

2014 Noviembre, 2(2): 11-11

Desarrollo de un shRNA en un vector lentiviral para la inhibición específica de la isoforma electrogénica del cotransportador sodio/bicarbonato cardíaco

Autores: Di Mattía RA, Ciancio MC, De Martino M, Aiello EA, Orlowski A.
Centro de Investigaciones Cardiovasculares. UNLP-CONICET

Resumen

El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cardíaco (NBC) es uno de los principales mecanismos alcalinizantes que tienen los miocitos para regular el pH intracelular (pH_i). En el corazón se ha demostrado la presencia de dos isoformas del NBC. Una isoforma electrogénica, NBCe1 ($2 \text{HCO}_3^- : 1 \text{Na}^+$) y otra electroneutra, NBCn1 ($1 \text{HCO}_3^- : 1 \text{Na}^+$). Si bien en cada ciclo ambas isoformas incorporan Na^+ al interior celular, la isoforma electrogénica lo hace de un modo más eficiente ya que contribuye con la mitad del Na^+ por cada HCO_3^- que ingresa. Es conocido que el incremento del Na^+ intracelular puede activar al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en su modo reverso incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular y así conducir a la hipertrofia cardíaca (HC). Recientemente hemos demostrado la disminución de la actividad del NBCe1 y un incremento del NBCn1 en modelos de HC. Sin embargo, no se ha determinado aún si es causa o consecuencia de dicho fenómeno, debido a la inexistencia de inhibidores farmacológicos específicos. Con el objetivo de estudiar el efecto del NBCe1 en la HC se desarrolló un shRNA expresado en un vector lentiviral de tercera generación para inhibir la expresión del NBCe1 a nivel cardíaco. El virus se obtuvo a través de co-transfecciones de células HEK293 con el plásmido portador del shRNA y otros 3 plásmidos que codifican para proteínas estructurales. Mediante experimentos de western-blot se demostró la disminución de la expresión del NBCe1 en células transducidas con el lentivirus (cont: 100 ± 5 , $n=4$ vs shRNA: 15 ± 2 , $n=4$, $P < 0.05$). A través la técnica de inmuno-fluorescencia se determinó en cultivos de miocitos neonatales que expresaban el shRNA una disminución significativa de la expresión del NBCe1. Además, se obtuvo un aumento significativo del tamaño de los miocitos (cont: 14330 ± 350 , $n=68$ vs shRNA: $18570,61 \pm 611^*$, $n=66$, $P < 0.05$) evidenciando una posible causa del desarrollo de hipertrofia cardíaca por una disminución de la actividad del NBCe1. Estos y futuros experimentos permitirán comprender el papel del NBCe1 en el desarrollo de HC.

Fecha de Recibido: 04-10-14

Fecha de Publicación: 1-11-14