos por ISO, que no se modificaron por la presencia del análogo inactivo, se anularon con el inhibidor específico de la CaMKII. Los resultados muestran que ya a los 200 min de tratamiento con ISO, la CaMKII participa en el sostenimiento de la respuesta contráctil al agonista β . n= 5-7 miocitos de 4 corazones distintos. *p<0.05 vs CONTROL. #p<0.05 vs ISO.

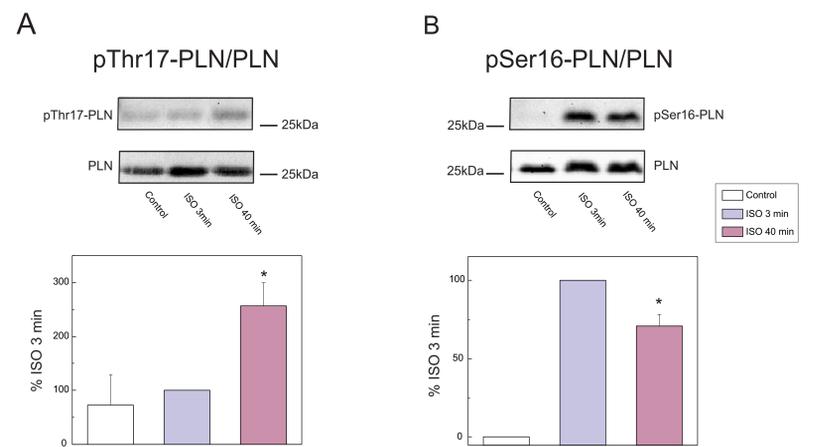


Figura 7. Inmunoblot representativo y resultados totales de la fosforilación de PLN en Thr17 (A) y en Ser16 (B). Los resultados muestran que durante la respuesta temprana al agente β -adrenérgico (3 min), hay un aumento significativo de la fosforilación del residuo Ser16 de PLN que decae durante la "respuesta tardía" al ISO (40 min). En cambio, la fosforilación de Thr17 de PLN no es distinta del basal a los 3 min de perfusión con ISO y se incrementa 1,5 veces a los 40 min de perfusión con el agonista β -adrenérgico. Estos resultados confirman la activación de CaMKII y su contribución a la función contráctil en la "respuesta tardía" a partir de la fosforilación de PLN. n=4. *p<0,05 vs ISO 3 minutos.

Bibliografía

- Lindemann JP, Watanabe AM. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca^{2+} -calmodulin-dependent mechanisms. J Biol Chem 1985; 260:4516-4525.
- Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. J Mol Cell Cardiol 2010; 48:322-330.
- Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca^{2+} /calmodulin kinase signaling pathway. Circ Res 2004; 95:798-806.

CONCLUSIÓN

- Tanto en miocitos como en corazón *ex vivo*, la "respuesta contráctil temprana" a los agonistas β -adrenérgicos en concentraciones submáximas es independiente de CaMKII mientras que la "respuesta tardía" es dependiente de la activación de esta enzima. La discrepancia en los tiempos en los que comienza a ser significativa la participación de CaMKII en los dos modelos experimentales (200 min miocitos vs. 10 min corazón aislado) podría atribuirse a las diferentes condiciones de oxigenación, temperatura y frecuencia de estimulación a las que son sometidos los preparados.
- Nuestros resultados indican que la CaMKII participa como sostén de la respuesta inotrópica positiva tardía de los agonistas β -adrenérgicos y sugieren la fosforilación de Thr17 de PLN como mecanismo molecular involucrado.