



# LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SON LAS RESPONSABLES DEL FENÓMENO DE LA ESCALERA NEGATIVA EN LA RATA



ESPEJO MS; AIELLO EA; DE GIUSTI VC.

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES DR. HORACIO E. CINGOLANI,  
FAC. DE CIENCIAS MÉDICAS, UNLP CONICET.

## Introducción

La relación entre frecuencia de estimulación y fuerza de contracción (RE-F) es un importante mecanismo de regulación de la contractilidad cardíaca. Así, si un aumento en la frecuencia de estimulación induce un aumento de la fuerza de contracción se considera una RE-F positiva (escalera positiva); por otro lado en una RE-F negativa (escalera negativa) la fuerza de contracción disminuye al aumentar la frecuencia de estimulación, característico de los corazones insuficientes. Si bien se conoce que la RE-F depende de la especie en estudio, la temperatura y la frecuencia de estimulación, lo más aceptado en la rata es la presencia de una RE-F negativa. Por otro lado, se sabe que las especies reactivas del oxígeno (ROS) participan de las vías intracelulares desencadenadas por hormonas como Angiotensina II, Endotelina y Aldosterona, modulando la contractilidad; sin embargo la participación de ROS durante el aumento en la frecuencia de estimulación no ha sido investigado en su totalidad.

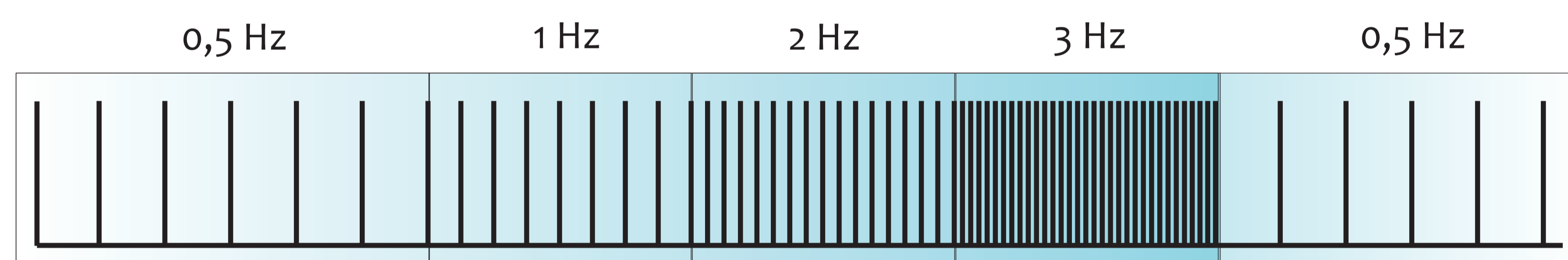
## Objetivo

Investigar la implicancia de ROS en el fenómeno de la escalera negativa de rata.

## Materiales y Métodos

Se utilizaron miocitos ventriculares de ratas macho de 4 meses de edad expuestos a frecuencias de estimulación de 0,5, 1, 2 y 3 Hz sucesivamente en un medio  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  5%. Se evaluó la respuesta contráctil en situación control y con diferentes inhibidores: HOE (HOE642, inhibidor del intercambiador sodio/hidrógeno (NHE-1)), MPG (mercaptopropionilglicina, secuestrador de ROS), Apo (Apocinina, inhibidor de la NADPH oxidasa) y 5HD (ácido 5 hidroxidecanoico, inhibidor de los canales de  $\text{K}^+$  mitocondriales ATP- dependientes;  $\text{mK}_{\text{ATP}}$ ). Además, se cargaron los miocitos con el indicador fluorescente FURA-2 y se estudiaron las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante epifluorescencia a las diferentes frecuencias de estimulación. En cada caso al finalizar la escalera se regresaba a la frecuencia de estimulación basal de 0,5 Hz (Fig. 1). Los datos se expresan como el porcentaje de cambio en el acortamiento o en las determinaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en 1, 2 y 3Hz respecto a la obtenida a 0,5Hz.

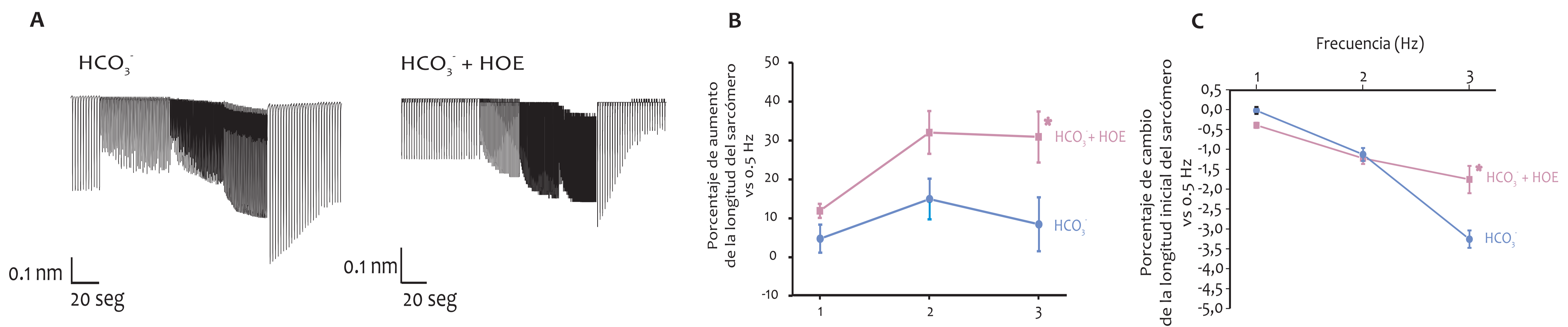
Figura 1: Protocolo de experimentación



## Resultados

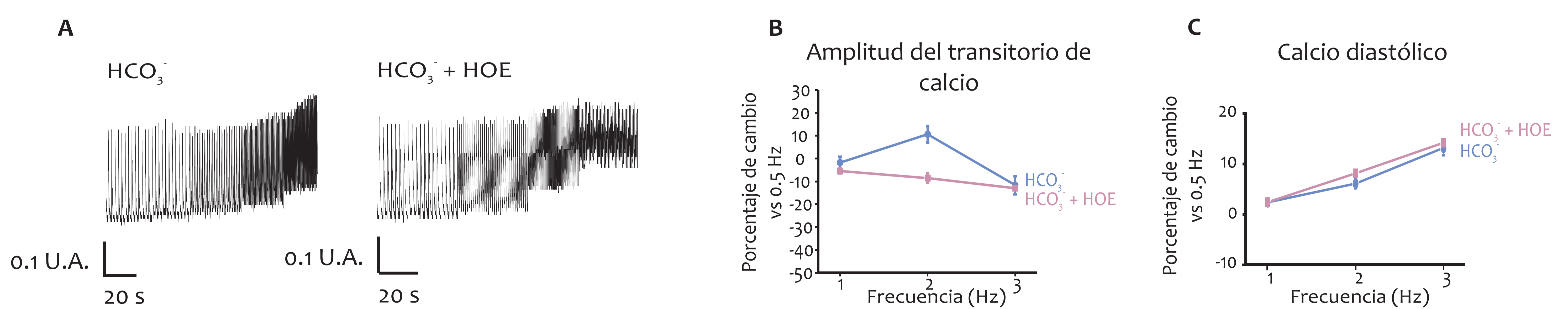
**Contractilidad:** La Fig. 2A muestra trazos representativos en situación control ( $\text{HCO}_3^-$ ) y en presencia de HOE. En situación control no hubo RE-F a 1 y 2 Hz y fue negativa a 3 Hz (1 Hz  $0.63 \pm 3.34$ ,  $n=11$ ; 2 Hz  $6.55 \pm 4.46$ ,  $n=10$ ; 3 Hz  $-5.77 \pm 5.11$ ,  $n=10$ ; Fig. 2 B). En presencia de HOE  $10 \mu\text{M}$  se evidenció el fenómeno de escalera positiva (1 Hz  $10.79 \pm 1.17^*$ ,  $n=15$ ; 2 Hz  $28.33 \pm 4.88^*$ ,  $n=13$ ; 3 Hz  $30.91 \pm 6.54^*$ ,  $n=9$ ;  $*p < 0.05$  vs control; Fig 2B). Además, se determinó el cambio en la longitud inicial del sarcómero en 1, 2 y 3Hz respecto a 0,5Hz, obteniéndose una contractura celular a 3Hz en situación control, que era prevenida en presencia de HOE ( $\text{HCO}_3^-$ :  $-3,20 \pm 0.19$ ,  $n=13$  vs  $\text{HCO}_3^- + \text{HOE}$ :  $-1,76 \pm 0.34^*$ ,  $n=12$ ;  $*p < 0.05$  vs  $\text{HCO}_3^-$ ; Fig 2C), sugiriendo que la sobrecarga de calcio se impedía en la última situación.

Figura 2: Respuesta contráctil ante cambios de frecuencia de estimulación



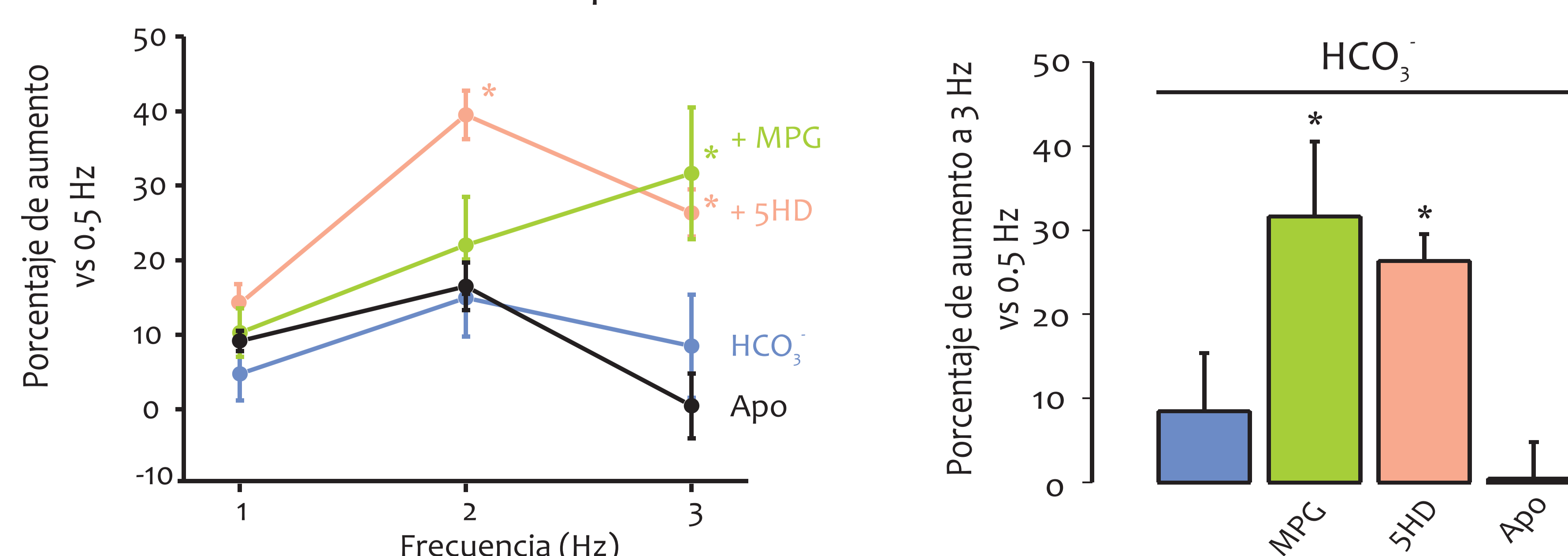
**Manejo del calcio:** La Fig. 3A muestra trazos representativos de los transitorios de calcio en situación control y en presencia de HOE. No se observaron cambios significativos en la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3B) generados durante el incremento de frecuencia, como tampoco hubo diferencias en el  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico (Fig. 3 C) en presencia de HOE respecto a la situación control que puedan explicar el aumento de la contractilidad y la disminución de la contractura evidenciada previamente en la Fig. 2, sugiriendo que dichos cambios son independientes del ciclado del calcio, pero posiblemente dependientes de la sensibilidad de las proteínas contráctiles.

Figura 3 : Manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  ante cambios de frecuencia de estimulación



**Participación de las ROS en la RE-F:** El HOE es un conocido inhibidor del intercambiador sodio/hidrógeno (NHE-1), pero también ha sido demostrado que previene la liberación de ROS mitocondriales actuando de manera directa sobre dicha organela (Garciaarena, 2008). Dado que durante el aumento de la frecuencia de estimulación se genera un aumento en la producción de ROS por aumento del metabolismo celular, quisimos evaluar si los ROS eran los responsables de la RE-F negativa en la rata, y lo observado en presencia de HOE era debido a evitar su aumento citosólico. Para estudiar la intervención de los ROS en la escalera, pre-incubamos a los miocitos con MPG  $2 \text{ mM}$ , Apo  $300 \mu\text{M}$  y 5HD  $500 \mu\text{M}$ . Como se muestra en la Fig 4A y B, en presencia de MPG o 5HD se previene la escalera negativa (MPG: 1Hz  $10.30 \pm 3.24$ ,  $n=4$ ; 2Hz  $22.03 \pm 6.52$ ,  $n=4$ ; 3Hz  $31.67 \pm 8.87^*$ ,  $n=3$  y 5HD 1Hz  $14.17 \pm 2.64$ ,  $n=5$ ; 2Hz  $39.50 \pm 3.24^*$ ,  $n=5$ ; 3Hz  $26.36 \pm 3.18^*$ ,  $n=5$ ;  $*p < 0.05$  vs control). Por otro lado, en presencia de Apo se mantuvo la escalera negativa (Apo: 1Hz  $9.17 \pm 1.36$ ,  $n=10$ ; 2Hz  $16.49 \pm 3.21$ ,  $n=10$ ; 3Hz  $0.46 \pm 4.34$ ,  $n=9$ ). Estos resultados, nos permiten inferir que el aumento en la producción de ROS durante el aumento de la frecuencia de estimulación depende de las mitocondria y que estas moléculas están implicadas en la RE-F negativa de la rata.

Figura 4 : Respuesta contráctil ante cambios de frecuencia de estimulación en presencia de inhibidores de ROS



## Conclusión

El aumento en la frecuencia de estimulación genera un incremento en la producción de ROS mitocondriales, produciendo un efecto negativo en la respuesta contráctil (escalera negativa), que es prevenido en presencia de MPG, 5HD o HOE.

El mecanismo por el cual las ROS generan una RE-F negativa en la rata estaría relacionado a la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$ .