Generación de anticuerpos inhibitorios de la función del cotransportador sodio/bicarbonato cardíaco. Una posible futura herramienta terapéutica

VERONICA C. DE GIUSTI, ALEJANDRO ORLOWSKI, ERNESTO A AIELLO

***Introducción*: El cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC) cardíaco es un importante mecanismo alcalinizante encargado de regular el pH intracelular (pH_i) en las células cardíacas. En el corazón se han identificado al menos 3 isoformas del NBC: 1 electroneutra (NBC3), con estequiometría 1 Na^+/ 1 HCO_3^-, y 2 electrogénicas (NBC1 y NBC4), las cuales introducen 2 moléculas de HCO_3^- por cada 1 de Na^+. Dado que este último mecanismo genera una corriente aniónica repolarizante, su correcto funcionamiento es relevante en el control de la forma y duración del potencial de acción (PA). *Material y método*: en este trabajo diseñamos anticuerpos contra el dominio extracelular 3 del NBC1 (a-L3) con el objeto de profundizar el estudio de su participación en la fisiología de la célula cardíaca, utilizando miocitos ventriculares de rata Wistar. Se estudió la actividad del NBC total en la recuperación del pH_i tras la imposición de una acidosis intracelular (*pulsos de amonio*; se obtiene el flujo de H^+ [J_H] a pH_i 6,8), y la actividad exclusiva del NBC electrogénico durante la despolarización con alto K^+ (*pulsos de* K^+, ΔpH_i, a los 14 minutos de la despolarización). El asterisco (*) indica $p < 0,05$ respecto del control. *Resultados*: el a-L3 reconoció a la proteína del NBC1 en preparados ventriculares. La alcalinización secundaria al alto K^+ quedó totalmente abolida en presencia del a-L3 (0,17 ± 0,02; n = 6 *vs* 0,02 ± 0,02; n = 5*). El a-L3 redujo un 50% al J_H durante la recuperación de la acidosis (3,3 ± 0,4; n = 8 *vs* 1,71 ± 0,3; n = 4*). En experimentos de *patch-clamp* perforado, el a-L3 prolongó la duración del PA 12,5 ± 1,9% (n = 4), de manera consistente con el bloqueo del NBC1. *Conclusiones*: el NBC1 es la única isoforma electrogénica activa en los miocitos ventriculares, participando equitativamente junto a la isoforma electroneutra NBC3 en la recuperación de la acidosis. Además la corriente aniónica generada por el NBC1 se perfila como el principal componente de la corriente repolarizante imputada al NBC electrogénico. El uso del a-L3 podría ser relevante en el estudio diferencial de las isoformas del NBC en la fisiopatología cardiovascular.**

***Palabras clave*:** Miocitos cardíacos. pH intracelular. Cotransporte sodio/bicarbonato.

El control del pH intracelular (pH_i) en los miocitos es esencial para el correcto funcionamiento del corazón. Para ello, las células constan de 2 transportadores de membrana acidificantes (intercambiadores Cl^-/HCO_3^- [AE] y Cl^-/OH^- [CHE]) y 2 alcalinizantes (intercambiador Na^+/H^+ [NHE] y cotransportador Na^+/HCO_3^- [NBC]).[1] En ausencia de bicarbonato, el único mecanismo alcalinizante activo es el NHE, pero en un medio extracelular que contiene el mencionado *buffer*, como es la sangre, ambos mecanismos alcalinizantes son funcionales, participando equitativamente en el control del pH_i.[1-5] Recientemente hemos demostrado la importancia del NBC en la recuperación del pH_i tras una acidosis, siendo el único mecanismo activo cuando el NHE está inhibido.[6]

En el corazón se han descripto al menos 3 isoformas del NBC, una electroneutra (NBCn), de estequiometría 1 Na^+/ 1 HCO_3^-, denominada NBC3[7,8], y dos isoformas electrogénicas (NBCe), de estequiometría 1 Na^+:2 HCO_3, denominadas NBC1[9,10] y NBC4[11,12]. Nuestro laboratorio ha descripto la importancia que tiene el NBCe en la configuración de la forma y duración del potencial de acción de las células cardíacas, tanto en corazones de rata[13] como de gato[14]. En dichos trabajos se determinó la corriente aniónica generada por el NBCe, denomi-

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Dirección postal: Ernesto A. Aiello. Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Calle 60 y 120. 1900 La Plata. Pcia. de Buenos Aires. Argentina.

e-mail: aaiello@med.unlp.edu.ar

Los autores de este trabajo declaran al mismo no afectado por conflictos de intereses.

Recepción del artículo: 06-DIC-2010

Recepción de las correcciones: 23-DIC-2010

Aceptación: 30-DIC-2010

La versión digitalizada de este trabajo está disponible en www.fac.org.ar

nándola I_{NBC}, y dado el acortamiento en la duración del potencial de acción (DPA) que se genera al cambiar de un medio HEPES-sin bicarbonato a una solución con bicarbonato, se demostró la importancia que tiene el MBCe en la repolarización del potencial de acción de los miocitos ventriculares.

El estudio de la participación del NBC en la fisiología de las células cardíacas se ha visto dificultado porque recién a partir del año 2008 se cuenta con un inhibidor específico del cotransportador, descripto por el grupo de Vaughan-Jones y denominado S0859.[15] Si bien este compuesto ya ha sido utilizado con éxito en nuestro laboratorio para estudiar la actividad del NBC total[6], en el presente trabajo pretendimos profundizar la investigación sobre el NBC y estudiar en forma diferencial la participación de sus isoformas en la fisiología de la célula cardíaca del corazón de rata. Para ello diseñamos anticuerpos dirigidos específicamente contra la isoforma electrogénica NBC1, y así hemos focalizado nuestra atención exclusivamente en el estudio del NBCe.

MATERIAL Y METODO

Construcción de la proteína de fusión

La construcción de los plásmidos bacterianos conteniendo el ADNc de la enzima glutation-S-transferasa (GST) unida al ADNc correspondiente al dominio extracelular 3 del NBC1 fue realizada como ya ha sido descripto anteriormente[16].

Preparación de los anticuerpos

Se inmunizaron conejos de 3 meses de edad con una inyección subcutánea de 1 mg de la proteína de fusión en adyudante de Freund's completo, seguida de 2 inyecciones de 1 mg de la proteína de fusión en adyudante de Freund's incompleto. El intervalo entre las inyecciones fue de 1 mes. Finalmente se obtuvo el suero de los animales conteniendo el anticuerpo contra el dominio extracelular 3 del NBC1 (a-L3). Paralelamente se inyectaron conejos con el adyudante de Freund's completo sin la proteína de fusión, con el objeto de generar sueros controles sin el anticuerpo (sham).

Aislamiento de los miocitos

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se realizó una toracotomía y se expuso la cavidad torácica. Se inyectó 1 mL de heparina sódica (200 U/mL) dentro de la cavidad ventricular para evitar la formación de coágulos. Los corazones fueron removidos y digeridos enzimáticamente en un sistema de Langerdorf bajo el siguiente protocolo: 5 minutos en solución HEPES 1 mM Cl_2Ca para limpiarlo y estabilizarlo; 5 minutos con otra solución nominalmente libre de calcio y 0,1 mM de *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-n, n, n', n'-tetraacetic acid (EGTA)*; y finalmente 15 minutos en solución enzimática (0,5 mM Cl_2Ca, 0,20 mg/mL de colagenasa tipo II [300 U/mL], 0,02 mg/mL de proteasa y albúmina bovina 0,5 mg/mL). La temperatura se mantuvo a 37°C durante todo el proceso de digestión.

Una vez concluida la digestión, el corazón fue desmontado y el tejido ventricular no digerido disociado mecánicamente con tijeras. Se restituyó progresivamente el calcio hasta lograr una concentración final 1 mM. Previo al inicio de los experimentos, para evaluar la actividad del NBC, los miocitos se resuspendieron en una solución de bicarbonato burbujeado con CO_2 5%/O_2 95%.

Registro del pH_i

El pH intracelular (pH_i) de los miocitos se midió por un sistema de epifluorescencia (Ion Optix, Milton, MA). Se utilizaron los miocitos cardíacos obtenidos en el mismo día mediante la técnica previamente descripta y mantenidos en un medio con HCO_3^- burbujeado con CO_2 5%/O_2 95%, los cuales fueron cargados con 10 µM del indicador de pH_i, 2'-7'-bis (2-carboxyethyl) -5, 6-carboxyfluorescein (BCECF)-AM a 30°C durante 10 minutos, al cabo de los cuales se lavó el medio extracelular con solución libre de indicador.

Transcurridos 30 minutos de lavado, los miocitos fueron colocados sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon.TE 2000-U), a flujo continuo (2 mL/min) y estimulados a través de dos electrodos de platino a una frecuencia de 0,5 Hz. La luz de excitación, provista por una cámara de Xenon de 75 watt, fue centrada a 440 y 490 nm y transmitida a los miocitos. La fluorescencia emitida fue colectada por un fotomultiplicador provisto de un filtro de 535 nm. El cociente (490/440) fue digitalizado a 10 kHz (ION WIZARD *software*) para análisis de fluorescencia.

Al término de cada experimento se realizó la calibración con nigericina y alto K^+.[17] Esto permitió transformar las unidades arbitrarias de fluorescencia del cociente 490/440 en unidades de pH_i. Se realizó un gráfico del pH_i *vs* el cociente 490/440, se hizo un ajuste lineal de los datos. El valor de la ordenada al origen y la pendiente de la ecuación general de la recta fueron utilizados para reemplazar los datos de fluorescencia por los de pH_i.

Los miocitos cargados con BCECF se utilizaron para medir el pH_i de las células realizando 2 técnicas diferentes, las cuales se describen brevemente a continuación:

Pulso de amonio: actividad del NBC total

Inicialmente los miocitos fueron expuestos a una solución extracelular de bicarbonato burbujeado con CO_2 5%/O_2 95%, registrándose el pH_i hasta su estabilización. La exposición a NH_4Cl 20 mM durante 3 minutos generó una alcalosis intracelular debido a la difusión rápida, a través de la membrana, de amoníaco (NH_3) y

la subsecuente asociación de esta molécula con los H^+ intracelulares. Cuando el NH_4Cl fue removido se evidenció una rápida acidificación celular debida a la generación intracelular de H^+, secundaria a la disociación del NH_4^+ en H^+ y NH_3 y al aporte de H^+ provenientes de la difusión lenta del NH_4^+. Esta acidosis intracelular activó a los mecanismos celulares alcalinizantes (NHE y NBC) encargados de llevar el pH_i a sus valores basales.

En el presente trabajo, con la finalidad de estudiar exclusivamente al NBC, los experimentos fueron realizados en presencia continua del inhibidor selectivo del NHE HOE 642 (10 µM), dosis que demostró ser la mínima necesaria para bloquear totalmente su actividad[6]. Los miocitos fueron preincubados 10 minutos previos al inicio de los *pulsos de amonio* con el suero sham o con el suero conteniendo el a-L3.

El análisis de los datos se realizó en el programa de computación Origin 7.0, ajustando la curva de recuperación con una función exponencial de primer orden. De este ajuste se obtuvo la velocidad (dpH_i/dt) de recuperación a cada pH, y luego, con este dato y conociendo la capacidad amortiguadora total (β_{tot}), se calculó el flujo de protones (J_H) en mM/min ($JH = \beta_{tot}\ dpH_i/dt$). La β_{tot} fue calculada a partir de la suma entre la capacidad amortiguadora del CO_2 intracelular (β_{CO2}) y la capacidad amortiguadora intrínseca (β_i).

La β_{CO2} fue calculada como $\beta_{CO2} = 2{,}3\ [HCO_3^-]_i$, donde $[HCO_3^-] = [HCO_3^-]_o\ 10^{pHi-pHo}$.[18,19] La β_i de los miocitos fue calculada exponiendo las células a diferentes concentraciones de NH_4Cl (20, 15, 12, 9, 5, y 3 mmol/L) en *buffer* HEPES- 0 Na^+ y registrando el pH_i obtenido para cada concentración de NH_4Cl durante 3 minutos, utilizando luego el promedio de los valores del último minuto en cada situación. Sabiendo que: $NH_4^+i = NH_4^+{}_o \times 10^{(pHo-pHi)} / 1+10^{(pHo-pK)}$, la β_i se calculó como $\beta_i = \Delta [NH_4^+/pHi$, y referida al punto medio de las medidas de pH_i, pK del $NH_4^+ = 9{,}21$ y el $pH_o = 7{,}4$.[20] La β_i a diferentes valores de pHi fue estimada sobre un ajuste lineal obtenido de la gráfica entre la β_i en función del pH_i.

Pulso de K^+: NBC electrogénico (NBCe) en aislamiento

Inicialmente los miocitos fueron expuestos a una solución extracelular de bicarbonato con $[K^+]_o$ 5 mM, para luego cambiar la solución por una con $[K^+]_o$ 45 mM, isosmolar con respecto a la primera, la cual se mantuvo durante 14 minutos. Este cambio a una solución de alto K^+ generó una despolarización celular de aproximadamente 60 mV, lo cual activó selectivamente al NBCe y generó un aumento del pH_i (ΔpH_i), representando una medida de la actividad del NBCe. Por último, los miocitos volvieron a ser expuestos a la solución inicial, constatándose el descenso del pH_i.

Con esta técnica se pretendió estudiar las dos isoformas electrogénicas del NBC (NBC1 y NBC4), utilizando el anticuerpo diseñado por nuestro laboratorio contra la isoforma NBC1 (a-L3). El suero conteniendo el a-L3 fue agregado 10 minutos antes del inicio de los *pulsos de K^+*.

Detección del NBC1 por Western Blot

Esta técnica se utilizó para investigar la expresión del NBC1 en preparados ventriculares de ratas Wistar utilizando el anticuerpo contra el NBC1 (a-L3). Adicionalmente se utilizaron células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) transfectadas con NBC1, como control positivo.

Las células HEK 293 se transfectaron con la variante por *splicing* alternativo del NBC1, el NBC1-B[16]. Los preparados fueron homogeneizados con un Polytron en *buffer* fosfatosalino (140 mM ClNa, 3 mM ClK, 6,5 nM HPO_4Na_2, 1,5 mM $H_2PO_4K_i$, pH 7,4), conteniendo inhibidores de proteasas (MiniComplete Tablets, Roche).

Se tomó una alícuota a la cual se le adicionó el *buffer* de carga SDS/PAGE (10% [v/v] de glicerol, 1-3% [v/v] 2-mercaptoetano, 2% [p/v] SDS, 0,5% [p/v] de azul de bromofenol, 75 mM Tris, pH 6,8). Las muestras se resolvieron en geles de 7,5% de poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y luego incubadas con el a-L3 o con suero sham.

La detección de las proteínas inmunorreactivas fue realizada por quimioluminiscencia, utilizando un anticuerpo secundario (Amersham). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5%. Anticuerpos Ig-G conjugados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) fueron utilizados como anticuerpos secundarios y las bandas se visualizaron usando el reactivo ECL y el equipo Chemidoc (Biorad).

Registro de potencial de acción por *patch-clamp*

El registro de potencial de acción (PA) de los miocitos ventriculares dispuestos en una cámara de perfusión se realizó con la técnica de *patch-clamp* en su configuración *patch* perforado, utilizando un amplificador de *patch-clamp* (Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, California).

Las pipetas se generaron con un estirador de pipetas PP-83 *puller* (Narishige, Tokyo, Japan) y luego se pulieron con una microforja MF-83 (Narishige) hasta lograr una resistencia final de 0,5-1 MΩ

Las corrientes (filtradas a 1 kHz) se registraron en forma digital directamente al disco duro de una PC, a través de un convertidor analogicodigital (Digidata 1200, Axon Instruments). Se utilizaron los programas pClamp y Axotape (Axon Instruments). El análisis de los datos se realizó con pClamp (Clampfit).

Estadística

Los datos fueron expresados como media ± error estándar (ES), siendo comparados con el test de Student. Un valor $p < 0{,}05$ fue considerado estadísticamente significativo.

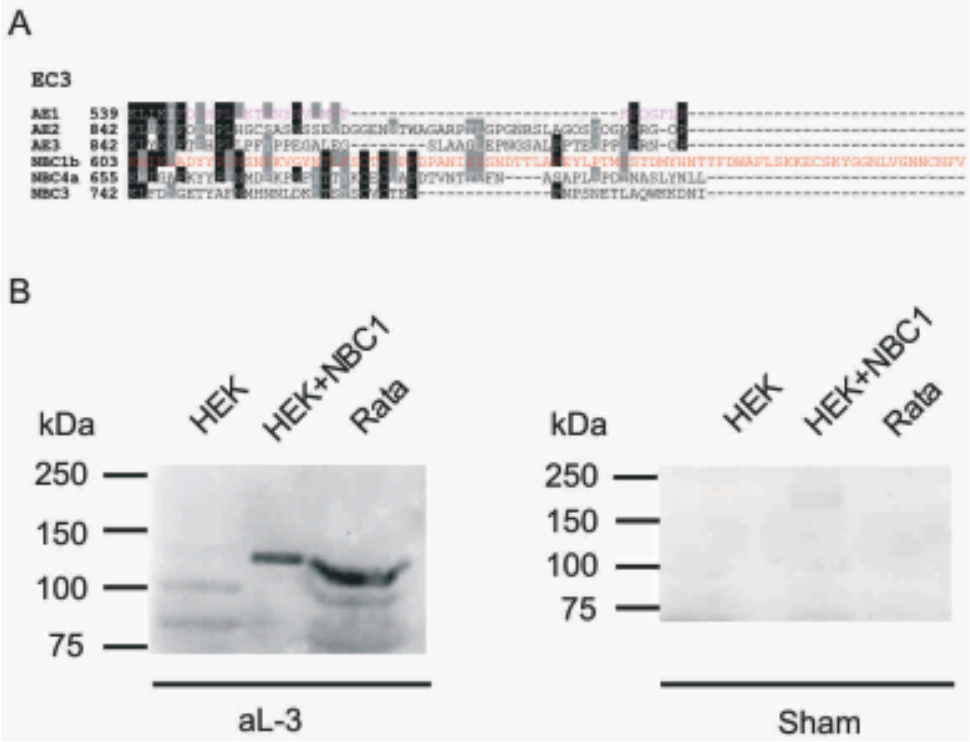

Figura 1. Expresión del NBC1 en corazón de rata. **Panel A**: alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular 3 (EC3) de los transportadores de bicarbonato. Las secuencias conservadas están indicadas con rectángulos negros (aminoácidos idénticos) y con rectángulos grises (aminoácidos similares). El color rosa indica el EC3 del AE1. El color naranja señala a los aminoácidos utiizados para construir el a-L3. **Panel B**: Western Blots que muestran la banda de 130 KDa, correspondiente al peso molecular del NBC1 (señalado con una flecha) en los preparados ventriculares incubados con el a-L3. En los preparados incubados con el suero sham no se evidencia la banda (control negativo). En lisados de células HEK 293 transfectadas con el NBC1 también se evidencia la banda (control positivo).

Soluciones

Solución HEPES para el aislamiento de los miocitos. (mM) 146,2 NaCl, 4,69 KCl, 11 glucosa, 10 HEPES, 0,35 NaH_2PO_4. H_20, 1,05 SO_4Mg. $7H_2O$, pH 7,4 con OHNa. A esta solución se le agrega 2 mM Cl_2Ca para la etapa de lavado o 0,1 mM EGTA. Todas las soluciones durante el aislamiento son burbujeadas con O_2 100%.

Solución de HCO_2 utilizada en los pulsos de amonio y experimentos de *patch-clamp*. (mM) 5 KCl, 1,2 $MgSO_4$, 0,8 Cl_2Mg, 1,35 Cl_2Ca, 10 glucosa, 20 $NaHCO_3$, pH 7,4 con OHNa luego del burbujeo continuo con CO_2 5%/ O_2 95%.

Solución para la realización de los pulsos de K^+. (mM) 118 NaCl, 5 KCl, 1 $MgSO_4$, 0,35 NaH_2PO_4, 10 glucosa, 40 cloruro de colina, 20 $NaHCO_3$, pH 7,4 luego del burbujeo continuo con CO_2 5%/O_2 95%. En la solución de alto K^+ para inducir la despolarización celular se reemplazó 40 mM cloruro de colina por 40 mM KCl.

Solución para el interior de la pipeta de *patch-clamp*. (mM) 130 gluconato de K^+, 10 KCl, 5 NaCl, 0,5 $MgCl_2$, 1 EGTA, 10 HEPES, 0,3 mg/mL nistatina, pH 7,2 con KOH.

Solución de calibración utilizada para la medición del pH_i. (mM) 10 KCl, 1 $MgGCl_2$, 2 EGTA, 12 HEPES, 0,01 nigericina, 11 glucosa, 20 2,3-butanedionemonoxime (BDM), el pH se ajusta con KOH a diferentes valores en el rango de 7,5 a 6,5.

HEPES-0 Na^+ para el cálculo de la capacidad amortiguadora intrínseca (β_i) de los miocitos. (mM) 25 HEPES, 4,66 KCl, 1,05 $MgSO_4$, 1,35 $CaCl_2$, 148 N-metil-D-glucamina, 11 glucosa, pH 7,4 HCl 1N.

RESULTADOS

1. Expresión del NBC1 en lisado ventricular

Investigamos la expresión de la proteína del NBC1 en corazones de ratas Wistar utiizando el anticuerpo contra el dominio extracelular 3 del NBC1 (a-L3). En la **Figura 1 panel A** se muestra la secuencia de alineamiento de los aminoácidos de los dominios extracelular 3 (EC3) y 4 (EC4) de los transportadores pertenecientes a la familia SLC4 (AE y NBC). Como se puede apreciar, si bien las secuencias tienen regiones conservadas, también presentan extensas zonas no conservadas, que minimizan el riesgo de una reacción cruzada entre el a-L3 y diferentes miembros de la familia SLC4.

La **Figura 1 panel B** muestra la presencia de una banda de aproximadamente 130KDa, correspondiente al peso molecular del NBC1, en los preparados ventriculares incubados con el a-L3. En los preparados ventriculares incubados con el suero sham (control negativo) no se observa dicha banda. Paralelamente, en las células HEK 293 transfectadas con el NBC1 e incubadas con el a-L3 también se evidenció la banda correspondiente al cotransportador (control positivo).

Estos experimentos nos permiten concluir que el anticuerpo diseñado en nuestro laboratorio es capaz de reconocer a la proteína del NBC1, demostrando la expresión de dicha isoforma en corazón de ratas Wistar.

2. El NBC1 es el único mecanismo electrogénico de los miocitos ventriculares: pulsos de K^+

La despolarización con alto K+ fue utilizada como método para evaluar la actividad del NBC electrogénico

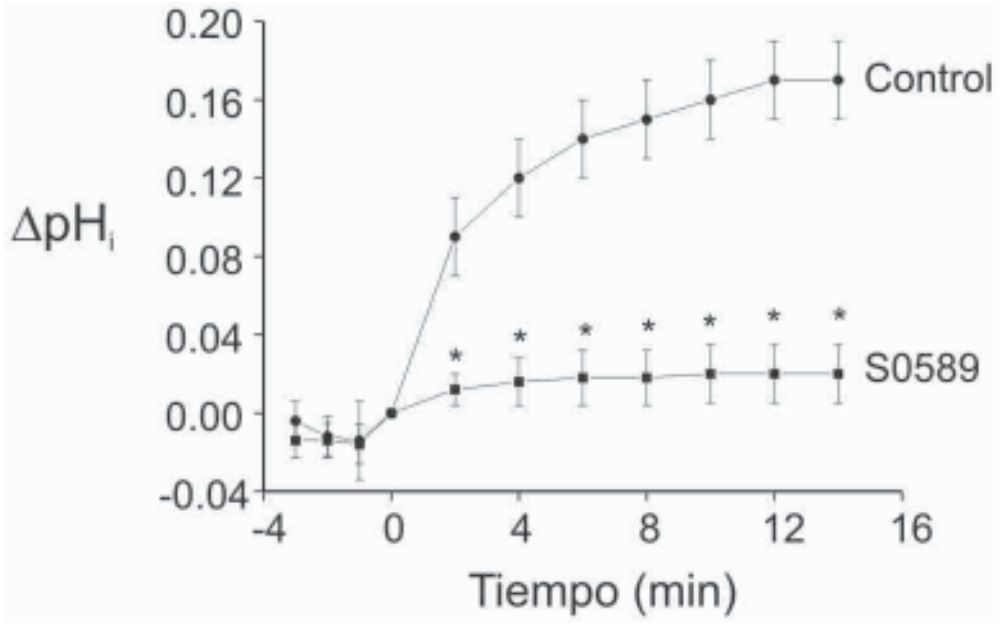

Figura 2. Aislamiento de la actividad del NBCe con el pulso de K^+. Promedio del cambio de pH_i registrado durante los 14 minutos de exposición al alto K^+ en situación control (n = 11) y tras la preincubación de los miocitos con el inhibidor del NBC S0859 (10 µM; n = 5). Los datos se expresan como el aumento en unidades de pH_i (ΔpH_i) con comparación con el minuto 0 de exposición a la solución hiperkalémica. * indica p < 0,05 *vs* control.

en forma aislada. La **Figura 2** muestra el promedio del cambio de pH_i en situación control y tras el agregado de S0589 (inhibidor selectivo del NBC, 10 ΩM). En presencia del inhibidor, el aumento de pH quedó totalmente abolido, mostrando que el NBC es el responsable de tal alcalinización. Una vez confirmado que el pulso de K+ era útil para estudiar al NBC, investigamos el efecto del a-L3 en la alcalinización generada por la despolarización, y lo comparamos con el efecto del suero sham. El anticuerpo dirigido selectivamente contra el NBC1 también previno totalmente la alcalinización, demostrando que la mencionada isoforma es el único mecanismo electrogénico activo en los miocitos ventriculares (**Figura 3**). Es importante notar que la alcalinización obtenida con el suero sham fue similar a la obtenida en situación control.

Consistentemente con estos resultados, Yamamoto y colaboradores no encontraron el ARNm del gen correspondiente al NBC4 en corazones de ratas Wistar[21]. También podría ocurrir que, a pesar de que el NBC4 esté expresado en corazón, no sea funcionalmente activo en condiciones fisiológicas, o que esté presente en células cardíacas diferentes a los miocitos ventriculares.

3. Participación del NBC1 en la recuperación del pH_i: pulsos de amonio

Ha sido demostrado que el NBC participa activamente en la recuperación de la acidosis tanto en miocitos ventriculares de rata[22,23], como de gato[6], siendo el único mecanismo activo cuando el NHE está inhibido. Con el objeto de investigar la participación diferencial de las isoformas del NBC en dicha recuperación se realizaron pulsos de amonio en solución de HCO_3^- burbujeado con O_2 95%/CO_2 5% en presencia continua de HOE 642 10

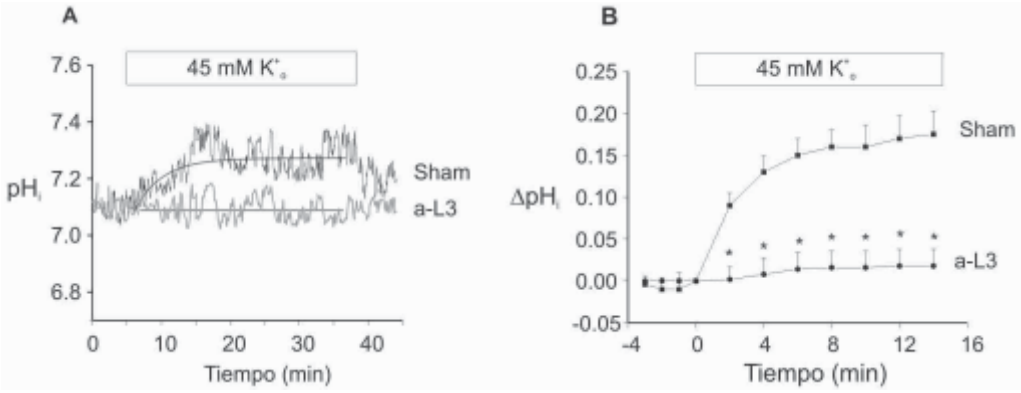

Figura 3. El NBC1 como único mecanismo electrogénico. **Panel A**: registros representativos del pulso de K^+ en miocitos preincubados con suero sham o con a-L3. **Panel B**: promedio del cambio de pH_i registrado durante los 14 minutos de exposición al alto K^+ en ausencia (suero sham dilución 1/500; n = 6) o presencia del a-L3 (dilución 1/500; n = 5). Los datos se expresan como el aumento en unidades de pH_i (ΔpH_i) en comparación con el minuto 0 de exposición a la solución hiperkalémica. * indica p < 0,05 *vs* sham.

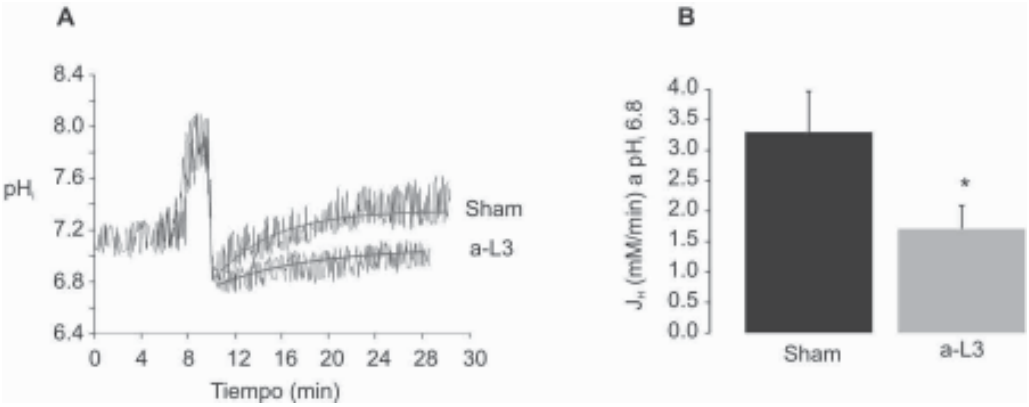

Figura 4. Relevancia del NBC1 en la actividad del NBC total. **Panel A**: registros representativos de pulsos de amonio realizados en un medio con bicarbonato en presencia continua de HOE 642 10 µM (inhibidor selectivo del NHE), en ausencia (suero sham) o presencia del a-L3. **Panel B**: promedio del J_H (mM/min) a pH_i 6,8 en miocitos preincubados con suero sham (dilución 1/500; n = 4) o con a-L3 (dilución 1/500, n = 4). * indica p < 0,05 *vs* sham.

ΩM (inhibidor selectivo del NHE). Como se puede apreciar en la **Figura 4**, el a-L3 disminuye aproximadamente un 50% la recuperación de la acidosis a pH_i 6,8 (J_H 3,3 ± 0,4 mmoles/min; n = 8 *vs* 1,71 ± 0,3 mmoles/min; n = 4*) permitiéndonos inferir con estos resultados que la isoforma electroneutra NBC3 y la electrogénica NBC1 participan en forma equivalente en la recuperación del pH_i.

4. Participación del NBC1 en el potencial de acción (PA): *patch-clamp*

Nuestro laboratorio ha demostrado que el NBC electrogénico (NBCe) contribuye a la configuración normal del potencial de acción tanto en miocitos de rata[13] como de gato[14]. En dichas investigaciones se comprobó la existencia de la corriente aniónica repolarizante generada por el NBCe, la cual se denominó I_{NBC}, y se demostró que el cambio de una solución de HEPES.sin bicarbonato a una solución con bicarbonato produce un acortamiento en la duración del potencial de acción cardíaco (DPAC) de aproximadamente el 20%, lo cual fue atribuido a dicha corriente.

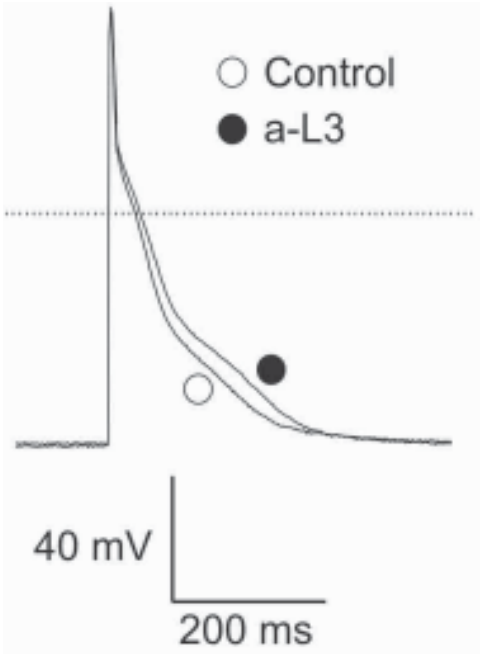

Figura 5. Importancia del NBC1 en la duración del potencial de acción. Trazos representativos de potenciales de acción registrados en un medio con bicarbonato, antes y después de exponer los miocitos al a-L3 (dilución 1/500). La línea punteada indica el potencial de membrana cuando su valor es de 9 mV.

En el presente trabajo evaluamos la participación del NBC1 en la configuración del PA. Se registró el PA en miocitos ventriculares en situación control y ante el agregado de a-L3 (dilución 1/500). Como se puede apreciar en el trazo representativo mostrado en la **Figura 5**, la preincubación de las células con a-L3 generó un alargamiento en la DPAC, consistente con el bloqueo del NBC1. En promedio, el a-L3 alargó la DPAC medida al 90% de la repolarización ($DPAC_{90}$; 12,5 ± 1,95%; n = 4). Con estos resultados, confirmamos la participación del NBCe en la configuración del PA reportada en los trabajos previamente publicados, y proponemos al NBC1 como el principal, si no el único, representante de la corriente llevada a cabo por el NBCe en los miocitos ventriculares.

DISCUSION

El principal hallazgo de este trabajo fue lograr el diseño y producción de anticuerpos específicos contra la isoforma electrogénica NBC1, que hicieron posible comenzar la investigación selectiva tanto de la expresión de la proteína en el tejido cardíaco, como de su participación en la fisiología de la célula cardíaca.

El uso de anticuerpos policlonales ya ha demostrado su utilidad tanto en el estudio de la estructura y forma molecular de los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- y del contrasportador Na^+/HCO_3^-, como de sus aspectos funcionales[24-26].

Aquí generamos un novedoso anticuerpo contra el dominio extracelular 3 de la isoforma electrogénica NBC1. Estos anticuerpos demostraron no sólo ser capaces de reconocer a la proteína en Western Blot, mostrando la presencia del cotransportador en tejido cardíaco de rata, sino también ser capaces de interferir con la función del cotransportador en su estado nativo, permitiendo así investigar la relevancia del NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca.

El NBC es, junto al NHE, el principal mecanismo alcalinizante de las células cardíacas[1-4,6]. La importancia de ambos transportadores en la fisiología celular ha sido posible gracias al descubrimiento y empleo de inhibidores específicos contra dichos transportadores. El conocimiento sobre el NHE es extenso debido a la existencia hace varios años de inhibidores selectivos, como el HOE 642 o cariporide[27,28], los cuales incluso han sido utilizados para prevenir el desarrollo de patologías cardíacas, como el daño por isquemia y reperfusión[29] o la hipertrofia cardíaca[30]. Por el contrario, los conocimientos sobre el NBC son menos extensos, debido a que sólo recién desde el año 2008 se cuenta con un inhibidor selectivo del contrasportador[15], que ya ha sido utilizado exitosamente en nuestro laboratorio, para inhibir completamente la actividad del NBC[6]. Sin embargo dicho bloqueante inhibe indistintamente a todas las isoformas del NBC, adquiriendo así gran importancia la posibilidad de contar con anticuerpos que selectivamente interfieran con la función de las isoformas del cotransportador, permitiendo su estudio de manera diferencial.

Los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran que el NBC1 es la única isoforma electrogénica activa en los miocitos ventriculares de rata Wistar, sugiriendo que los miocitos ventriculares no expresan el NBC4, o bien dicha isoforma no es activa en condiciones fisiológicas. Además, a pesar de que existen reportes que demuestran la presencia del NBC4 en tejido cardíaco[11,12], consistentemente con nuestros resultados, Yamamoto y colaboradores han puesto en duda la presencia del ARNm correspondiente al gen que codifica para el NBC4[21]. Por otro lado, también es posible que el NBC4 esté presente en el tejido cardíaco, pero en otro tipo celular, como ya ha sido propuesto para la isoforma electroneutra NBC3[31,32].

Nuestro laboratorio demostró que en un medio con bicarbonato, cuando el NHE está inhibido con HOE 642, el NBC es el único mecanismo alcalinizante activo, siendo la recuperación de la acidosis nula ante el agregado de SITS (inhibidor de los transportadores aniónicos) o S0859.[6] En el presente trabajo, los resultados obtenidos utilizando el a-L3 en los pulsos de amonio nos permitieron inferir que la isoforma electroneutra NBC3 y la electrogénica NBC1 participan de un modo equivalente en la recuperación de la acidosis en los corazones de ratas Wistar. Pensamos que sería importante contar con nuevos anticuerpos que interfieran selectivamente con la función del NBC3 para poder confirmar estos resultados.

En relación con el potencial de acción registrado en los miocitos ventriculares con el agregado de a-L3 utilizando la técnica de *patch-clamp*, los resultados obtenidos puntualizan aún más los datos mostrados por nuestro laboratorio sobre la relevancia del MBCe en la conformación del potencial de acción cardíaco[13,14], demostrando que la corriente generada por la isoforma NBC1 es la principal, sino la única, responsable del acortamiento en la duración del potencial de acción observada en los mencionados trabajos al cambiar de un medio HEPES-sin bicarbonato a una solución en presencia de dicho *buffer*.

Aunque el modo en que el a-L3 es capaz de interferir en la función del cotransportador no representó un objetivo del presente trabajo, algunas hipótesis serán formuladas. Está bien establecido que los derivados del estilbene, como el SITS y el DIDS se unen covalentemente a la primera lisina del dominio transmembrana 5, cercano al dominio extracelular 3 (EC3) en la mayoría de los transportadores de bicarbonato, incluidas todas las isoformas del NBC[33], por lo cual la interferencia de la mencionada región, ya sea con los derivados del estilbene como con el a-L3, parecería influir en el funcionamiento normal del cotransportador. Consistentemente, el uso de anticuerpos inhibidores contra el EC3 del AE3 han sido desarrollados y utilizados con éxito por investigadores del Centro de Investigaciones Cardiovasculares[26].

Se ha demostrado que el NBC1 forma homo y heterodímeros a través de uniones del tipo *puentes disulfuro* entre cuatro aminoácidos cisteína altamente conservados del EC3.[34] La unión del a-L3 podría impedir o romper dicha dimerización. Aunque, dado que la fuerza generada en dichas uniones es de carácter covalente, esta posibilidad parece poco probable. Por otro lado, tampoco está claro si la dimerización es un paso necesario para lograr un funcionamiento óptimo del cotransportador[33]. Finalmente, otra posibilidad a plantearse es que el EC3 constituya una zona autoestimulatoria propia del cotransportador y la unión del a-L3 interfiera con esta regulación, resultando ello en una inhibición de la actividad del NBC1. Con respecto a este punto no se conoce aún si el EC3 cumpliría dicha función, pero sí ha sido demostrada la existencia de regiones intracelulares autoestimulatorias, cuya regulación es capaz de modificar la actividad del contrasportador[33].

La existencia de una relación entre el NBC y las patologías cardíacas es, hasta el momento, poco concluyente. Se ha demostrado que el NBC se activa durante la etapa de reperfusión tras la isquemia[35-38], y que el daño generado durante dicha etapa puede ser disminuído por el bloqueo del NBC1[25], sugiriendo una participación negativa del NBC1 en esta condición.

Adicionalmente se ha demostrado la sobreexpresión del cotransportador en pacientes con insuficiencia cardíaca terminal, quienes mejoraron sus parámetros hemodinámicos tras el bloqueo del NBC1[25]. Estos trabajos apuntan a que el daño se generaría tras la sobrecarga de Na^+ secundario a la sobreactivación del NBC, activando al intercambiador Na^+/Ca^{++} en su forma reversa y aumentando finalmente la concentración de Ca^{++} intracelular. Pensamos que son necesarias más investigaciones ya que el NBC1 mostró tener un papel adicional en relación con el potencial de acción, y su bloqueo podría ser perjudicial, prolongando la DPAC y creando así una condición más propensa a la generación de arritmias. Recientemente, Yamamoto y colaboradores mostraron una mayor expresión y actividad de todas las isoformas del NBC en la hipertrofia cardíaca secundaria a coartación aórtica[21], pero en el mencionado trabajo no se pudo determinar si esto fue la causa o la consecuencia de la hipertrofia, ni tampoco discernir si, siendo la consecuencia, esto era perjudicial o intentaba contrarrestar el daño.

Por último, si bien la hipertensión arterial es una de las principales causas de hipertrofia cardíaca, nada se sabe, hasta el momento, sobre lo que sucede con el NBC en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), un conocido modelo de esta condición patológica.

El NBC tiene la particularidad de tener dos mecanismos de acción: uno electroneutro ($1Na^+$: $1HCO_3^-$; NBC3) y otro electrogénico ($1Na^+$: $2HCO_3^-$; NBC1). Esto no sólo es interesante al momento de clasificar al NBC sino también para plantear la importancia de su estudio diferencial, como dos transportadores independientes, con una regulación propia de cada isoforma[39] y una función diferencial de cada una, siendo el NBCn más relevante en referencia al ingreso de Na^+ a la célula en cada ciclo de funcionamiento, y teniendo el NBCe una participación relevante en la conformación del PA. Por lo antedicho, pensamos que es indispensable estudiar a dichas isoformas del NBC por separado, constituyendo así el empleo de anticuerpos selectivos para cada una de ellas una herramienta de gran utilidad para lograrlo, y en un futuro poder utilizar dichas sustancias con un fin terapéutico.

SUMMARY

INHIBITORY ANTIBODIES OF SODIUM/BICARBONATE HEART COTRANSPORTER

***Background**. The cardiac Na^+/HCO_3^- (NBC) is an important alkalinizing mechanism that regulates intracellular pH (pH_i) in cardiac cells. At least three isoforms of NBC have been identified in the heart: an electroneutral one (NBC3), which stoichiomestry is 1 Na^+/1 HCO_3^-, and two electrogenic isoforms (NBC1 and NBC4), which mediate the co-influx of two molecules of HCO_3^- per each Na^+. Since the electrogenic NBC generates an anionic repolarizing current, its proper function is relevant to control the shape and duration of action potential (AP).*

***Material and method**. In the present work we designed antibodies against the extracellular domain 3 of NBC1 (a-L3) in order to study the participation of this transporter in cardiac cell physiology, employing Wistar rat ventricular myocytes. We examined the total NBC activity during the recovery of pH_i induced by intracellular acidosis (*ammonium pulses; *H^+ flux [J_H] at pH_i 6.8 was determined), and the exclusive activity of the electrogenic NBC during membrane potential depolarization with high extracellular K^+ concentration (*K^+ pulses, *ΔpH_i, after 14 minutes in high K^+). * indicates $p < 0.05$ respect to control.*

***Results**. The a-L3 recognized the NBC1 protein in ventricular preparations. The high K^+ induced alkalinization was abolished in the presence of a-L3 (0.17 ± 0.02; n = 6 vs 0.02 ± 0.02; n = 5*). The a-L3 reduced the J_H (50%) during the recovery from acidosis (3.3 ± 0.4; n = 8 vs 1.71 ± 0.3; n = 4*). In patch-clamp experiments (perforated patch), the a-L3 prolonged the AP duration (12.5 ± 1.9% (n = 4), consistent with NBC1 inhibiton.*

***Conclusions**. NBC1 is the only functional electrogenic isoform present in rat ventricular myocytes and contributes to the recovery from acidosis in equivalent manner to the electroneutral isoform NBC3. In addition, the anionic current produced by NBC1 represents the main component of the repolarizing current carried by the electrogenic NBC. Finally, we suggest that the employment of a-L3 could be relevant in the differential function examination of the NBC isoforms in cardiac pathophysiology.*

***Keywords**: Cardiac myocytes. Intracellular pH. Sodium/bicarbonate cotransport.*

BIBLIOGRAFIA

1. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P: Intracellular pH regulation in heart. J Mol Cell Cardiol **2009**; 46: 318-331.
2. Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD: Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. J Physiol **1992**; 458: 361-384.
3. Camilion de Hurtado MC, Perez NG, Cingolani HE: An electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in the regulation of myocardial intracellular pH. J Mol Cell Cardiol **1995**; 27: 231-242.
4. Le Prigent K, Lagadic-Gossmann D, Mongodin E, Feuvray D: HCO3(-)-dependent alkalinizing transporter in adult rat ventricular myocytes: characterization and modulation. Am J Physiol **1997**; 273: H2596-2603.
5. Vaughan-Jones RD, Villafuerte FC, Swietach P, Yamamoto T, Rossini A, Spitzer KW: pH-regulated Na(+) influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na(+)-H(+) exchange and Na(+)-HCO co-transport. J Cardiovasc Electrophysiol **2006**; 17 (Suppl 1): S134-S140.
6. De Giusti VC, Garciarena CD, Aiello EA: Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac Na+/HCO3- cotransport. J Mol Cell Cardiol **2009**; 47: 716-722.
7. Soleimani M, Burnham CE: Physiologic and molecular aspects of the Na+:HCO3- cotransporter in health and disease processes. Kidney Int **2000**; 57: 371-384.
8. Choi I, Aalkjaer C, Boulpaep EL, Boron WF: An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel. Nature **2000**; 405: 571-575.
9. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF: Expres-

sion cloning and characterization of a renal electrogenic Na+/HCO3- cotransporter. Nature **1997**; 387: 409-413.
10. Choi I, Romero MF, Khandoudi N, Bril A, Boron WF: Cloning and characterization of a human electrogenic Na+-HCO-3 cotransporter isoform (hhNBC). Am J Physiol **1999**; 276: C576-584.
11. Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Lee I, Xu G, Kurtz I: Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. Biochim Biophys Acta **2000**; 1493: 215-218.
12. Virkki LV, Wilson DA, Vaughan-Jones RD, Boron WF: Functional characterization of human NBC4 as an electrogenic Na+-HCO cotransporter (NBCe2). Am J Physiol Cell Physiol **2002**; 282: C1278-1289.
13. Aiello EA, Petroff MG, Mattiazzi AR, Cingolani HE: Evidence for an electrogenic Na+-HCO3- symport in rat cardiac myocytes. J Physiol **1998**; 512: 137-148.
14. Villa-Abrille MC, Petroff MG, Aiello EA: The electrogenic Na+/HCO3- cotransport modulates resting membrane potential and action potential duration in cat ventricular myocytes. J Physiol **2007**; 578: 819-829.
15. Ch'en FF, Villafuerte FC, Swietach P, Cobden PM, Vaughan-Jones RD: S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart. Br J Pharmacol **2008**; 153: 972-982.
16. Alvarez BV, Loiselle FB, Supuran CT, Schwartz GJ, Casey JR: Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate cotransporter. Biochemistry **2003**; 42: 12321-12329.
17. Perez NG, Alvarez BV, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE: pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H+ exchanger. Circ Res **1995**; 77: 1192-1200.
18. Roos A, Boron WF: Intracellular pH. Physiol Rev **1981**; 61: 296-434.
19. Leem CH, Lagadic-Gossmann D, Vaughan-Jones RD: Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. J Physiol **1999**; 517: 159-180.
20. Zaniboni M, Swietach P, Rossini A, Yamamoto T, Spitzer KW, Vaughan-Jones RD: Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular myocytes from rat, rabbit, and guinea pig. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2003**; 285: H1236-1246.
21. Yamamoto T, Shirayama T, Sakatani T, et al: Enhanced activity of ventricular Na+-HCO3- cotransport in pressure overload hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2007**; 293: H1254-1264.
22. Baetz D, Haworth RS, Avkiran M, Feuvray D: The ERK pathway regulates Na(+)-HCO(3)(-) cotransport activity in adult rat cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2002**; 283: H2102-2109.
23. Kohout TA, Rogers TB: Angiotensin II activates the Na+/HCO3- symport through a phosphoinositide-independent mechanism in cardiac cells. J Biol Chem **1995**; 270: 20432-20438.
24. Puceat M, Roche S, Vassort G. Src family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes. J Cell Biol **1998**; 141: 1637-1646.
25. Khandoudi N, Albadine J, Robert P, et al: Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury. Cardiovasc Res **2001**; 52: 387-396.
26. Chiappe de Cingolani GE, Ennis IL, Morgan PE, Alvarez BV, Casey JR, Camilion de Hurtado MC: Involvement of AE3 isoform of Na(+)-independent Cl(-)/HCO(3) (-) exchanger in myocardial pH(i) recovery from intracellular alkalization. Life Sci **2006**; 78: 3018-3026.
27. Bountra C, Vaughan-Jones RD: Effect of intracellular and extracellular pH on contraction in isolated, mammalian cardiac muscle. J Physiol **1989**; 418: 163-187.
28. Harrison SM, Frampton JE, McCall E, Boyett MR, Orchard CH: Contraction and intracellular Ca2+, Na+, and H+ during acidosis in rat ventricular myocytes. Am J Physiol **1992**; 262: C348-357.
29. Scholz W, Albus U, Counillon L, et al: Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. Cardiovasc Res **1995**; 29: 260-268.
30. Cingolani HE, Ennis IL: Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. Circulation **2007**; 115: 1090-1100.
31. Damkier HH, Nielsen S, Praetorius J: An anti-NH2-terminal antibody localizes NBCn1 to heart endothelia and skeletal and vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2006**; 290: H172-180.
32. Boedtkjer E, Praetorius J, Fuchtbauer EM, Aalkjaer C: Antibody-independent localization of the electroneutral Na+-HCO3- cotransporter NBCn1 (slc4a7) in mice. Am J Physiol Cell Physiol **2008**; 294: C591-603.
33. Boron WF, Chen L, Parker MD: Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. J Exp Biol. **2009**; 212: 1697-1706.
34. Kao L, Sassani P, Azimov R, et al: Oligomeric structure and minimal functional unit of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1-A. J Biol Chem **2008**; 283: 26782-26794.
35. Doggrell SA, Hancox JC: Is timing everything? Therapeutic potential of modulators of cardiac Na(+) transporters. Expert Opin Investig Drugs **2003**;12:1123-1142.
36. Schafer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM: Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2000**; 278: H1457-1463.
37. Ten Hove M, Nederhoff MG, Van Echteld CJ: Relative contributions of Na+/H+ exchange and Na+/HCO3- cotransport to ischemic Nai+ overload in isolated rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2005**; 288: H287-292.
38. van Borren MM, Baartscheer A, Wilders R, Ravesloot JH: NHE-1 and NBC during pseudo-ischemia/reperfusion in rabbit ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol **2004**; 37: 567-577.
39. De Giusti VC, Orlowski A, Aiello EA: Angiotensin II inhibits the electrogenic Na+/HCO3- cotransport of cat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol **2010**; 49: 812-818.
40. Tang XB, Kovacs M, Sterling D, Casey JR: Identification of residues lining the translocation pore of human AE1, plasma membrane anion exchange protein. J Biol Chem **1999**; 274: 3557-3564.
41. Zhu Q, Lee DW, Casey JR: Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1. J Biol Chem **2003**; 278: 3112-3120.

Una pequeña inexactitud evita a veces toneladas de explicaciones.
H.H. MUNRO (SAKI)