

El Carvedilol y su análogo no β -bloqueante previenen la descarga arritmogénica de Ca^{++} inducida por digitálicos en cardiomiocitos de rata.

Luis Gonano¹, Marisa Sepúlveda¹, Tamara Toteff², Alicia Mattiazzi¹, Wayne Chen³ y Martín Vila Petroff¹.

1: CIC, UNLP-CONICET; 2 Hospital Italiano de La Plata; 3: Universidad de Calgary, Canadá.

Introducción

El efecto inotrópico producido por la inhibición de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa con digitálicos ha sido usado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca por más de 200 años. Sin embargo, la ventana terapéutica de estos fármacos se ve limitada por la potencial aparición de arritmias. Recientemente demostramos que estas arritmias están mediadas por la fosforilación del Receptor de Rianodina (RyR2), lo cual promueve la pérdida diastólica espontánea de Ca^{++} del retículo sarcoplasmático (RS) hacia el citosol⁽¹⁾. La extrusión de estos iones Ca^{++} ocurre a través del intercambiador Na^+/Ca^{++} y genera una corriente despolarizante capaz de disparar un potencial de acción ectópico.

Teniendo en cuenta que el Carvedilol y sus análogos de similar estructura química pero sin su acción β -bloqueante, son capaces de prevenir las arritmias inducidas por sobrecarga de Ca^{++} del RS al reducir el tiempo de apertura del RyR2⁽²⁾, hipotetizamos que estos podrían prevenir las arritmias inducidas por digitálicos.

Adicionalmente, los digitálicos aún en dosis subarritmogénicas, promueven necrosis y apoptosis de los cardiomiocitos mediante un mecanismo que implica la activación de la quinasa dependiente de Ca^{++} /Calmodulina tipo II⁽³⁾ y que podría involucrar la apertura espontánea de los RyR2 como evento patogénico.

Por estas razones, nos proponemos evaluar el impacto que la estabilización farmacológica de los RyR2 tiene sobre: la propensión arritmogénica de los cardiomiocitos tratados con dosis tóxicas de Ouabaína en forma aguda, y la viabilidad de cardiomiocitos cultivados en presencia de dosis subarritmogénicas de Ouabaína.

Materiales y métodos

Los experimentos fueron realizados en cardiomiocitos obtenidos de ratas wistar macho de 2-3 meses, mediante la digestión enzimática del corazón. Para evaluar el perfil contráctil y el manejo de Ca^{++} intracelular, se los trató con Ouabaína 50 μ M en forma aguda y se realizó:

-Registro de acortamiento mediante video-detección de bordes celulares.

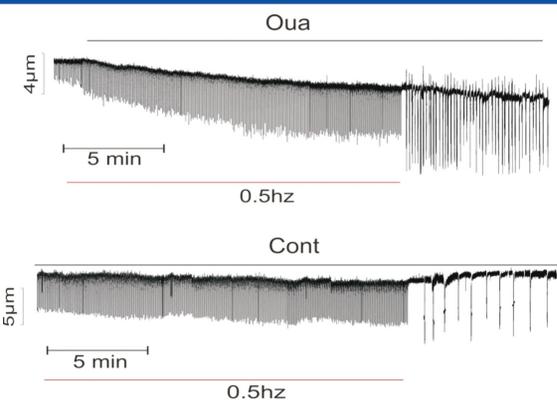
-Estimación del contenido de Ca^{++} dentro del RS, estudiando mediante microscopía de epifluorescencia la liberación de Ca^{++} hacia el citosol en respuesta a la aplicación de un pulso de Cafeína en cardiomiocitos incubados con Fura-2.

-Mediante microscopía confocal se calculó la velocidad de las ondas de Ca^{2+} (Ca^{++} waves) en cardiomiocitos incubados con el indicador sensible a Ca^{++} Fluo-3.

Para estudiar el efecto de la ouabaína sobre apoptosis/necrosis: se cultivaron cardiomiocitos de rata durante 24 hrs, en presencia y ausencia de ouabaína 2 μ M y se calculó el porcentaje de células viables por método morfométrico (célula viva: largo/ancho > 3/1).

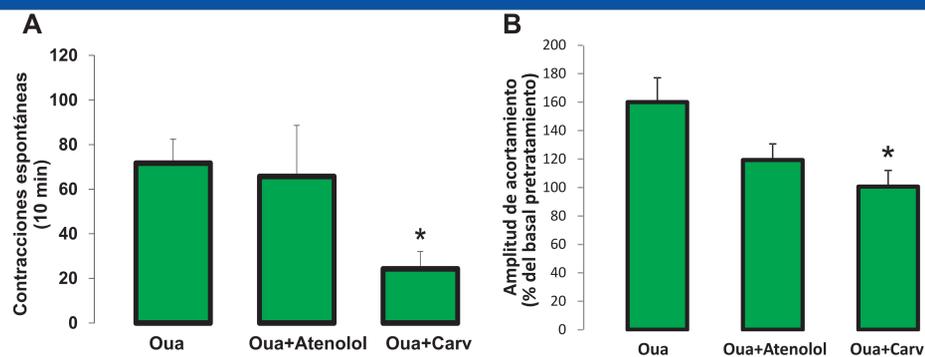
Resultados

1. La exposición aguda a concentraciones altas de Ouabaína promueve la descarga arritmogénica de Ca^{++} /contracción espontánea de los cardiomiocitos.



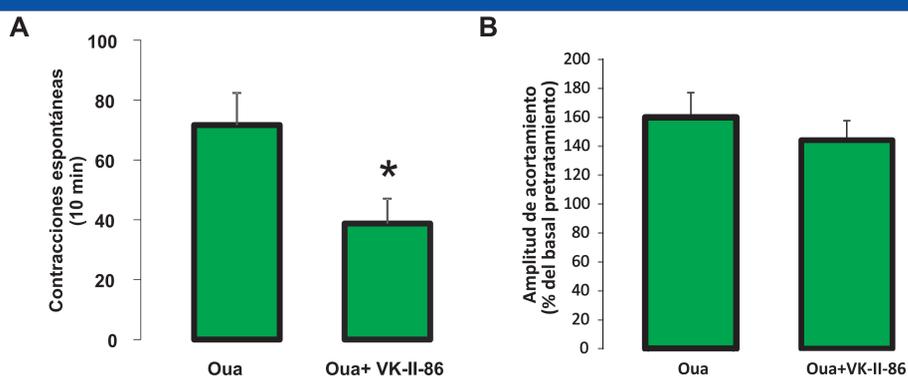
Registros representativos de acortamiento celular muestran el efecto inotrópico positivo desarrollado en cardiomiocitos de rata durante el tratamiento con Ouabaína 50 μ M, el cual se asocia con un incremento en el número de contracciones espontáneas (CE), que son registradas al retirar el marcapaseo eléctrico y reflejan la descarga espontánea de Ca^{++} del RS hacia el citosol.

2. El carvedilol resulta efectivo para reducir la descarga arritmogénica de Ca^{++} inducida por Ouabaína.



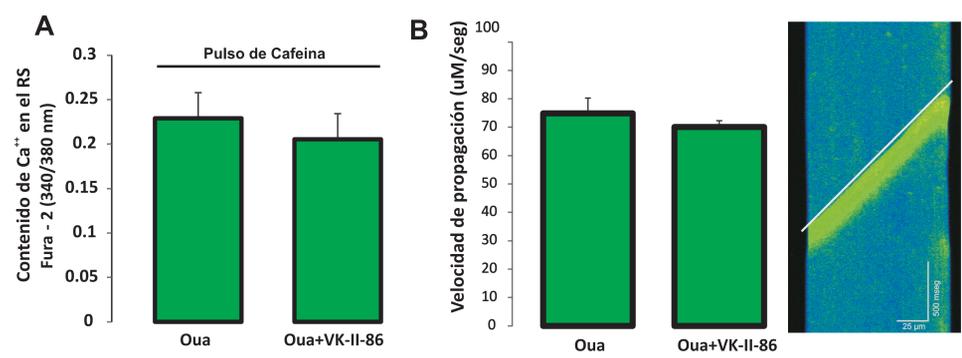
El panel A muestra resultados promedio del número de CE registrado en 10 minutos y el panel B presenta la variación porcentual en la amplitud de contracción celular (efecto inotrópico) a los 15 minutos de tratamiento con Ouabaína 50 μ M. Los cardiomiocitos tratados con Carvedilol o Atenolol (1 μ M en ambos casos) fueron preincubados durante 30 minutos y mantenidos en presencia de estas drogas durante el tratamiento con Ouabaína. Estos resultados indican que el Carvedilol, no así el Atenolol, logra prevenir el desarrollo del perfil arritmogénico pero interfiere con el desarrollo del efecto inotrópico esperado.

3. El análogo no β -bloqueante del Carvedilol (VK-II-86) es capaz de prevenir la descarga arritmogénica de Ca^{++} inducida por Ouabaína sin afectar la respuesta inotrópica de los cardiomiocitos.



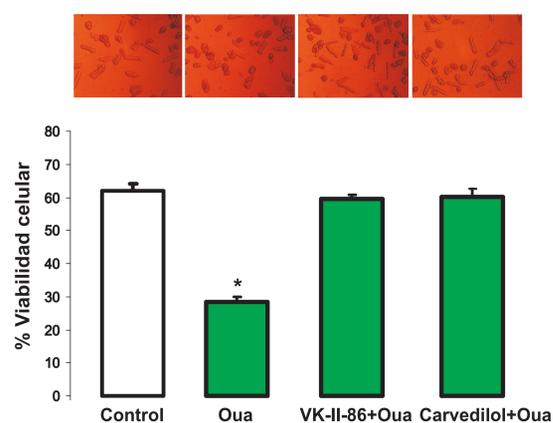
Resultados promedio muestran que el tratamiento con VK-II-86 1 μ M reduce significativamente el número de contracciones espontáneas en cardiomiocitos aislados (A), sin afectar la magnitud del efecto inotrópico positivo desarrollado durante el tratamiento con Ouabaína 50 μ M (B). (n=14 por grupo)

4. El efecto antiarrítmico del VK-II-86 no se debe a una reducción del contenido de Ca^{++} del RS ni a una menor sensibilidad de los RyR2 al Ca^{++} citosólico.



En "A" se presentan resultados promedio de la amplitud de la liberación de Ca^{++} inducida mediante la aplicación de pulsos de Cafeína 15 mM. Se observa que el tratamiento con VK-II-86 no modificó el contenido de Ca^{++} dentro del RS en cardiomiocitos tratados con Ouabaína 50 μ M durante 15 minutos. En "B" se observan resultados promedio y registro representativo que muestran que el tratamiento con VK-II-86 no modificó la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{++} a lo largo de los cardiomiocitos.

5. La estabilización de los RyR2 previene la muerte celular inducida por Ouabaína.



Imágenes representativas y resultados promedio del porcentaje de viabilidad celular registrado luego de mantener cardiomiocitos aislados de rata en cultivo primario durante 24 horas. El cultivo en presencia de 2 μ M de Ouabaína redujo significativamente el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el co-tratamiento con Carvedilol o VK-II-86 1 μ M previno la muerte celular inducida por Ouabaína. (n=5 cultivos).

Conclusiones

Concluimos que el tratamiento combinado de Digitálicos con análogos del Carvedilol podría ampliar la ventana terapéutica de los primeros, al reducir el riesgo de arritmias mediante la estabilización de los RyR2 sin afectar su efecto inotrópico. Adicionalmente, nuestros resultados indican que la estabilización de los RyR2 es capaz de prevenir la muerte celular promovida por el tratamiento prolongado con dosis sub-arritmogénicas de Ouabaína.

Referencias

1- Gonano LA, Sepúlveda M, Rico Y, Kaetzel M, Valverde CA, Dedman J, Mattiazzi A, Petroff MV. Calcium-Calmodulin Kinase II Mediates Digitalis-Induced Arrhythmias. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2011;4:947-957.

2- Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Wang A, et al. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca^{2+} release. Nat Med 2011;17:1003-9.

3- Sapia L, Palomeque J, Mattiazzi A, Petroff MV. Na^+/K^+ -ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2010; 49:459-68.