



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**PAPEL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL TonEBP
EN EL DAÑO CARDIACO INDUCIDO POR
HIPEROSMOLARIDAD**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN FARMACOLOGÍA**

POR

MARIO CHIONG LAY

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Jorge Jalil Milad

Dr. Sergio Lavandero González

SANTIAGO - CHILE

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

MARIO MARTÍN CHIONG LAY

Ha sido aprobada por la comisión Informante de Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día ___ de Septiembre del 2009

Directores de Tesis

Dr. Jorge Jalil

Dr. Sergio Lavandero

Comisión Informante de tesis

Dr. Hernán Lara (Presidente)

Dra. Iлона Concha

Dr. Luis Michea

Dr. Juan Carlos Prieto

PUBLICACIONES

- Navarro P*, Chiong M*, Volkwein K, Moraga F, Ocaranza MP, Jalil JE, Lim SW, Kim JA, Kwon HM, Lavandero S. Osmotically-induced genes are controlled by the transcription factor TonEBP in cultured cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; **372**:326-30. *Ambos comparten la primera autoría del trabajo.
- Chiong M, Parra V, Eisner V, Ibarra C, Maldonado C, Criollo A, Quiroga C, Contreras A, Vicencio JM, Cea P, Bucarey JL, Molgó J, Jaimovich E, Hidalgo C, Kroemer G, Lavandero S. Parallel activation of Ca²⁺-induced survival and death pathways in cardiomyocytes by sorbitol-induced hyperosmotic stress. Enviado a publicación a J Biol Chem.
- Chiong M, Ocaranza MP, Jalil J, Lavandero S. Overexpression of TonEBP transcription factor does not protect cardiomyocytes to cell death induced by hyperosmotic stress. En preparación para ser enviado al *Biochem Biophys Res Commun.*

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Chiong M, Navarro P, Volkwein K, Moraga F, Apablaza F, Carreño JE, Ocaranza MP, Jalil J, Lim SW, Kim JA, Kwon HM, Lavandero S. El factor de transcripción osmoprotector TonEBP se activa en el corazón después de un infarto al miocardio. XLIV Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Viña del Mar. Chile. Diciembre 2007.
- Chiong M, Navarro P, Ocaranza MP, Jalil J, Kwon HM, Lavandero S. Participación del factor de transcripción TonEBP en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. XVIII Congreso ALF, XXX Reunión Anual Sociedad de Farmacología de Chile, XXIII Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, III Congreso Iberoamericano de Farmacología. Hotel Casino Enjoy, Coquimbo. Chile. Octubre 2008.

- Chiong M, Navarro P, Ocaranza MP, Jalil J, Kwon HM, Lavandero S. The tonicity-regulated transcription factor TonEBP is not involved in cardiomyocyte death induced by hyperosmotic stress. The Seventh International Cell Death Society Symposium on Targeting cell death pathways for human diseases. Shanghai Mega City. China. June 2008.
- Chiong M, Navarro P, Ocaranza MP, Jalil J, Kwon HM, Lavandero S. Participación de TonEBP en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Termas de Chillán. Chile. Septiembre 2009.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales del Centro FONDAP Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y fue financiada por los Proyectos FONDAP 15010006 y MECESUP UCH0802.

"Como el camino terreno está sembrado de espinas, Dios ha dado al hombre tres dones: la sonrisa, el sueño y la esperanza."

Immanuel Kant

*A Giugliana, Agustín,
Matías y Amanda, que son
mi sonrisa, mi sueño y mi
esperanza.*

AGRADECIMIENTOS

A Sergio Lavandero, ni tutor y amigo, por confiar en mí y darme todas las oportunidades. Estaré eternamente agradecido.

A Jorge Jalil y María Paz Ocaranza, por su constante apoyo y desinteresada ayuda durante la realización de esta tesis.

A Giugliana por estar siempre a mi lado y apoyarme incondicionalmente.

A los miembros de mi comisión Drs. Hernán Lara, Ilona Concha, Juan Carlos Prieto y Luis Michea, por sus sabios consejos y constante apoyo.

A Guillermo, Lorena y Fidel, por estar siempre apoyándome y haciéndome reír.

A Cecilia por su ayuda en el citómetro y a Ruth por ordenar todo nuestro desorden.

A todos los compañeros del Laboratorio por estar siempre a mi lado y hacerme sentirme muy feliz de ir a trabajar.

Y a todos los que hicieron posible que esta tesis fuese posible.....

ÍNDICE GENERAL

	Página
PUBLICACIONES.....	ii
PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	ii
FINANCIAMIENTO.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xviii
ABREVIATURAS.....	xxi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Apoptosis y necrosis en el corazón.....	1
1.2. Cambios osmóticos en el corazón.....	5
1.3. Regulación del volumen celular.....	7
1.4. El factor transcripcional TonEBP.....	8
1.5. TonEBP y estrés hiperosmótico.....	9
1.6. Otras funciones de TonEBP.....	12
1.7. Aldosa reductasa y TonEBP.....	13
1.8. Aldosa reductasa y enfermedades cardiovasculares.....	13
2. HIPÓTESIS.....	16
3. OBJETIVO GENERAL.....	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. Reactivos.....	17
5.2. Obtención y cultivo de cardiomiocitos.....	17
5.3. Obtención de extractos proteicos de células.....	18

5.4.	Determinación de proteínas.....	18
5.4.1.	Lowry	18
5.4.2.	Bradford	18
5.5.	Medición de los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca ²⁺	18
5.6.	Determinación de la depolarización mitocondrial	19
5.7.	Análisis de Western blot	19
5.8.	Inmunofluorescencia indirecta (IF)	19
5.9.	Determinación de viabilidad celular	20
5.9.1.	Ensayo por azul de tripán	20
5.9.2.	Incorporación de yoduro de propidio por citometría de flujo.....	20
5.10.	Determinación de apoptosis	21
5.10.1.	Fragmentación del DNA por electroforesis en agarosa	21
5.10.2.	Población subG1 por citometría de flujo.....	21
5.10.3.	Activación de caspasas	22
5.11.	Determinación necrosis por liberación de láctico deshidrogenasa.....	22
5.12.	Determinación de los niveles intracelulares de ATP	23
5.13.	Modelo de infarto al miocardio.....	23
5.14.	Obtención de extractos proteicos de corazón	24
5.15.	Obtención de los adenovirus TonEBP dominante negativo y silvestre.....	24
5.15.1.	Clonamiento de los genes que codifican para TonEBP dominante negativo y silvestre en un vector adenoviral.....	24
5.15.2.	Generación de los adenovirus recombinantes.....	25
5.15.3.	Amplificación de los adenovirus recombinantes	26
5.15.4.	Purificación de los adenovirus recombinantes por doble gradiente de CsCl	26
5.15.5.	Cuantificación de los adenovirus purificados.....	27
5.15.6.	Caracterización de los adenovirus recombinantes	27
5.16.	Transducción de los cardiomiocitos.....	27
5.17.	Transducción adenoviral <i>in vivo</i>	28
5.18.	Expresión de resultados y análisis estadístico	28
6.	RESULTADOS	29
6.1.	Caracterización de la muerte inducida por estrés hiperosmótico	29

6.1.1.	Efecto del estrés hiperosmótico sobre los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+}	29
6.1.2.	Efecto del estrés hiperosmótico sobre la depolarización de la membrana mitocondrial	30
6.1.3.	Estrés hiperosmótico y la activación de la apoptosis dependiente de caspasas.....	32
6.1.4.	Estrés hiperosmótico y colapso metabólico.....	32
6.1.5.	Participación del Ca^{2+} extracelular en la muerte inducida por estrés hiperosmótico	35
6.2.	Efecto de la isquemia sobre TonEBP	38
6.2.1.	Efecto del infarto al miocardio sobre los niveles proteicos de TonEBP.....	38
6.2.2.	Efecto de la isquemia / reperfusión simulada sobre los niveles proteicos de TonEBP y aldosa reductasa	39
6.3.	Efecto de TonEBP en la viabilidad de los cardiomiocitos	44
6.3.1	Fabricación de adenovirus que sobreexpresan TonEBP dominante negativo (dnTonEBP) y TonEBP silvestre (wtTonEBP).....	44
6.3.1.1.	Subclonamiento de los genes que codifican para dnTonEBP y wtTonEBP en un vector adenoviral	44
6.3.1.2.	Obtención de los adenovirus que sobreexpresan dnTonEBP (Ad dnTonEBP) y wtTonEBP (Ad wtTonEBP).....	47
6.3.1.3.	Sobreexpresión de dnTonEBP y wtTonEBP mediante transducción adenoviral en células HEK293 y cardiomiocitos en cultivo	49
6.3.2.	Evaluación de la funcionalidad de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP.....	53
6.3.2.1.	Efecto de la sobreexpresión adenoviral de dnTonEBP y wtTonEBP sobre los niveles de aldosa reductasa	53
6.3.2.2.	Efecto de los adenovirus Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la morfología del citoesqueleto de cardiomiocitos en cultivo	56
6.3.3.	Sobreexpresión de dnTonEBP y wtTonEBP y viabilidad celular	59
6.3.3.1	Efecto de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la viabilidad del cardiomiocito	59
6.3.3.2.	Efecto de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la apoptosis del cardiomiocito	61
6.3.3.3	Efecto de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la necrosis del cardiomiocito	63

6.3.4.	Mecanismos de inducción de muerte por sobreexpresión de wtTonEBP.....	65
6.3.4.1.	Efecto de la inhibición de aldosa reductasa sobre la muerte inducida por sobreexpresión de wtTonEBP	65
6.3.4.2	Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles intracelulares de ATP	65
6.3.5.	Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP <i>in vivo</i> mediante sobreexpresión adenoviral.....	68
6.4.	Sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP y protección frente al estrés hiperosmótico	71
6.4.1.	Efecto de los Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP sobre muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico	71
6.4.2.	Efecto de los Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP sobre la apoptosis y la necrosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.....	72
7.	DISCUSIÓN.....	77
7.1.	Mecanismo de muerte inducido por estrés hiperosmótico	77
7.1.1.	Participación del Ca ²⁺ en la muerte inducida por estrés hiperosmótico.....	77
7.1.2.	Muerte por apoptosis independiente de caspasas. Papel del colapso metabólico	79
7.2.	Activación de TonEBP por isquemia y reperfusión.....	81
7.3.	Sobreexpresión de TonEBP	84
7.4.	TonEBP y citoesqueleto	85
7.5.	Efecto de la sobreexpresión de TonEBP en la viabilidad celular	88
7.5.1.	Muerte celular mediada por sobreactivación de aldosa reductasa.....	88
7.5.2.	Muerte celular inducida por colapso metabólico.....	88
7.5.3.	Muerte celular mediada por el secuestro de proteínas que regulan muerte celular	89
7.5.4.	Muerte celular mediada por el factor de necrosis tumoral- α	90
7.6.	TonEBP como factor osmoprotector.....	91
7.7.	Función del TonEBP en el corazón	94
7.7.1.	TonEBP y su relación con la hipertrofia cardíaca	96
7.7.2.	Función de TonEBP en la migración y diferenciación de mioblastos durante la miogénesis.....	96

7.7.3.	TonEBP como regulador de la tonicidad funcional asociado al metabolismo cardíaco.....	97
8.	CONCLUSIONES	102
9.	REFERENCIAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis.	3
Figura 2. Vías de activación de la apoptosis.	4
Figura 3. Cambios osmóticos en los cardiomiocitos durante isquemia y reperfusión.	6
Figura 4. Vía de los polioles.	8
Figura 5. Diagrama esquemático de las proteínas de la familia Rel.	10
Figura 6. Evaluación de la muerte por apoptosis en cardiomiocitos mediante citometría de flujo.	22
Figura 7. El estrés hiperosmótico induce aumentos citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+} que promueven una depolarización mitocondrial.	31
Figura 8. Estrés hiperosmótico induce salida de la mitocondria de citocromo c, pero no del factor inductor de la apoptosis (AIF).	33
Figura 9. El estrés hiperosmótico induce activación de caspasas 3 y 9, pero no participan en la muerte inducida por sorbitol 600 mOsm.	34
Figura 10. El estrés hiperosmótico induce disminución de los niveles intracelulares de ATP.	35
Figura 11. El Ca^{2+} extracelular es relevante para la muerte inducida por estrés hiperosmótico.	37
Figura 12. Efecto del infarto al miocardio sobre los niveles de TonEBP y aldosa reductasa.	40
Figura 13. Efecto de 30 min de isquemia química y posterior reperfusión sobre los niveles de TonEBP, aldosa reductasa (AR), β -MHC y β -actina.	42
Figura 14. Efecto de 60 min de isquemia química y posterior reperfusión sobre los niveles de TonEBP, aldosa reductasa, β -MHC y β -actina.	43
Figura 15. Esquema de subclonamiento del gen que codifica para wtTonEBP en el vector adenoviral pDC32.	45
Figura 16. Esquema de subclonamiento del gen que codifica para dnTonEBP en el vector adenoviral PDC316.	46
Figura 17. Procedimiento empleado para la obtención de los adenovirus recombinantes Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP.	48
Figura 18. Obtención de adenovirus que sobreexpresa wtTonEBP.	50
Figura 19. Obtención de adenovirus que sobreexpresa dnTonEBP.	51
Figura 20. Sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP en cardiomiocitos de rata.	52

Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles de aldosa reductasa, β -actina y β -MHC en cardiomiocitos en condiciones basales.....	54
Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles de aldosa reductasa, β -actina y β -MHC en cardiomiocitos sometidos a estrés osmótico con sorbitol 600 mOsm.	55
Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la morfología de los cardiomiocitos de rata.	57
Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la morfología de los cardiomiocitos de rata sometidos a estrés hiperosmótico. .	58
Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la viabilidad de cardiomiocitos de rata.	60
Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la apoptosis de cardiomiocitos de rata.	62
Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la necrosis de cardiomiocitos de rata.	64
Figura 28. Efecto del inhibidor de aldosa reductasa zopolrestat, sobre la viabilidad de cardiomiocitos de rata transducidos con Ad wtTonEBP.	66
Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles intracelulares de ATP.....	67
Figura 30. Fotografías del ventrículo izquierdo de ratas sometidas a transducción intracardiaca con un adenovirus que sobreexpresa la proteína fluorescente verde (Ad GFP) vistos bajo microscopía de fluorescencia.	69
Figura 31. Efecto de la transducción cardiaca de Ad wtTonEBP, Ad dnTonEBP o Ad LacZ sobre la mortalidad y tamaño del corazón.....	70
Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la viabilidad de cardiomiocitos de rata sometidos a estrés osmótico.	73
Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la apoptosis de cardiomiocitos de rata sometidos a estrés osmótico.	75
Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la necrosis de cardiomiocitos de rata sometidos a estrés osmótico.	76
Figura 35. Modelo propuesto para la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico.....	82

Figura 36. Comparación de la reorganización de actina inducida por sobreexpresión de wtTonEBP con la inducido por insulina.....	87
Figura 37. Mecanismos propuestos para explicar la muerte inducida en los cardiomiocitos por sobreexpresión de TonEBP.	93
Figura 38. Potenciales funciones del factor transcripcional TonEBP en el tejido cardíaco no asociadas a la respuestas a cambios osmolares externos.	95
Figura 39. Contribuciones de las osmolaridades extracelulares e intracelulares a estrés hipertónico funcional.	100
Figura 40. Cambio en la concentración intracelular de ADP durante el ciclo cardíaco y a diferentes cargas de trabajo.....	101

RESUMEN

Papel del factor transcripcional TonEBP en el daño cardiaco inducido por hiperosmolaridad

TonEBP, la proteína que se une al elemento regulatorio que responde a tonicidad “TonE” es el único factor transcripcional conocido de eucariontes que responde a cambios de la osmolaridad extracelular. Este factor transcripcional pertenece a la familia Rel, al igual que NFAT1-5 y NFκB. TonEBP también se conoce como NFAT5 y se ha asociado al mecanismo de adaptación celular a condiciones de hiperosmolaridad, regulando la expresión de genes que codifican para aldosa reductasa y para los transportadores de taurina, mio-inositol y betaina. Todas estas proteínas regulan los niveles de osmolitos intracelulares compatibles asociados al control del volumen celular.

El corazón es un órgano que normalmente no está sujeto a cambios osmóticos excepto durante isquemia-reperfusión, coma diabético y shock séptico. La capacidad de regular el volumen celular se ha vinculado a la supervivencia celular en condiciones de estrés hiperosmótico. Por lo tanto, la capacidad de las células cardíacas de regular el volumen celular, podría ser un factor de supervivencia en patologías como el infarto al miocardio.

En nuestro Laboratorio, se describió previamente que TonEBP está presente en los cardiomiocitos y que responde al estrés hiperosmótico. Además, se demostró que el estrés hiperosmótico induce la masa y la actividad de aldosa reductasa con acumulación intracelular de sorbitol, y que la muerte inducida por estrés hiperosmótico es mediada por esta enzima. La activación de TonEBP induce un aumento de los niveles y actividad de aldosa reductasa que mediaría la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico. Sin embargo, ratones knock out para TonEBP muestran una severa atrofia de su médula renal, incremento de la sensibilidad de sus timocitos al estrés hiperosmótico e incremento de la fragmentación del DNA en células de la fibra del lente, indicando que TonEBP tendría un efecto protector frente al daño inducido por estrés hiperosmótico. Por lo tanto, de estos resultados se deduce que existiría una contradicción entre los datos descritos en la literatura y nuestros hallazgos sobre el papel de TonEBP en la supervivencia celular.

La hipótesis de la presente tesis es “TonEBP media la adaptación del cardiomiocito a la hiperosmolaridad generada por isquemia cardiaca”.

Los objetivos específicos son:

- Caracterizar el mecanismo de muerte inducida por estrés osmótico.

- Determinar si el factor de transcripción TonEBP se activa bajo condiciones de isquemia cardiaca *in vivo* e *in vitro*.
- Determinar el efecto directo de TonEBP en la viabilidad del cardiomiocito.
- Evaluar si TonEBP protege a los cardiomiocitos de la muerte inducida por hiperosmolaridad

Como modelo experimental se utilizaron cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas expuestos a estrés hiperosmótico en presencia y en ausencia de la sobreexpresión adenoviral de TonEBP tipo silvestre (wtTonEBP) o TonEBP dominante negativo (dnTonEBP). Además se utilizaron modelos experimentales de infarto al miocardio por ligación de la arteria coronaria descendente anterior y de sobreexpresión *in vivo* de wtTonEBP y dnTonEBP por transducción intracardiaca de adenovirus.

El estrés hiperosmótico indujo muerte de los cardiomiocitos por un mecanismo que involucra aumento entrada de Ca^{2+} a través de un canal de Ca^{2+} tipo L, aumento de los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+} , depolarización de la mitocondria y reducción de los niveles intracelulares de ATP. Además se detectó liberación de citocromo c pero no del factor inductor de apoptosis (AIF), desde la mitocondria, con activación secuencial de procaspasa 9 y procaspasa 3. Sin embargo, se determinó que la muerte de los cardiomiocitos inducida por sorbitol 600 mOsm correspondía a una apoptosis independiente de caspasas, ya que el pretratamiento con el inhibidor general de caspasas Z VAD fmk, no previno la muerte inducida por estrés hiperosmótico.

En un modelo de infarto al miocardio se detectó un aumento de los niveles proteicos de TonEBP en el sitio vecino al infarto a los 2 días post cirugía. Este mismo aumento se detectó en cultivos *in vitro* de cardiomiocitos sometidos a 30 o 60 min de isquemia simulada seguida de 4 u 8 h de reperfusión. Estos resultados sugieren que la isquemia induce a TonEBP.

Debido a que no existen inhibidores y/o activadores farmacológicos para TonEBP se construyeron adenovirus que sobreexpresaban wtTonEBP (Ad wtTonEBP) y dnTonEBP (Ad dnTonEBP). Determinando los niveles proteicos de aldosa reductasa, un blanco transcripcional de TonEBP, se demostró que ambos adenovirus eran funcionales en cardiomiocitos. Estos experimentos demostraron que la sobreexpresión de wtTonEBP aumentó los niveles proteicos de β -actina en forma dependiente de la dosis viral mientras que disminuyó los niveles de la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC). La sobreexpresión del dnTonEBP tuvo un efecto contrario al wtTonEBP en los niveles proteicos de β -actina y β -MHC. El aumento de los niveles proteicos de β -actina inducida

por la sobreexpresión de wtTonEBP se acompañó de una reorganización del citoesqueleto de actina, visualizada por inmunocitoquímica usando faloidina-rodamina.

La sobreexpresión de wtTonEBP, pero no de dnTonEBP, indujo muerte de los cardiomiocitos, principalmente por necrosis. Los niveles de necrosis dependieron del nivel de sobreexpresión de wtTonEBP y del tiempo de transducción adenoviral. La transducción adenoviral por inoculación intracardíaca de Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP mostró que Ad dnTonEBP indujo mortalidad en 3 de los 8 animales transducidos, efecto que no se detectó en ratas transducidas con Ad wtTonEBP y Ad LacZ (control). Este resultado sugiere que TonEBP cumpliría alguna función importante en el corazón.

Utilizando una multiplicidad de infección de 1000, dosis viral que no inducía muerte celular, se mostró que la sobreexpresión de tanto de wtTonEBP como del dnTonEBP no protegieron a los cardiomiocitos de la muerte inducida por estrés hiperosmótico. La sobreexpresión de ambas proteínas tampoco indujo un cambio en el mecanismo de muerte, apoptosis o necrosis, inducida por estrés hiperosmótico. Se determinó que la muerte inducida por sobreexpresión de wtTonEBP no dependía de la sobreactivación de aldosa reductasa, ya que un inhibidor específico de aldosa reductasa, zopolrestat, no atenuó la muerte inducida por Ad wtTonEBP. Esta muerte tampoco se asemejó al colapso metabólico detectado al someter a los cardiomiocitos a sorbitol 600 mOsm, ya que no se observó disminución de los niveles intracelulares de ATP.

Finalmente, los datos obtenidos en esta tesis permiten concluir que el infarto o la isquemia/reperfusión *in vitro* induce a TonEBP, pero la sobreexpresión de este factor transcripción no está asociada con la protección de los cardiomiocitos al estrés hiperosmótico, sino más bien es un inductor de muerte celular por necrosis.

ABSTRACT

Role of TonEBP transcription factor on hyperosmolarity-induced cardiac injury

The tonicity-responsive regulatory element "TonE" binding protein (TonEBP) is the only eukaryotic transcriptional factor known that responds to extracellular osmotic changes. This transcriptional factor belongs to the Rel family, which comprises NFAT1-5 and NFκB proteins. TonEBP, also known as NFAT5, has been associated to hyperosmolarity adaptation mechanisms by transcriptional regulation of aldose reductase and taurine, mio-inositol and betaine transporters genes. All these proteins increase compatible intracellular osmolyte levels which control cell volume.

The heart is an organ that is not normally exposed to osmotic changes, except during ischemia-reperfusion, diabetic coma and septic shock. The capacity to regulate cell volume has been associated to cell survival upon hyperosmotic stress. Therefore, the capacity of heart cells to regulate cell volume could be an important survival factor in pathologies such as myocardial infarct.

Our Laboratory has previously shown that TonEBP is present in cardiomyocytes and responds to hyperosmotic stress. Moreover, hyperosmotic stress induces aldose reductase protein level and activity with intracellular accumulation of sorbitol as well as cell death mediated by aldose reductase activity. Therefore, TonEBP activation would increase aldose reductase levels and activity that could mediate hyperosmotic stress induced cardiomyocyte death. However, TonEBP knockout mice showed severe renal medulla atrophy, increment of thymocyte sensibility to hyperosmotic stress and fiber cell elongation defect associated with increased DNA breaks in lens, indicating that TonEBP would have protective effects against hyperosmotic stress induced injuries. Therefore, a contradiction exists between the literature and our findings on TonEBP osmoprotective effects.

The hypothesis of the present thesis is "TonEBP mediates cardiomyocyte adaptation to hyperosmolarity induced by ischemia".

The specific objectives are:

- To characterize the cardiomyocyte death mechanism induced by osmotic stress.
- To determine whether TonEBP transcription factor is activated during *in vivo* and *in vitro* cardiac ischemia conditions.
- To determine the direct effect of TonEBP on cardiomyocyte viability

- To evaluate whether TonEBP protects cardiomyocytes upon hyperosmotic stress induced cell death.

As experimental model, cultured neonatal rat cardiomyocytes were exposed to hyperosmotic stress by sorbitol (600 mOsm) in the presence or absence of adenoviral overexpression of wild type TonEBP (wtTonEBP) or dominant negative TonEBP (dnTonEBP). Moreover, *in vivo* experimental models of myocardial infarction obtained by anterior descending coronary artery ligation and wtTonEBP or dnTonEBP cardiac overexpression by intracardiac adenoviral transduction were also used.

Hyperosmotic stress induced cardiomyocyte death by a mechanism involving increase of Ca^{2+} influx through a L-type Ca^{2+} channel, increase in cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} levels, mitochondrial depolarization and ATP intracellular level decrease. Moreover, mitochondrial cytochrome c, but not apoptosis inducing factor (AIF), release was detected, with a sequential activation of procaspases 9 and 3. However, sorbitol 600 mOsm induced cardiomyocyte death by a caspase-independent apoptosis mechanism, since pretreatment with the general caspase inhibitor Z VAD fmK, did not prevent hyperosmotic stress induced cell death.

In a model of myocardial infarction, TonEBP protein level was increased in the vicinity of infarct site at day 2 post surgery. This increase was also detected in *in vitro* cardiomyocyte cultures submitted to 30 or 60 min of simulated ischemia followed by 4 or 8 h of reperfusion. This result suggests TonEBP is induced by ischemia.

Because pharmacological TonEBP inhibitors and/or activators are not available, adenovirus overexpressing wtTonEBP (Ad wtTonEBP) and dnTonEBP (Ad dnTonEBP) were constructed. The functionality of both adenoviruses in cardiomyocytes was verified by aldose reductase protein levels, a TonEBP transcriptional gene target. In these experiments, increase on β -actin and decrease on β -myosin heavy chain (β -MHC) protein levels were observed in a wtTonEBP overexpression-dependent manner. Adenoviral dnTonEBP overexpression had an opposite effect to that observed with wtTonEBP on β -actin and β -MHC protein levels. wtTonEBP induced β -actin protein level increase was also accompanied by an actin cytoskeleton reorganization, visualized by using phalloidin-rhodamine immunocytochemistry.

wtTonEBP, but not dnTonEBP overexpression induced cardiomyocyte death mainly by necrosis. Necrosis levels were directly dependent on wtTonEBP protein overexpression levels and on adenoviral transduction time. *In vivo* intracardiac adenoviral transductions using Ad wtTonEBP and Ad dnTonEBP showed that Ad dnTonEBP induced

death in 3 of the 8 transduced animals. However, this effect was not detected in rats transduced with Ad wtTonEBP and Ad LacZ (control). This result suggests that TonEBP would be responsible of some important function in the heart.

wtTonEBP and dnTonEBP overexpression by utilizing a multiplicity of infection of 1000, a viral dose that did not induce cell death, did not protect cardiomyocytes from hyperosmotic stress induced cell death. Moreover, the overexpression of both proteins also did not change the cell death mechanism, apoptosis or necrosis, induced by hyperosmotic stress. Cardiomyocyte death induced by wtTonEBP was not depend on aldose reductase overactivation, since the aldose reductase specific inhibitor zopolrestat, did not reduce Ad wtTonEBP induced cardiomyocyte death. Because a decrease on ATP intracellular level was not observed, this cell death was not dependent on metabolic collapse and therefore was different to those observed with sorbitol 600 mOsm.

Finally, the data obtained allow us to conclude that TonEBP is induced by myocardial infarction or by *in vitro* ischemia/reperfusion, but overexpression of this factor transcription was not associated with cardiomyocyte protection to hyperosmotic stress, but is an inductor of cell death by necrosis.

ABREVIATURAS

Ad dnTonEBP	= Adenovirus que sobreexpresa dn TonEBP
Ad GFP	= Adenovirus que sobreexpresa GFP
Ad LacZ	= Adenovirus que sobreexpresa β -galactosidasa
Ad wtTonEBP	= Adenovirus que sobreexpresa wtTonEBP
ADP	= Adenosina difosfato
AED	= Dominio de exportación auxiliar
AIF	= Factor inductor de apoptosis
ANK	= Ankirina
AR	= Aldosa reductasa
ATM	= Ataxia telangiectasia mutada
ATP	= Adenosina trifosfato
β -MHC	= Cadena pesada de la β -miosina
BSA	= Seroalbúmina de bovino
CICR	= Liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+}
CK	= Creatina kinasa
Cr	= Creatina
DMEM	= Medio Dulbecco modificado de Eagle
dnTonEBP	= TonEBP dominante negativo
DTT	= Ditioneitol
EDTA	= Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	= Ácido etilén glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
FasL	= Fas ligando
FBS	= Suero fetal bovino
FITC	= Fluoresceína isotiocianato
GFP	= Proteína fluorescente verde
hnRNP	= Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HEPES	= Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HNE	= 4-hidroxinonenal
HSP90	= Proteína de estrés térmico 90
IAM	= Infarto agudo al miocardio
kDa	= Kilo dalton
LDH	= Láctico deshidrogenasa
MM	= Masa molecular

MOI	= Multiplicidad de infección
mOsm	= Miliosmoles por kilogramo de agua
MPTP	= Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
mRNA	= RNA mensajero
NADH	= Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NES	= Señal de exportación nuclear
NFAT	= Factor nuclear de células T activadas
NLS	= Secuencia de localización nuclear
PARP-1	= Poli(ADP-ribosa) polimerasa-1
pb	= Pares de bases
PBS	= amortiguador fosfato salino
PCr	= Fosfocreatina
PI	= Yoduro de propidio
PKA	= Proteína kinasa A
PMSF	= Fenilmetanosulfonil fluoruro
RHR	= Región de homología a Rel
RNAsa	= Ribonucleasa
rpm	= Revoluciones por minuto
RVD	= Disminución regulada del volumen
RVI	= Aumento regulado del volumen
SDH	= Sorbitol deshidrogenasa
SDS	= Dodecil sulfato de sodio
SEM	= Error estándar medio
SI	= Sitio del infarto
snRNP	= Ribonucleoproteína pequeña nuclear
Sor	= Sorbitol
SVI	= Sitio vecino al infarto
TNF- α	= Factor de necrosis tumoral α
TNF-R1	= Receptor para el factor de necrosis tumoral tipo 1
TAD	= Dominio de transactivación
VI	= Ventrículo izquierdo
VMSC	= Células musculares vasculares lisas
wtTonEBP	= TonEBP tipo silvestre
Zop	= Zopolrestat

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares, entre las que se incluyen a las patologías coronarias, el infarto al miocardio, los accidentes cerebrovasculares, la insuficiencia cardíaca, etc., representan, en su conjunto, la principal causa de morbimortalidad en nuestro país y en los países industrializados (1,2). Estas enfermedades producen un deterioro importante en la calidad y expectativa de vida de los pacientes, en especial en la población anciana (3). Los cambios demográficos muestran que la participación de este grupo etario en la población total se ha incrementado significativamente y se espera que lo siga haciendo en las décadas venideras. Aunque existen progresos importantes, debido a la introducción tanto de nuevas técnicas diagnósticas como el empleo de novedosos fármacos y estrategias de tratamiento (4), éstos todavía son insuficientes e ineficaces dado que desconocemos una parte importante de los mecanismos moleculares responsables de la génesis y desarrollo de estas patologías.

El corazón es una bomba mecánica compuesta principalmente por cardiomiocitos y fibroblastos, constituyendo el 33 y 66% del total de células cardíacas, respectivamente (5). Los cardiomiocitos, protagonistas en el proceso de contracción, son células terminalmente diferenciadas que cesan de dividirse casi inmediatamente después del nacimiento, permaneciendo por el resto de su existencia en un estado de detención del ciclo celular (6,7). Esta natural restricción tiene por consecuencia una pérdida en su capacidad de regeneración y hace al corazón un órgano particularmente vulnerable a eventos isquémicos, tóxicos e inflamatorios. Las cardiomiopatías, ya sean de origen isquémico o no isquémico, se caracterizan por una pérdida progresiva de cardiomiocitos (8-10). La muerte de los cardiomiocitos es, entonces, un evento importante en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca y se observa después del daño cardíaco producido por isquemia y reperfusión (11), infarto al miocardio (12), arritmia ventricular (13) y embolia coronaria (14).

1.1. Apoptosis y necrosis en el corazón

En el corazón de pacientes insuficientes se ha descrito que las células cardíacas mueren utilizando diferentes formas de muerte celular (15). Históricamente, la apoptosis y la necrosis han sido consideradas como las dos formas fundamentales de muerte celular. El término necrosis se ha usado por más de 200 años para definir los drásticos cambios en tejidos, visibles a simple vista. La necrosis es un proceso de muerte no controlado

genéticamente, caracterizado por depleción de los niveles intracelulares de ATP, aumento del volumen celular y pérdida de la integridad de la membrana plasmática, produciendo la liberación de los componentes celulares y desarrollo de inflamación (16).

La apoptosis o muerte celular programada tipo I, en cambio, es un proceso dependiente de energía y por el cual las células mueren a través de un proceso secuencial, ordenado y finamente regulado. A diferencia de lo observado en las células necróticas, las células apoptóticas mantienen íntegra su membrana plasmática, evitando así el vaciamiento del contenido intracelular y el desarrollo de un proceso inflamatorio (17). Este tipo de muerte se caracteriza morfológicamente por compactación de la cromatina, condensación del citoplasma y disminución del volumen celular, seguido de una fragmentación del núcleo y la célula y una rápida fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células del sistema inmune o vecinas, en ausencia de inflamación (Figura 1) (18).

Los estímulos inductores de apoptosis en el cardiomiocito son diversos, entre los que se cuentan los radicales libres derivados del oxígeno, isquemia y reperfusión, factores de crecimiento, ciertas citoquinas específicas (Fas-ligando y TNF α), estrés mecánico inducido por estiramiento, osmolaridad, fármacos antineoplásicos (doxorrubicina), metabolitos derivados de esfingolípidos (ceramida) y péptidos vasoactivos como angiotensina II (11,19-24). La activación de la apoptosis ocurre principalmente por dos vías transduccionales independientes que, dependiendo del estímulo, pueden interconectarse (25,26). Estas son conocidas como la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis (25-27).

La vía extrínseca es activada por ligandos externos que se unen a receptores de muerte localizados en la superficie del cardiomiocito. Fas, también conocido como APO-1/CD95, y el receptor para el factor de necrosis tumoral tipo 1 (TNF-R1) son los prototipos de esta clase de receptores. Una vez activados, a través de los “dominios de muerte” reclutan y activan proteasas intracelulares específicas conocidas como caspasas iniciadoras (25-27). La unión del Fas ligando (FasL) o del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) a sus receptores, conduce a la activación de la caspasa-8 (Figura 2). La activación de esta proteasa gatilla una cascada proteolítica que conduce finalmente a la activación de la caspasa-3, ejecutora final del autodesmantelamiento celular (25-27).

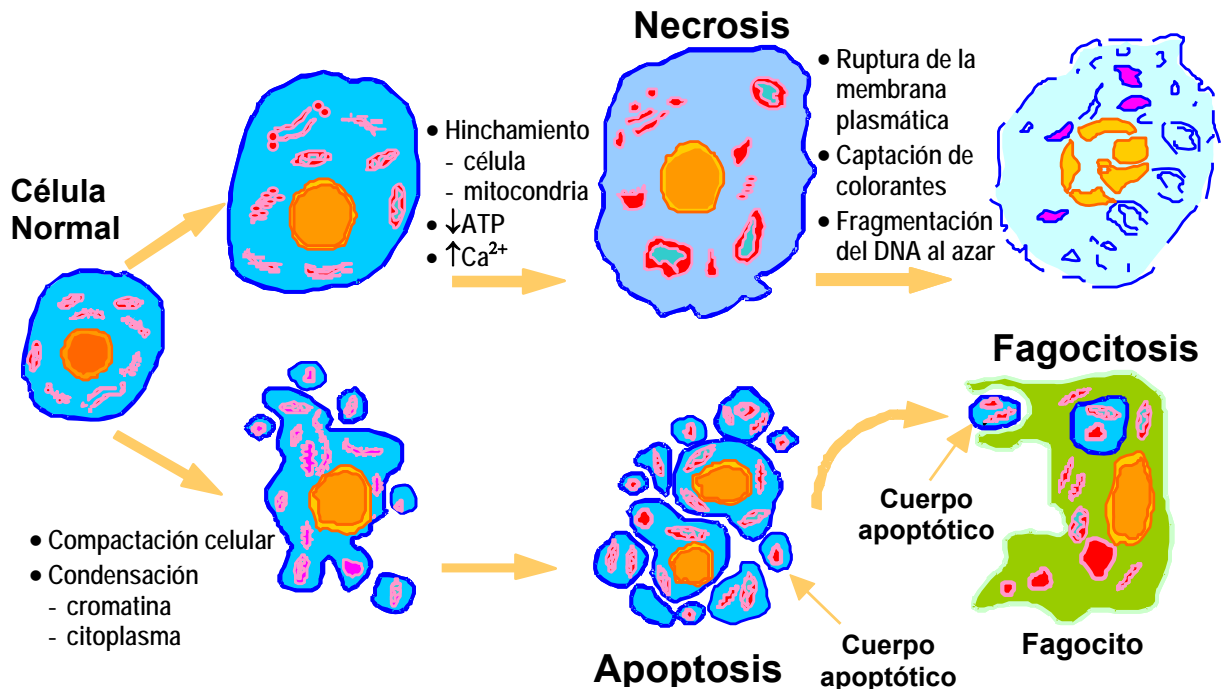


Figura 1. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis.

Las células normales pueden morir a través de necrosis o apoptosis. El proceso necrótico implica básicamente un hinchamiento celular con ruptura y vaciamiento del contenido citoplasmático al entorno. Esto genera un proceso inflamatorio en el sitio de la necrosis. El proceso apoptótico se caracteriza por una compactación celular, con fragmentación celular formando cuerpos apoptóticos, manteniendo la estructura de la membrana plasmática intacta. Este proceso es programado genéticamente y requiere de ATP. Los restos celulares son fagocitados por macrófagos o células vecinas sin originar un proceso inflamatorio.

La vía intrínseca o mitocondrial se caracteriza por una alteración de la integridad de las membranas mitocondriales externa e interna debido a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP, un gran canal no selectivo ubicado en la membrana externa mitocondrial), pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma celular, tales como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y las proteínas Smac/Diablo (25-27). El citocromo c liberado de la mitocondria forma el apoptosoma, un complejo integrado por la procaspasa-9 y su cofactor APAF-1. En presencia de ATP, se activan secuencialmente el apoptosoma, la caspasa-9 y la caspasa-3 (25,26,28) (Figura 2).

Las proteínas de la familia Bcl-2 son importantes reguladoras de la apoptosis a nivel de la mitocondria, controlando la integridad de su membrana. Se subdividen en tres subfamilias, una antiapoptótica y las otras dos proapoptóticas. Algunas proteínas Bcl-2 se

asocian con proteínas del poro MPTP y regulan la liberación del citocromo c. Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 se asocian y neutralizan entre sí, de manera que el balance relativo de estos efectores determina la decisión entre la vida y la muerte celular (Figura 2) (29-31). En el cardiomiocito, algunas proteínas Bcl-2 son reguladas a nivel transcripcional, mientras que otras se modulan post-transduccionalmente ya sea por fosforilación, degradación o cambios en su distribución subcelular (25).

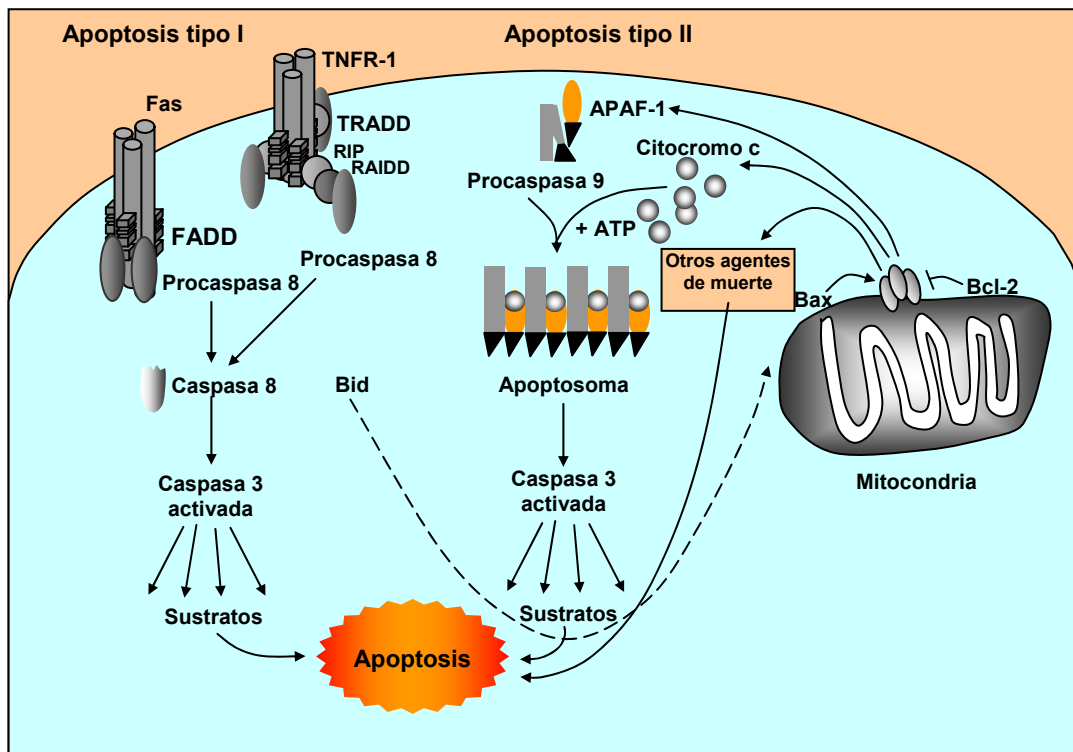


Figura 2. Vías de activación de la apoptosis.

La apoptosis es activada principalmente por dos vías: la de tipo I, conocida también como vía extrínseca o mediada a través de receptores de muerte; y la de tipo II, conocida también como extrínseca o mitocondrial. Aunque la activación de las dos vías es diferente, ambas convergen en un único evento final, la activación de la caspasa 3.

La caspasa-3 y otras caspasas ejecutoras activan DNAsas endógenas tales como el factor de fragmentación del DNA (DFF40), la DNasa activada por caspasa (CAD) y NUC70. Estas DNAsas cortan la región internucleosomal del DNA de doble hebra, generando fragmentos de DNA de 180-200 pares de bases (pb) (32).

Finalmente, las células apoptóticas se desmantelan formando cuerpos apoptóticos, típicamente esféricas u ovals, extremadamente variables en tamaño que están dispersos en los espacios intercelulares. Debido a que los cuerpos están rodeados por membrana, ellos no atraen a neutrófilos. Una característica importante de la apoptosis es que ella induce muerte celular sin inflamación. La membrana plasmática de cualquier célula normal se caracteriza por estar formada por una bicapa lipídica asimétrica, en la que el contenido de fosfatidilserina es mayor en la cara interna que la externa. Esta desigual distribución de este fosfolípido se invierte en las células apoptóticas y ellas constituyen señales de reconocimiento para que los fagocitos las remuevan en forma rápida y eficiente, sin liberar los contenidos celulares potencialmente tóxicos (17,32).

1.2. Cambios osmóticos en el corazón

Nuestro Laboratorio ha descrito que el estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) induce en los cardiomiocitos una muerte por apoptosis más rápida y potente que aquella inducida por doxorubicina y angiotensina II (33,34). Normalmente el corazón no se encuentra sometido a estrés hiperosmótico ya que la composición de la sangre que lo irriga es muy constante y altamente regulada (35). A pesar del hecho que este tipo de estrés no ocurre normalmente bajo condiciones fisiológicas, se ha descrito que las células cardíacas, y en particular los cardiomiocitos, poseen mecanismos para restaurar el volumen celular en condiciones de estrés osmótico (36,37). Sin embargo, en estados patológicos se ha descrito la existencia de cambios osmóticos, por ejemplo durante isquemia/reperfusión, shock séptico y coma diabético (35,37-39).

El incremento de la tonicidad del tejido cardíaco durante la isquemia miocárdica se ha atribuido al aumento del número de moléculas intracelulares debido a la hidrólisis de ATP, ADP, creatina fosfato y de macromoléculas como glicógeno y ácidos grasos (40). El aumento de la tonicidad intracelular estimula la entrada de agua y salida de metabolitos al medio extracelular incrementado la tonicidad extracelular. Después de 60 min de isquemia miocárdica la tonicidad aumenta entre 50 a 60 mOsm en la zona isquémica (38) con aumentos variables y discretos del volumen de los cardiomiocitos (Figura 3) (38,41,42).

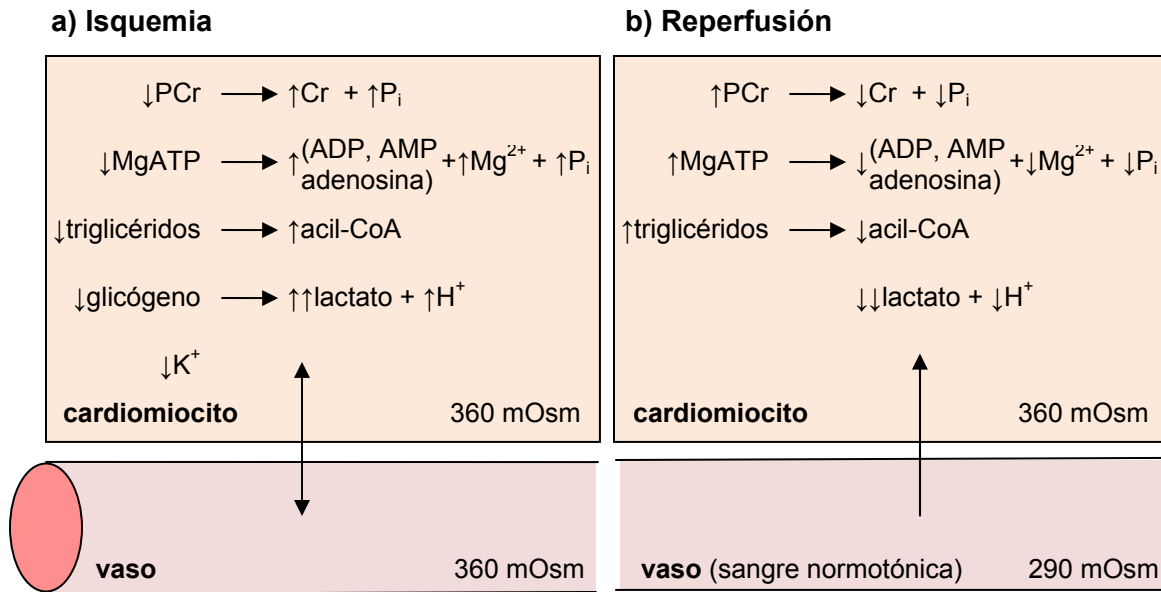


Figura 3. Cambios osmóticos en los cardiomiocitos durante isquemia y reperfusión.

a) La osmolaridad en el tejido cardiaco aumenta durante la isquemia debido a la acumulación de metabolitos tales como Cr (creatina), P_i (fosfato), nucleótidos de adenina, acil-CoA y lactato. La osmolaridad intracelular se equilibra con el extracelular alcanzando los 360 mOsm (38). b) Durante la reperfusión la sangre normotónica lava el medio extracelular hipertónico, entra agua a la célula hipertónica, y en los primeros minutos hay resíntesis de PCr (fosfocreatina), ATP y triglicéridos. Figura reproducida de la referencia (40).

Sin embargo, durante la reperfusión se observa un aumento explosivo en el volumen de los cardiomiocitos (43). La reperfusión del miocardio isquémico con medio extracelular “normotónico” lava el medio extracelular hipertónico, mientras que el interior de las células continúa hipertónico. De esta manera se crea una gradiente de tonicidad que impulsa la entrada masiva de agua al interior de los cardiomiocitos. Este hinchamiento celular inducido por la reperfusión está asociado con la formación de “blebs” y la ruptura de las membranas del sarcolema (42,44). En nuestro Laboratorio hemos observado que la reducción en 60 mOsm en el medio de mantención de cardiomiocitos en cultivo induce un 40% de muerte y genera blebs necróticos (36). El daño generado por la reperfusión de corazones isquémicos es atenuado cuando estos se reperfunden con medios hipertónicos, impidiendo que ocurra el desbalance osmótico (38,43,45,46). Los

corazones isquémicos reperfundidos con soluciones hipertónicas tienen mejor recuperación de la función cardíaca (38,43,45,46). Por lo tanto, la capacidad de las células para regular su volumen puede ser crucial para su supervivencia (38,39). De esta manera la regulación del volumen celular en el corazón es un campo emergente, y que puede tener grandes implicancias en el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares.

1.3. Regulación del volumen celular

Con el fin de evitar alteraciones en el volumen, las células han desarrollado mecanismos que le permiten regular su volumen. Estos mecanismos involucran inicialmente el transporte de iones a través de la membrana y posteriormente modificaciones en el metabolismo (47). La capacidad de las células para adaptarse al cambio osmótico es proporcional a su resistencia a la muerte después de un shock osmótico (48).

La regulación rápida del volumen celular ocurre principalmente a través del flujo de agua dependiente de la entrada de NaCl y la salida de KCl. Cuando ocurre un encogimiento osmótico celular, las células activan un mecanismo denominado “aumento regulado del volumen” (RVI), donde ingresa NaCl por los transportadores Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y los co-transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ o Na^+/Cl^- . Por el contrario, cuando ocurre hinchamiento osmótico celular, se activa el mecanismo “disminución regulada del volumen” (RVD) mediada por la salida de KCl dependiente de la activación de los canales de K^+ y Cl^- , del co-transportador K^+/Cl^- y del anti-transportador de K^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (49).

Cuando el estímulo osmótico persiste, las células se adaptan a la hipertonidad del medio, reemplazando gradualmente los electrolitos por osmolitos compatibles, tales como sorbitol, betaina y mio-inositol (50). La acumulación de osmolitos compatibles ocurre por un aumento en la expresión del gen para aldosa reductasa (AR, EC 1.1.1.21), enzima marcadora de la vía de los polioles responsable de la síntesis del sorbitol intracelular, y de los genes que codifican para los transportadores específicos de betaina y mio-inositol, betaina/ácido γ -aminobutírico (BGT-1) y mio-inositol dependiente de Na^+ (SMIT) (50-53). La vía de los polioles está formada por dos enzimas: AR, que es responsable de la reducción de glucosa a sorbitol con la consiguiente oxidación de NADPH, y sorbitol deshidrogenasa (SDH), que transforma el sorbitol a fructosa junto con la reducción de NAD^+ (Figura 4) (52).

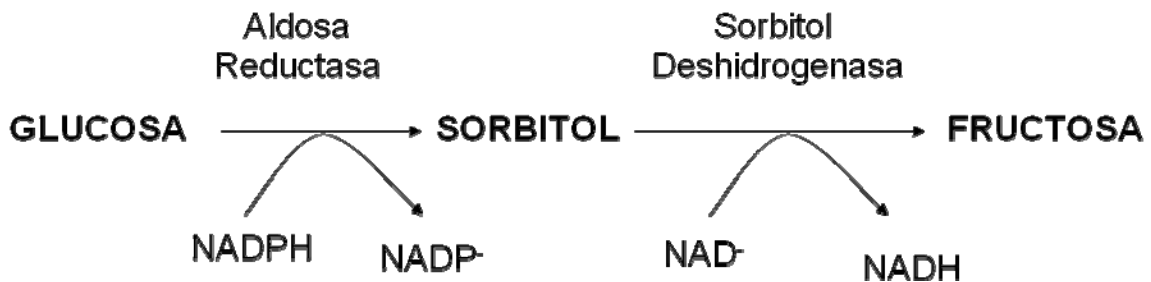


Figura 4. Vía de los polioles.

La vía de los polioles está compuesta por la aldosa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH). La AR cataliza la transformación de glucosa a sorbitol utilizando NADPH como cofactor. La SDH cataliza la transformación de sorbitol a fructosa utilizando NAD⁻ como cofactor. En condiciones de hiperosmolaridad existe un aumento de la actividad de la AR con disminución simultánea de la actividad de la SDH, produciéndose una acumulación intracelular de sorbitol. Al restablecerse la osmolaridad extracelular, se activaría la SDH, disminuyendo los niveles intracelulares de sorbitol.

1.4. El factor transcripcional TonEBP

La regulación de los genes por osmolaridad es mediada por la presencia del elemento de respuesta osmótica ORE (“Osmotic Response Element”) o TonE (“Tonicity-responsive Enhancer”) en sus promotores (54). El factor transcripcional que se une a ORE/TonE se conoce como OREBP/TonEBP o NFAT5 que pertenece a la familia rel/NFκB/NFAT y hasta la fecha representa el único factor transcripcional de eucariontes que se activa en respuesta a hipertonicidad (55-59).

Las proteínas de la familia Rel comparten una región de homología a Rel (RHR) estructuralmente conservada. El sitio de unión al DNA se ubica en el dominio RHR-N y el dominio de dimerización se localiza en el dominio RHR-C (Figura 5) (60). La familia NFκB está compuesta por 5 miembros. p65 (RelA) y cRel tienen 551 y 619 aminoácidos, respectivamente, tienen regiones N-terminales cortas y sus dominios de transactivación (TAD) están localizados en la región C-terminal; Rel B tiene 557 aminoácidos y sus TAD están localizados en sus extremos N- y C- terminales. p100/p52 y p105/p50 tienen 898 y 969 aminoácidos, respectivamente, y tienen repeticiones de ankirina (ANK) en sus dominios C-terminales. Sus formas activas p52 y p50 se producen por proteólisis en la región C-terminal (lugar indicado con una flecha en la Figura 5). Las subunidades NFκB

dimerizan a través de sus dominios RHR-C, se unen al DNA como dímeros y pueden combinarse para formar diferentes homo y heterodímeros (Figura 5) (61).

TonEBP tiene 1455 aminoácidos y una gran región C-terminal que contiene un sitio TAD sensible a hipertonicidad (Figura 5). TonEBP homodimeriza a través de su dominio RHR-C y se une a sitios TonE (56,62).

Las proteínas NFAT(1-4) son monómeros en solución y frecuentemente se unen al DNA en cooperación con Fos-Jun (63). Además, son todas activadas por calcineurina y tienen un dominio N-terminal conservado que contiene los sitios de anclaje y las serinas regulatorias que controlan la localización nuclear y la actividad transcripcional. Las regiones C-terminales de las proteínas NFAT(1-4) son muy diferentes entre sí y diferentes también con TonEBP (Figura 5) (60). La similitud estructural de TonEBP con la familia de factores transcripcionales NFκB, sugiere que proteínas pertenecientes a dicha familia pueden formar heterodímeros con este factor y que las vías transduccionales relacionadas regulen, en forma cruzada, la expresión génica en distintos contextos celulares (64).

TonEBP controla la expresión de AR, los transportadores BGT-1, SMIT, mio-inositol, betaina y taurina, y proteínas de shock térmico como el HSP70 (52,65,66). Recientemente se ha demostrado que TonEBP también puede ser activado por estrés oxidativo, particularmente radical superóxido proveniente de la mitocondria (67,68). Pretratamiento con N-acetil cisteína previene parcialmente la activación de TonEBP sin bloquear su translocación al núcleo (67,68).

La expresión del mRNA para TonEBP es ubicua, sin embargo, la proteína TonEBP se sintetiza sólo en algunos tejidos y células. TonEBP se expresa ampliamente durante el desarrollo temprano y en la etapa adulta y se encuentra abundantemente en corazón, cerebro, hígado y otros órganos (69).

1.5. TonEBP y estrés hiperosmótico

La función mejor caracterizada de TonEBP es su activación por estrés hiperosmótico y la regulación de la expresión de genes osmorregulados. La activación de este factor transcripcional consta principalmente de tres procesos: regulación de su actividad transcripcional, translocación al núcleo y aumento de su síntesis (60). En contraste a NFκB y a las proteínas NFAT(1-4), las cuales son retenidas en el citoplasma de células no estimuladas, una porción sustancial de TonEBP se encuentra constitutivamente en el núcleo en muchos tipos celulares (70).

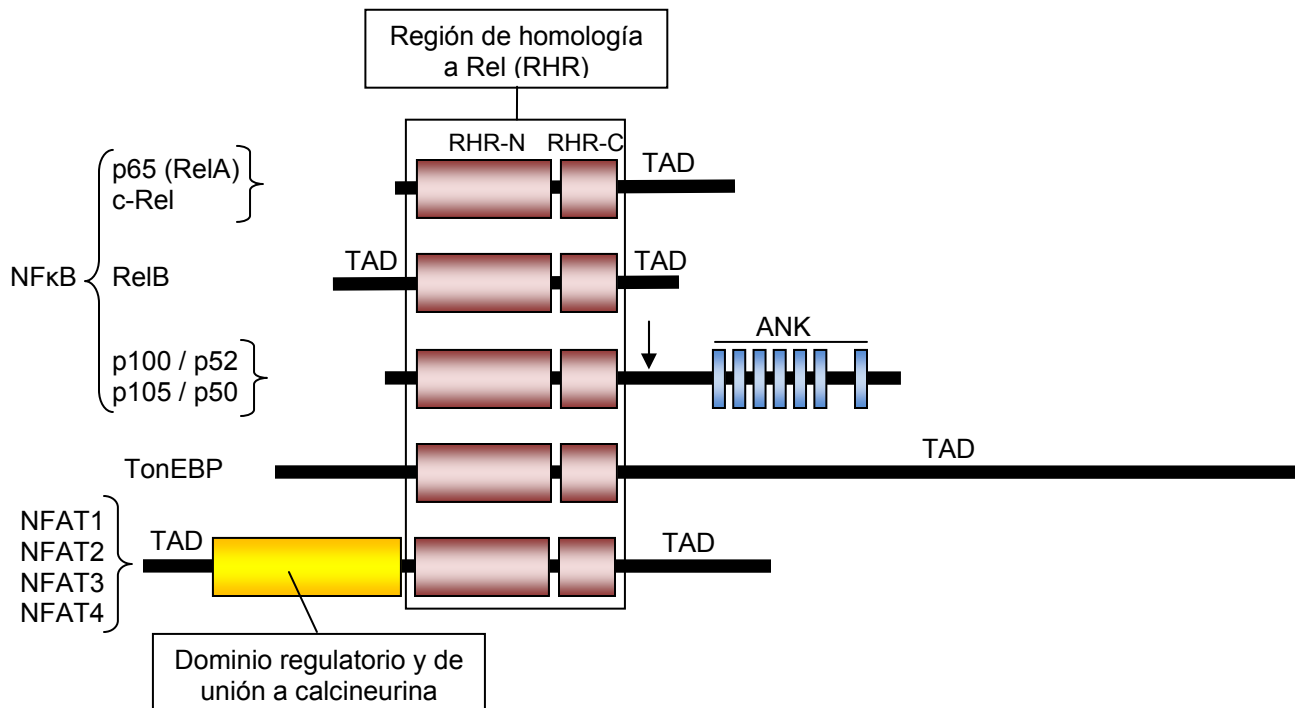


Figura 5. Diagrama esquemático de las proteínas de la familia Rel.

RHR: región de homología a Rel; TAD: dominio de transactivación, ANK: ankirinas.

Cuando las células son expuestas a condiciones hiperosmóticas, TonEBP rápidamente se transloca al núcleo (56,71,72). Además, más tardíamente se detecta un aumento en los niveles de mRNA y luego proteína de TonEBP (60,71,73,74). Recientemente se han identificado tres motivos en el dominio N-terminal de TonEBP que controla su exportación e importación del núcleo (75). El primer motivo es una secuencia de localización nuclear (NLS) y corresponde a los residuos **RKSRKR**NPKQRPGVKRRD, en donde la secuencia RKR es esencial para la translocación nuclear. El segundo motivo corresponde a un dominio de exportación auxiliar (AED) localizado en el N-terminal de la NLS que es necesaria para la exportación nuclear bajo condiciones hipotónicas en forma independiente de CRM1 (receptor de exportación nuclear exportina-1). El tercer motivo es una señal rica en leucina de exportación nuclear (NES) capaz de interactuar con CRM1 y corresponde a la secuencia MP**SDFISLLSADLD**ESPK (75). El mecanismo de translocación nuclear inducido por estrés hiperosmótico parece involucrar la inactivación

de los motivos NES y AED, permitiendo al sitio NLS actuar logrando así la translocación nuclear de TonEBP (75).

Nuestro Laboratorio ha descrito que en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico TonEBP se transloca al núcleo, y se detecta aumento de sus niveles de mRNA y proteína (76,77).

TonEBP tiene un gran dominio de transactivación que responde a hiperosmolaridad en su dominio C-terminal y un dominio más pequeño, isoforma específico, localizado en su N-terminal que no es activado por hiperosmolaridad (56,78). El análisis de la actividad transcripcional de mutantes de TonEBP y fragmentos de su C-terminal fusionados a GAL4 ha demostrado que esta región está compuesta de cuatro dominios. Dos de ellos poseen actividad transcripcional inducible por hiperosmolaridad, y los otros dos actúan como modulador. Sin embargo, se requiere la acción sinérgica de los cuatro dominios para lograr la máxima activación transcripcional de TonEBP por estrés hiperosmótico (78). Aunque TonEBP es hiperfosforilado en respuesta al estrés hiperosmótico, sólo en algunos de los subdominios C-terminal los niveles de fosforilación correlacionan con el aumento de la actividad de transactivación, mientras que otros subdominios pueden ser activados por estrés hiperosmótico sin ser fosforilados (78,79).

Distintas proteínas kinasas fosforilan a TonEBP y afectan su actividad transcripcional. La activación de TonEBP se bloquea por inhibidores de proteína tirosina kinasa y de la proteína kinasa CK2 (55). Recientemente se ha demostrado, en fibroblastos de ratón y células mIMCD3, que p38-MAPK, Fyn y ataxia telangiectasia mutada (ATM) son las principales vías transduccionales involucradas en la regulación de TonEBP por hipertonicidad (55,80,81). Adicionalmente se ha visto que la proteína kinasa A (PKA) juega un importante papel en la activación de TonEBP, en forma independiente de cAMP (82).

Recientemente, se determinó que la hipotonicidad reduce la expresión de TonEBP en timo e hígado de ratas adultas, sin detectarse cambios en músculo esquelético y en corazón. El hígado es el único órgano en el que se encontró que la hipotonicidad, consistentemente redujo no sólo los niveles de proteína y mRNA para TonEBP, sino que también, los niveles de mRNA de las proteínas BGT1, SMIT y TauT (83). De este modo, aunque la tonicidad controla en forma bidireccional la actividad de TonEBP en hígado, es posible que otros niveles de regulación predominen en los tejidos no hepáticos, en los cuales este factor se expresa constitutivamente. Lo anterior sugiere que TonEBP podría tener también un papel no osmótico en los tejidos no renales donde se expresa *in vivo*.

1.6. Otras funciones de TonEBP

En el riñón TonEBP contribuye al gradiente osmótico corticopapilar mediante: a) la estimulación del reciclaje de urea entre el asa ascendente de Henle y los ductos colectores de la médula renal interna (84), b) la protección de las células renales contra los efectos deletéreos de concentraciones altas de urea, por medio de la regulación de la expresión de HSP-70 (65) y c) el incremento de la expresión de AQP2 (85). Sin embargo, la función más importante de TonEBP es la protección celular contra la hipertonicidad, en la cual estimula la transcripción de genes cuyos productos ayudan a la acumulación de osmolitos orgánicos compatibles, que disminuyen la fuerza iónica intracelular (59). Por otro lado, el factor transcripcional TonEBP se expresa también en órganos que no están sometidos a cambios tan radicales en la osmolaridad del medio, como el cerebro y el timo, los cuales incluso presentan mayores niveles de esta proteína que el riñón. Los linfocitos T maduros presentan altos niveles de TonEBP, el cual es necesario para su desarrollo *in vivo* y para el crecimiento óptimo *ex vivo*, en condiciones asociadas a estrés osmótico. Además, estimula la síntesis de ciertas citoquinas, entre las cuales se incluye al TNF- α (86). En células de hibridoma se encontró que TonEBP no sólo es importante en la respuesta frente al estrés osmótico, sino que también es esencial en la producción óptima de anticuerpos monoclonales. Concordantemente, la inhibición de TonEBP reduce la producción de anticuerpos en este tipo celular sin modificar su proliferación (87). En mioblastos de músculo esquelético TonEBP participa en los procesos de migración y diferenciación celular necesarios para la formación de miofibras durante la regeneración del músculo (88). En el mismo estudio, se confirmó la participación de la proteína Cyr61 (otro blanco de TonEBP) en la migración de los mioblastos y su posible contribución a una adecuada densidad de mioblastos en sitios de daño muscular (88). Existe una correlación entre el nivel de expresión de TonEBP y la proliferación celular, sugiriendo que dicho factor se induce al entrar en el ciclo celular y en la progresión del mismo (89). Además, se ha sugerido que, en condiciones isotónicas, TonEBP participaría en la promoción de la invasión celular mediada por integrinas (90,91).

En cultivos primarios de macrófagos humanos se demostró la participación de TonEBP en la replicación de 3 subtipos de VIH-1 (B, C y E) a través de una interacción funcional del factor TonEBP con un sitio de unión específico conservado en los subtipos de VIH 1 y 2, y en múltiples virus de inmunodeficiencia de simios (92). Lo anterior no sólo abre la posibilidad de que TonEBP sea un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento del

SIDA, sino que da luces de otras funciones atribuibles a TonEBP no relacionadas con la fisiología normal de la célula ni con el estrés osmótico normal o patológico.

1.7. Aldosa reductasa y TonEBP

La regulación de la expresión del gen de AR por hipertonicidad requiere la presencia de una región promotora de 3,5 Kb (93). Se identificó en la posición -1105/-1094 bp la secuencia ORE 5'-CGGAAAATCAC-3' (94), que demostró, por ensayos de EMSA, corresponder al sitio de unión de TonEBP (95). Esta secuencia ORE se ha encontrado en todos los promotores de AR hasta ahora estudiados (96). Debido a esta razón, actualmente se considera a la AR como un gen modelo para estudiar la respuesta compensatoria al estrés hipertónico mediado por TonEBP. Además de su papel en la síntesis de sorbitol, esta enzima también se le ha atribuido una función en la detoxificación de aldehídos generados por lipoperoxidación (97).

En condiciones patológicas asociadas con aumentos de la osmolaridad plasmática, por ejemplo en la diabetes, la AR se ha implicado en el desarrollo de cataratas (98) y otras complicaciones asociadas a la generación de estrés oxidativo (99,100). En nuestro Laboratorio hemos observado que cardiomiocitos en cultivo inducen la masa y la actividad de AR cuando son sometidos a estrés hipertónico por sorbitol (34,37). La inhibición de AR por zopolrestat previno la apoptosis inducida por estrés hipertónico, sugiriendo que AR es importante mediador en la muerte inducida por sorbitol (34,37).

1.8. Aldosa reductasa y enfermedades cardiovasculares

En las patologías cardiovasculares, se ha demostrado la participación de AR en la proliferación de las células musculares vasculares lisas (VSMC) (101,102) y su inhibición previene el crecimiento de las VSMC en un modelo de arteria carótida de rata dañada con balón, disminuyendo la hiperplasia de la íntima y la restenosis (101).

Se ha descrito que el uso de inhibidores específicos de AR disminuye el daño inducido por isquemia-reperfusión (103-108). En corazones aislados de rata o conejo, la inhibición de la vía de los polioles con zopolrestat mejora la recuperación metabólica y funcional después de una isquemia inducida por disminución de flujo seguida de perfusión (103-105,107-109). En tejido cardíaco sometido a isquemia se detectó aumento de la actividad de AR debido, en parte, a la activación por óxido nítrico (105). También se observó que los parámetros cinéticos (Kcat) de la AR cardíaca eran

significativamente mayores en tejidos isquémicos. Además, la sobreexpresión de AR, en un modelo de ratón transgénico, aumentó del daño cardíaco inducido por isquemia y reperfusión, y empeoró los parámetros funcionales cardíacos después de la reperfusión (109). Ramasamy y cols han postulado que el efecto benéfico de la inhibición de la AR se debería a la conservación de los niveles intracelulares de ATP y de la razón NADH/NAD⁺, los cuales afectan las actividades de varias enzimas glicolíticas (105). La inhibición de la SDH también mejora la recuperación funcional de corazones sometidos a isquemia-reperfusión (106). Los niveles tisulares cardíacos de NADH/NAD⁺ se redujeron por inhibición de la SDH, tanto en condiciones de normoxia como de isquemia. Además los niveles de ATP fueron superiores en corazones sometidos a isquemia y reperfusión en los cuales se les inhibió la SDH. Los autores proponen que este efecto beneficioso se debería a que la SDH competiría con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa por el NAD⁺ desfavoreciendo la vía glicolítica (106).

También se ha descrito que la AR actúa como un mediador de la fase tardía de preconditionamiento tardío ya que su inhibición con zopolrestat lo elimina completamente (110). Durante la isquemia-reperfusión cardíaca se ha descrito la formación de 4-hidroxinonenal (HNE), un aldehído reactivo producido por oxidación de ácidos grasos no saturados, y que la acumulación de proteínas modificadas con HNE produce daño tisular (111,112). El aumento de la actividad de AR 24 h después del preconditionamiento isquémico produciría una reducción en la acumulación de HNE, ya que la AR cataliza con mucha eficiencia la reducción de dichos aldehídos reactivos (110).

En resumen, durante la isquemia cardíaca aumenta la osmolaridad intracelular en los cardiomiocitos, la que es responsable, durante una reperfusión posterior, de la muerte de las células cardíacas por shock hipotónico. Sin embargo, se desconoce si este aumento de la tonicidad activa los mecanismos de respuesta a hipertonicidad mediada por TonEBP. Sólo existe un trabajo que indica que la actividad de AR, un blanco de TonEBP, aumenta durante la isquemia cardíaca, sin conocerse si aumenta también su expresión o su masa (105). Por otro lado, en la tesis de doctorado de Paola Navarro, realizada en nuestro Laboratorio, se describió que TonEBP estaba presente en los cardiomiocitos y que este factor transcripcional se activaba por estrés hiperosmótico incrementando su masa, se translocaba al núcleo y activaba la expresión sus genes blancos AR, SMIT y HSP-70 (77). En la tesis de doctorado de Anita Gálvez, también realizada en nuestro Laboratorio, se demostró que el estrés hiperosmótico inducía la masa y la actividad de AR con acumulación intracelular de sorbitol, y que la muerte

inducida por estrés hiperosmótico era mediada por la actividad de AR (34). Por lo tanto, parece ser que en nuestro modelo, la activación de TonEBP induciría un aumento de los niveles y actividad de AR que mediaría la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico. Además, debido a que la inhibición de AR protege del daño producido por isquemia-reperfusión (103-108), es razonable suponer que los mecanismos de adaptación celular a las condiciones de hipertonidad pudieran tener también un efecto deletéreo en los procesos de isquemia y reperfusión miocárdica. Sin embargo, todos los datos existentes actualmente en la literatura indican que TonEBP tendría un efecto protector frente al daño inducido por estrés hiperosmótico en varios modelos celulares (89,113-116). De hecho, animales knock out para TonEBP muestran una severa atrofia de su médula renal (115), incremento de la sensibilidad de sus timocitos al estrés hiperosmótico (86) e incremento de la fragmentación del DNA en células de la fibra del lente de estos animales (114). Además se ha observado que en cardiomiocitos TonEBP mediaría la protección celular frente a doxorubicina (113). Por lo tanto, existiría una contradicción entre los datos descritos en la literatura y nuestros hallazgos sobre el papel de TonEBP en la sobrevivencia celular. Entonces, en esta tesis se investigará si TonEBP es activado o no durante la isquemia miocárdica y su efecto directo en la sobrevivencia de los cardiomiocitos.

2. HIPÓTESIS

“TonEBP media la adaptación del cardiomiocito a la hiperosmolaridad generada por isquemia cardiaca”.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de TonEBP en la muerte del cardiomiocito a la hiperosmolaridad generada por isquemia cardiaca.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Caracterizar el mecanismo de muerte inducida por estrés osmótico.

Objetivo 2. Determinar si el factor de transcripción TonEBP se activa bajo condiciones de isquemia cardiaca *in vivo* e *in vitro*.

Objetivo 3. Determinar el efecto directo de TonEBP en la viabilidad del cardiomiocito.

Objetivo 4. Evaluar si TonEBP protege a los cardiomiocitos de la muerte inducida por hiperosmolaridad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's, medio DMEM, medio M199, SDS, pancreatina, gelatina, yoduro de propidio, Tritón X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, L-lactato, CCCP, sorbitol, EDTA, EGTA, NaVO_4 , PMSF, glicerol, DTT, Tween-20, azul de tripán, ácido pirúvico, NADH, azul de bromofenol, reactivo de Folin Ciocalteau, pancreatina y anti β -actina monoclonal hecho en ratón. De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron: NaOH, HCl, Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tatrato dipotásico, NaF, pirofosfato de sodio, Tritón X-100, MgCl_2 , 2-propanol, formaldehído 37%. De Amresco (Solo, OH, EEUU): NaCl, leupeptina, aprotinina, HEPES sal sódica, Tris base, acrilamida, bisacrilamida, CsCl, RNAsa. De Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU) se adquirieron: Trizol, Tripsina-EDTA 10x y colagenasa tipo II. De Molecular Probes (actualmente subsidiaria de Invitrogen) se obtuvieron fluo3-acetoximetilester (Fluo3-AM), rhod2-acetoximetilester (Rhod2-AM), tetrametilrodamina (TMRM) y faloidina-rodamina. De Winkler (Santiago, Chile) se obtuvieron: KCl, 2-mercaptoetanol, TEMED, BSA, sacarosa, DNA ladder de 100 y 1000 pb, agarosa. De Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU) se adquirieron: anti-IgG conejo, anti-IgG ratón, SB203580 y Z VAD fmk. Suero fetal de bovino (FBS) y suero de ternera (FCS) se adquirieron de Hyclone (EEUU). Otros reactivos: reactivo de Bradford (BioRad, EEUU), Dako (Dako Cytomation, CA, EEUU), anticuerpo anti factor inductor de la apoptosis (Chemicon, EEUU), anticuerpo anti citocromo c (BD Pharmingen, EEUU). El reactivo Western Lightning se adquirió en PerKinElmer Life Sciences, Inc (Boston, EEUU). Las enzimas T4 DNA ligasa, Bgl II, BamH I, EcoICR I, Pme I, Xho I y Sal I se adquirieron de New England Biolabs.

5.2. Obtención y cultivo de cardiomiocitos

Los cardiomiocitos se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días, como se describe en Foncea y cols (117). Las células se sembraron a una densidad final de $1,4 \times 10^3/\text{mm}^2$ sobre placas de Petri (35, 60 ó 100 mm) cubiertas con gelatina al 2%. Para los estudios de inmunofluorescencia, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro, cubiertos con gelatina y puestos en placas de 24 pocillos. Después de la obtención, los cardiomiocitos se incubaron por 24 h en medio con suero (DMEM:M199=4:1, 10 % FBS). Luego, los cultivos se privaron de suero y se mantuvieron por

otras 24 h en medio de mantención (DMEM:M199=4:1). Finalmente, las células se incubaron en medio de mantención suplementado o no con sorbitol (400 - 600 mOsm).

5.3. Obtención de extractos proteicos de células

Una vez finalizado el período de estimulación, los cardiomiocitos se lisaron en 100 μ L de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato de Na, 1 mM NaVO_4 , 140 mM NaCl y 1 mM PMSF), que contenía 10% v/v glicerol, 1 μ g/mL leupeptina, 1 μ g/mL aprotinina y 1% v/v Tritón X-100. Luego las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min a 4 °C y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Las fracciones solubles se mezclaron con 0,33 volúmenes de tampón desnaturalante 4x (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 32% v/v glicerol, 20% 2-mercaptoetanol, 9,2% SDS, 0,02% azul de bromofenol) y se incubaron por 5 min a 95°C para el posterior análisis por Western blot.

5.4. Determinación de proteínas

5.4.1. Lowry

Se utilizó una variante del micrométodo de Lowry en presencia de detergentes (118). Brevemente, se preparó el reactivo A mezclando partes iguales de una solución de cobre-tartrato-carbonato [preparado por mezcla de 50 mL de 0,2% p/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,4% p/v tartrato dipotásico con 50 mL de 20% p/v Na_2CO_3], 10% SDS y 0,8N NaOH; y el reactivo B diluyendo 1 volumen del reactivo de Folin Ciocalteau con 5 volúmenes de agua nanopura. En un tubo Eppendorf se mezcló 5 μ L de muestra de proteínas con 400 μ L de agua nanopura, 400 μ L de reactivo A y 200 μ L de reactivo B. se incubó a 40°C por 30 min y la absorbancia se determinó a 750 nm. Como estándar de proteínas se utilizó BSA.

5.4.2. Bradford

Se mezclaron 5 μ L de muestra con 200 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad protein assay) y 795 μ L de agua. Las muestras se leyeron a 595 nm. Como estándar para realizar la curva de calibración se utilizó BSA (119).

5.5. Medición de los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+}

Los cardiomiocitos neonatos de rata se cultivaron en cubreobjetos de vidrio precubiertos con gelatina a una densidad de 1×10^6 células/ mm^2 . Los cardiomiocitos se preincubaron con Fluo3-AM y Rhod2-AM por 30 min en un medio Krebs con Ca^{2+}

(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 g/mL glucosa), se lavaron con medio Krebs con Ca²⁺ y luego se montaron en un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss Axiovert 135 M-LSM Microsystems). Las imágenes fluorescentes se colectaron cada 5.0 s con una configuración multi canal (canal A para Fluo3-AM, excitación 488 nm; emisión 526 nm; canal B para Rhod2-AM, excitación 543 nm; emisión 580 nm). En cada imagen obtenida se determinó los niveles de fluorescencia en regiones de interés (ROI) de células individuales. Los valores se expresaron como $\Delta F/F_0$, donde ΔF corresponde a $F - F_0$, y F_0 a la fluorescencia basal.

5.6. Determinación de la depolarización mitocondrial

Los cardiomiocitos se preincubaron con 100 nM de TMRM por 17 min a 37°C, se lavaron y se mantuvieron en medio Krebs con Ca²⁺ o en medio Krebs libre de Ca²⁺ (Krebs sin CaCl₂, suplementado con 2 mM MgCl₂ y 1 mM EGTA). Las imágenes se registraron cada 5 s en un microscopio confocal invertido (excitación 543 nm; emisión 500 - 600 nm). Los valores se expresaron como $\Delta F/F_0$, donde ΔF corresponde a $F - F_0$, y F_0 a la fluorescencia basal. La depolarización mitocondrial máxima se obtuvo usando CCCP (10 μ M).

5.7. Análisis de Western blot

En todos los Western blots, las proteínas se resolvieron en geles en gradiente de poliacrilamida entre 5 al 12% p/v con SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m a voltaje constante (100 V por 1,5 h). Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 3% p/v en TBS-T (25 mM Tris pH 7,4, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1% v/v Tween-20) por 1 h y se incubaron con el primer anticuerpo (anti-TonEBP 1:5.000; anti AR 1:20.000, β -actina 1:1.000, β -tubulina 1:1.000, β -MHC 1:1.000). Luego de lavar las membranas, se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo o ratón, conjugado a peroxidasa de rábano, para ambos anticuerpos secundarios se usó la dilución 1:5.000. La unión específica se detectó mediante quimioluminiscencia (ECL), utilizando película BioMax MR.

5.8. Inmunofluorescencia indirecta (IF)

Los cardiomiocitos se sembraron en cubreobjetos de vidrio como ya se mencionó anteriormente. Transcurrido el periodo de estimulación, se fijaron las células con formaldehído (4% p/v en PBS, 20 min), se permeabilizaron (PBS-0,3% v/v Tritón X-100,

30 min) y se bloquearon (3% p/v BSA en PBS, 1 h), este procedimiento se realizó a temperatura ambiente, lavando con PBS al finalizar cada etapa. Posteriormente, las células se incubaron con el primer anticuerpo anti-TonEBP (1:400), anti-citocromo c (1:400) o anti factor inductor de apoptosis (AIF) (1:100) diluidos en PBS-1% BSA, se lavaron y se incubaron con el segundo anticuerpo IgG de conejo conjugado con FITC (1:1.000) o anti-ratón conjugado con Alexa 488, ambos diluidos en PBS-1% BSA. Luego las células son incubadas con yoduro de propidio (PI, 0,5 µg/µL) por 5 min para marcar los núcleos. En otros experimentos, se utilizó un anticuerpo contra AR (1:2.000) y un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con Cy3 (1:1.000). La tinción de F-actina se realizó por incubación con faloidina–rodamina (1:400) por 5 min a temperatura ambiente. El último lavado se realizó con PBS-Tween 20 (0,05% v/v). Finalmente, a los cubreobjetos se les agregó 10 µL de DAKO para extender el tiempo de decaimiento del fluoróforo. Las muestras así tratadas se observaron en microscopio confocal.

5.9. Determinación de viabilidad celular

5.9.1. Ensayo por azul de tripán

Los cardiomiocitos se cultivaron en placas de 12 pocillos conteniendo 500.000 células por pocillo. Luego de exponer al estímulo, las células se soltaron de la placa con 0,1 mL de Tripsina 1x diluida en PBS. La reacción enzimática se detuvo con 0,05 mL de FBS. Inmediatamente las suspensiones celulares se centrifugaron a 170 x g por 5 min y se resuspendieron en medio de mantención. Finalmente, se mezclaron volúmenes iguales de solución celular y azul de tripán 4x y se contó el número de células utilizando una cámara de Neubauer (120).

5.9.2. Incorporación de yoduro de propidio por citometría de flujo

Los cardiomiocitos se cultivaron en placas de 12 pocillos conteniendo 500.000 células por pocillo. Al término de cada experimento, el medio de cultivo se recolectó en un tubo de ensayo plástico de 3 mL. A cada placa se le agregó 0,3 mL de dilución de 1x tripsina-EDTA en PBS (37°C) para soltar las células adheridas y se incubó por 5 min con agitación ocasional. La acción de la tripsina se detuvo añadiendo 50 µL de FBS. Las células se traspasaron inmediatamente a los tubos plásticos de 3 mL anteriores, mezclando las soluciones. A cada tubo se le añadió 5 mL de yoduro de propidio (PI, 1 mg/mL) y las células se analizaron por citometría de flujo, registrando el canal FL3. Este

procedimiento se basa en el hecho que las células no viables pierden integridad de membrana permitiendo la marcación del DNA con yoduro de propidio.

5.10. Determinación de apoptosis

5.10.1. Fragmentación del DNA por electroforesis en agarosa

Los cardiomiocitos se cultivaron en placas de 60 mm conteniendo 4×10^6 células por placa. Al término de cada experimento, las células se lisaron con 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAsa A. El lisado se extrajo dos veces con fenol saturado en TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y una vez con CHCl_3 : alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol 100% y los pellets se lavaron con etanol 70%. Después de resuspender en TE, a las muestras se les determinó la pureza y la concentración por la absorbancia a 260 y 280 nm. Las muestras (3 μg) se resolvieron en un gel de agarosa 2% p/v en TBE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en transiluminador (37).

5.10.2. Población subG1 por citometría de flujo

Los cardiomiocitos se cultivaron en placas de 12 pocillos conteniendo 500.000 células por pocillo. A diferentes tiempos, se recolectó el medio de cultivo de los cardiomiocitos en un tubo de ensayo plástico de 3 mL. A cada placa se le agregó 0,3 mL de dilución de 1x tripsina-EDTA en PBS (37°C) para soltar las células adheridas y se incubó por 5 min con agitación ocasional. La acción de la tripsina se detuvo añadiendo 50 μL de FBS. Las células se traspasaron inmediatamente a los tubos plásticos de 3 mL anteriores, mezclando las soluciones. El sobrenadante se eliminó por centrifugación a 279 x g por 5 min a 4°C, dejando un mínimo volumen. Las células se resuspendieron cuidadosamente, se fijaron y permeabilizaron con 1 mL de metanol frío y se mantuvieron a -20°C por 1 h. Las células se centrifugaron a 270 x g por 5 min a 4°C, se eliminó completamente el sobrenadante y se resuspendieron en 0,5 mL de solución de RNAsa A en PBS (0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego las células se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y al momento de analizarlas por el citómetro, se agregaron 5 μL de PI (1 mg/mL).

La técnica es una adaptación de la utilizada para la cuantificación de las poblaciones G1, S y G2 del ciclo celular, y se basa en que las células apoptóticas condensan su cromatina, lo que dificulta el acceso del PI al DNA, por lo que aparece una población celular con menor fluorescencia al lado de la prominente señal de G1, tal como se aprecia en la Figura 6. Para evaluar la muerte por apoptosis en el citómetro, se

seleccionó la población de cardiomiocitos dentro de la muestra “Control”, la cual se designó como P₁ (Figura 6), esta última se dividió en tres subpoblaciones representadas en el gráfico Count vs. PerCP-Cy5-5-A. La población P₂ se definió como los cardiomiocitos apoptóticos de la muestra, mientras que P₃ y P₄ se definieron como células mononucleadas y binucleadas, respectivamente.

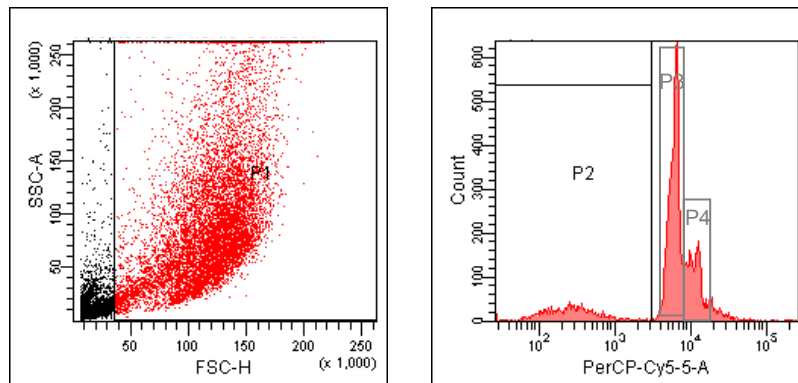


Figura 6. Evaluación de la muerte por apoptosis en cardiomiocitos mediante citometría de flujo.

5.10.3. Activación de caspasas

La activación se determinó por Western blot detectando la fragmentación de las procaspasas 3 y 9. Además, se determinó la actividad enzimática de la caspasa 9 por un método colorimétrico usando como sustrato Ac-LEHD-pNA (Calbiochem) (121).

5.11. Determinación necrosis por liberación de láctico deshidrogenasa

Los cardiomiocitos se cultivaron en placas de 12 pocillos conteniendo 500.000 células por pocillo. A diferentes tiempos se recuperó completamente el sobrenadante de cada pocillo y se les determinó el volumen total. Paralelamente, se les agregó a cada pocillo 0,5 mL de amortiguador fosfato 0,1 M pH 7,0 conteniendo 0,1% v/v Triton X-100 y las células se rasparon. Los sobrenadantes se traspasaron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 10.000 x g por 5 min. Luego se determinó la actividad de láctico deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo sobrenadante y en el lisado celular. Para ello se mezcló en una cubeta de 1 mL 850 μ L de amortiguador fosfato 0,1M pH 7,0, 33 mL de piruvato de sodio 2,5 mg/mL, 16,7 μ L de NADH sal sódica 10 mg/mL y 100 μ L de muestra. La mezcla se agitó y se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm a 37°C por 3 min. La actividad LDH se calculó multiplicando el valor absoluto de la pendiente por 20 y se corrigió por la dilución empleada. La actividad LDH total se calculó

sumando la actividad total del sobrenadante y la actividad total de lisado celular. Los valores se expresaron como porcentaje de LDH liberado al sobrenadante.

5.12. Determinación de los niveles intracelulares de ATP

El contenido total de ATP de las células se determinó usando un ensayo de luciferina/luciferasa (Cell-Titer Glo Kit, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los cardiomiocitos se crecieron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células/pocillo. Después de estimular las células, éstas se lisaron, se les agregó una mezcla de luciferina/luciferasa, y los sobrenadantes se transfirieron a una microplaca blanca. La luminiscencia se determinó en un luminómetro de microplaca TopCount NXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA) (122).

5.13. Modelo de infarto al miocardio

Se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley provenientes del Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El diseño experimental contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Brevemente, ratas Sprague Dawley macho de 200 ± 10 g se anestesiaron con ketamina (50 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) por inyección intraperitoneal. Luego se intubaron con una bránula de teflón 16G y conectadas a ventilador mecánico para ser ventilados con un volumen corriente aproximado de 2 mL y una frecuencia de 60 ciclos/min durante todo el procedimiento. Luego de cortar la piel con tijera se continuó con disección roma, divulsionando los músculos pectorales hasta acceder a la parrilla intercostal. A continuación se realizó una toracotomía izquierda por el 4° espacio intercostal izquierdo para acceder a la cara anterior del corazón. Posteriormente se realizó el reconocimiento y la ligadura de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda con una sutura de seda 7-0 (rata IAM). El tórax se cerró por planos mediante sutura y luego las ratas se dejaron en recuperación. En paralelo a un grupo de ratas se les realizó una operación ficticia procediendo de igual manera que en las ratas IAM pero sin realizar la ligadura de la coronaria luego de su reconocimiento (SHAM). Los animales se sometieron a una evaluación ecocardiográfica durante las primeras 48 h post cirugía para descartar del estudio a aquellos animales con un infarto menor al 25% del perímetro cardíaco (123).

5.14. Obtención de extractos proteicos de corazón

Los animales se sacrificaron a los 2 días post cirugía, previa determinación de la función ventricular. Se tomaron muestras de ventrículo izquierdo (VI) en el sitio del infarto (SI) y en un sitio vecino al infarto (SVI). En forma paralela se recolectaron muestras en los sitios equivalentes al SI y SVI en ratas SHAM que se utilizaron como controles. Estas muestras se lavaron con suero fisiológico para remover la sangre contaminante y homogenizaron con ultraturrax en amortiguador de lisis RIPA (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1% p/v SDS, 1% v/v Tritón X-100, 1% p/v desoxicolato de sodio, 5 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 1 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL aprotinina). La suspensión se centrifugó a 14.000 x g por 20 min 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por Lowry. Finalmente, las fracciones proteicas se mezclaron con 0,33 volúmenes de amortiguador desnaturante 4x y se incubaron por 5 min a 95 °C, para el posterior análisis por Western blot.

5.15. Obtención de los adenovirus TonEBP dominante negativo y silvestre

5.15.1. Clonamiento de los genes que codifican para TonEBP dominante negativo y silvestre en un vector adenoviral

Los genes que codifican para TonEBP dominante negativo (dnTonEBP) y silvestre (wtTonEBP), ambos clonados en el vector pCMV-Tag3 (Stratagene, La Jolla, CA) fueron gentilmente donados por el Dr.H. Moo Kwon (University of Maryland, Baltimore) (62). Las identidades de estos plasmidios se comprobaron a través de la realización de mapas de restricción.

El cDNA que codifica para wtTonEBP se extrajo usando las enzimas de restricción BamH I y Xho I y se subclonó en el vector lanzadera adenoviral pDC32, plasmidio derivado del vector pDC316 (Microbix Biosystems Inc.), predigerido con las enzimas BamH I y Sal I. El cDNA que codifica para dnTonEBP se extrajo usando las enzimas de restricción BamH I y Pme I y se subclonó en el vector lanzadera adenoviral pDC316 (Microbix Biosystems Inc.), predigerido con las enzimas Bgl II y EcoI CR I. Todos fragmentos de DNA se purificaron usando el Kit Wizard Purification System (Cat. A9281, Promega Corporation) y los fragmentos respectivos se ligaron por incubación con T4 DNA ligasa a 4°C por toda la noche.

Ambas mezclas de ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5α competentes. Se purificó DNA plasmidial de todas las colonias de *E. coli* transformantes utilizando el método del SDS alcalino (124). Para determinar si los DNA plasmidiales eran

recombinantes, se procedió a realizar una electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en TBE 0,5x. Los clones que contenían los plasmidios recombinantes pDC316-dnTonEBP y pDC32-wtTonEBP se crecieron en 250 mL de Terrific Broth (12 g/L triptona, 24 g/L extracto de levadura, 4 mL/L glicerol, 17 mM KH₂PO₄ y 72 mM K₂HPO₄) a 37°C con agitación orbital por 18 h. Las bacterias se colectaron por centrifugación y se procedió a purificar los plasmidios por el método del SDS alcalino, pero utilizando 15 mL de solución de lisis, 30 mL de SDS alcalino, 22,5 mL de solución de alta salinidad y precipitando los plasmidios con 135 mL de etanol puro. Los plasmidios se resuspendieron en 3,7 ml de TE 1x y se agregó 300 µL de bromuro de etidio 10 mg/mL, se mezcló y centrifugó a 5.000 x g durante 2 min. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de polialómero de 13 x 51 mm conteniendo 4 g de CsCl y se ultracentrifugaron a 35.000 rpm en rotor SW 55Ti Beckman durante 24 h a 20°C. Posteriormente, la banda plasmidial se recolectó pinchando los tubos de polialómero con una jeringa. El bromuro de etidio de las soluciones se extrajo con isopropanol saturado de CsCl. El CsCl se eliminó precipitando el DNA con 2 volúmenes de etanol 100% a temperatura ambiente y posterior lavado con etanol 70% v/v. La concentración y pureza del DNA se determinó midiendo absorbancia a 260 y 280 nm.

5.15.2. Generación de los adenovirus recombinantes

Los adenovirus recombinantes se generaron cotransfectando los vectores pDC316 / dnTonEBP y pDC32 / wtTonEBP con el plasmidio pBHGloxΔE1,3Cre (Microbiosystems Inc.) en células HEK293. La cotransfección se realizó a través del método del fosfato de calcio. Normalmente, una placa de 10 cm de diámetro con células HEK293 80% confluentes, se dividió en 2 placas de 6 pocillos y crecida por 18 h en medio DME + 5% v/v FBS. El medio de cultivo se reemplazó por 3 mL de medio DME + 5% FBS fresco 2 h previas a la transfección. En tubos de 15 mL se mezclaron 24 µg de vector pDC316 silvestre (control para generar adenovirus vacío), pDC316-dnTonEBP o pDC32-wtTonEBP, más 8 µg de pBHGloxΔE1,3Cre hasta un volumen final de 810 µL en TE 0,1x. Bajo continua agitación con vortex se añadió 90 µL de 2,5 M CaCl₂ y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, bajo agitación en vortex, se añadió gota a gota 900 µL de HBS 2x (280 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,12). Una vez terminada la adición del HBS se agitó por 30 s adicionales y rápidamente (en menos de 1 min) se añadió gota a gota 300 µL de la mezcla por pocillo. Cada 48 h se removió la mitad del medio de cultivo y se agregó medio de cultivo fresco (DMEM + 5%

v/v FBS), hasta completar 40 días o hasta verificar la lisis de las HEK 293 debido a la aparición de los adenovirus recombinantes.

Para verificar que la lisis celular se debía a la presencia de adenovirus, 1 mL del sobrenadante del medio de cultivo se aplicó sobre una placa de 100 mm de HEK293 60% confluyente que contenía 9 mL de medio DMEM + 5% v/v FBS. La presencia de adenovirus produce la lisis de las células en 2 a 3 días post-inoculación.

5.15.3. Amplificación de los adenovirus recombinantes

La amplificación de los adenovirus se realizó en células HEK293 cultivadas en placas de 100 mm. Los adenovirus recombinantes se preamplificaron inoculando 1 a 2 placas de HEK293 80% confluentes con 1 mL de sobrenadante de medio con el adenovirus. Las placas se incubaron a 37°C en cámara humidificada con 5% CO₂ y 95% aire por 2 a 3 días hasta que más del 80% de las células se despegaron. Las células junto con el medio de cultivo se recolectaron en un tubo Falcon con tapa rosca de 50 mL, las células se lisaron por 3 ciclos de congelación y descongelación, y la mezcla se centrifugó a 3.000 x g por 8 min. El sobrenadante se utilizó para inocular 15 placas de HEK293 80% confluentes. Estas placas se trataron usando el mismo protocolo anterior. El sobrenadante de estas 15 placas se utilizó para inocular 150 placas HEK293 80% confluentes. En este caso, al lograrse el 80% de las células despegadas, las células de las 150 placas se recolectaron por centrifugación a 5.000 x g por 8 min en 4 tubos Falcon de 50 mL eliminando el sobrenadante. Después de la última centrifugación, se dejaron en cada tubo 8 mL de medio de cultivo. Las células se lisaron con 3 ciclos de congelación y descongelación, se centrifugaron a 5.000 x g por 8 min y los sobrenadantes se recolectaron.

5.15.4. Purificación de los adenovirus recombinantes por doble gradiente de CsCl

Los sobrenadantes conteniendo los adenovirus del punto 5.15.3 se colocaron encima de dos tubos de polialómero de 25 x 89 mm conteniendo una gradiente discontinua de CsCl formada por 8 mL de CsCl de densidad 1,4 g/mL y 6 mL de CsCl de densidad 1,2 g/mL. Las células se lavaron con 5 mL de medio de cultivo y se colocaron encima de los tubos de polialómero hasta llenarlos. Los tubos se colocaron en capachos del rotor swinging bucket (SW 28 Beckman) preequilibrados a 4°C y se ultracentrifugaron a 100.000 x g (23.000 rpm) por 90 min a 4°C ajustado sin freno. La banda de adenovirus formada en la interfase entre las soluciones de CsCl de 1,2 y 1,4 g/mL se recolectó

pinchando los tubos de polialómero con una jeringa de 5 mL y aguja de 18G x 1', se depositó en un tubo de polipropileno de 15 mL estéril y se diluyó TE 1x estéril hasta completar 12 mL.

En un nuevo tubo de polialómero de 25 x 89 mm se generó una gradiente continua de CsCl, utilizando un generador de gradiente mezclando 12 mL de CsCl de densidad 1,4 g/mL con 14 mL de CsCl de densidad 1,2 g/mL. Sobre esta gradiente se depositó los 12 mL de adenovirus obtenidos de la gradiente discontinua. El tubo se colocó en un capacho del rotor SW 28 Beckman preequilibrado a 4°C y se contrapesó con un tubo preparado en forma equivalente pero sin virus. Los tubos se ultracentrifugaron a 100.000 x g (23.000 rpm) por 20 h a 4°C ajustado sin freno. La banda de adenovirus se recolectó pinchando el tubo de polialómero con una jeringa de 5 mL y aguja de 18G x 1', y se depositó en una bolsa de diálisis que fue previamente hervida en agua destilada y enfriada. Después de sellar la bolsa de diálisis, los virus se dializaron a 4°C por 3 veces de 1 h cada vez contra 330 mL de solución de virus (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 5% p/v sacarosa). Al término de la diálisis los virus se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

5.15.5. Cuantificación de los adenovirus purificados

La cuantificación de los virus se realizó espectrofotométricamente. Una alícuota de virus se diluyó al doble o 5 veces con amortiguador de lisis de virus (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% p/v SDS, 1 mM EDTA) y se incubaron a 56°C por 20 min. Como blanco se prepararon las mismas diluciones pero con el sobrenadante de la diálisis. Las mezclas se diluyeron posteriormente 1:5 y 1:10 y se leyeron a 260 nm. El número de las partículas virales se calculó usando la siguiente fórmula: Número de partículas virales/mL = A₂₆₀ x dilución x 1,1 x 10¹².

5.15.6. Caracterización de los adenovirus recombinantes

Los adenovirus recombinantes se caracterizaron transduciendo cardiomiocitos y determinando en extractos proteicos de estas células los niveles de wtTonEBP y dnTonEBP por Western Blot.

5.16. Transducción de los cardiomiocitos

Placas de 35 mm conteniendo 1 x 10⁶ cardiomiocitos se transdujeron con distintas multiplicidades de infección (MOI) de los adenovirus wtTonEBP (Ad wtTonEBP) y dnTonEBP (Ad dnTonEBP). Como control se utilizó un adenovirus que sobreexpresa

β -galactosidasa (Ad LacZ). Las células se incubaron por 48 h a 37°C en cámara humidificada 5% CO₂/95% aire.

5.17. Transducción adenoviral *in vivo*

La infección de los animales se llevó a cabo según la técnica descrita por Hajjar y cols (125). Brevemente, los animales se anestesiaron con ketamina y xilazina en dosis de 50 mg/Kg/peso y 10 mg/Kg/peso respectivamente, por vía intraperitoneal. Luego se les intubó por vía laríngea mediante un catéter blando 18-gauge y se ventilaron con un volumen corriente de aproximadamente 2 mL a 60 ciclos/minuto (ventilador mecánico SAR-830 para animales pequeños). Se realizó una esternotomía media y se introdujo un catéter 24-gauge con 100 μ L de solución adenoviral diluido en 100 μ L de PBS estéril desde el ápex del ventrículo izquierdo hacia la raíz de la aorta. La arteria pulmonar y la aorta se ocluyeron distalmente con respecto al sitio de ubicación del catéter y se inyectó la solución. El clamp se mantuvo por 30 s y posteriormente se retiró. Después de la instalación de un tubo de drenaje para la remoción de aire y sangre, se cerró la incisión, se permitió la recuperación de los animales y se les devolvió a sus respectivas jaulas.

5.18. Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados presentados corresponden al promedio \pm SEM del número de experimentos independientes indicados. Las figuras o imágenes corresponden a resultados representativos de cada grupo de experimentos repetidos al menos 3 veces en forma independiente. La significancia estadística de los datos se realizó mediante Prueba T y prueba ANOVA seguido de un post-test de Tukey. Se consideró como límite de significancia estadística, valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de la muerte inducida por estrés hiperosmótico

Nuestro Laboratorio ha descrito que el estrés hiperosmótico por sorbitol 600 mOsm induce una rápida y potente apoptosis en cardiomiocitos de rata en cultivo (33). Esta apoptosis se caracteriza por presentar un aumento en los niveles de la proteína pro-apoptótica Bcl-XS, proteólisis de poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) y fragmentación del DNA (33). El estrés hiperosmótico induce además activación de TonEBP (76), incremento de la masa y actividad de AR y acumulación intracelular de sorbitol (37). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular exacto por el cual el estrés hiperosmótico induce muerte de los cardiomiocitos y si TonEBP cumple algún papel en este mecanismo.

Por lo tanto, para investigar el objetivo específico 1: “Caracterizar el mecanismo de muerte inducida por estrés osmótico”, se procedió a evaluar la posible participación del Ca^{2+} y la mitocondria en el mecanismo de muerte inducido por estrés hiperosmótico.

6.1.1. Efecto del estrés hiperosmótico sobre los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+}

La apoptosis es activada principalmente por dos grandes mecanismos: a) la vía extrínseca, que se activa por los receptores de muerte (por ejemplo Fas-ligando y receptor de TNF- α) seguido de activación de las caspasas 8 y 3; y b) la vía intrínseca, dependiente de la depolarización de la mitocondria con liberación de citocromo c y activación de caspasa 9 y caspasa 3 (Figura 2) (126). Con el objeto de determinar la participación de la vía intrínseca en la activación de la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico, se evaluó inicialmente la hipótesis que un aumento de Ca^{2+} intracelular producido por sorbitol hiperosmolar induce depolarización mitocondrial.

Para ello cardiomiocitos en cultivo se preincubaron con dos sondas fluorescentes sensibles a Ca^{2+} : Fluo3-AM, que se localiza principalmente en el citoplasma y se utilizó para determinar el nivel de Ca^{2+} citoplasmático, y Rhod2-AM, que se localiza en los compartimentos celulares ácidos y se utilizó para determinar el nivel de Ca^{2+} mitocondrial.

Los aumentos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} se visualizaron en cardiomiocitos únicos precargados con Fluo-3AM y se expresaron como aumentos de la fluorescencia relativa (Figura 7A). Cuando los cardiomiocitos incubados en medio Krebs con Ca^{2+} se expusieron a sorbitol (600 mOsm) exhibieron un pequeño pero rápido aumento del Ca^{2+} citoplasmático que alcanzó un máximo a los 12 ± 2 s (n=5), seguido de

una señal oscilatoria más grande y tardía que comenzaba a los 356 ± 78 s ($n=5$) después de la adición de sorbitol (Figura 7A).

El aumento de la concentración citoplasmático de Ca^{2+} puede inducir una captación de Ca^{2+} por la mitocondria, produciendo como consecuencia una depolarización mitocondrial (127). Para detectar si el aumento del Ca^{2+} citoplasmático producía un aumento del Ca^{2+} mitocondrial, los cardiomiocitos se preincubaron con Rhod2-AM (como sonda para detectar Ca^{2+} mitocondrial) y Fluo3-AM (como sonda para detectar Ca^{2+} citoplasmático). El estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) indujo un aumento significativo en el Ca^{2+} mitocondrial que se correlacionó con el aumento del Ca^{2+} citoplasmático (Figura 7A). El aumento tardío y oscilatorio de Ca^{2+} citoplasmático se asoció con un gran aumento del Ca^{2+} mitocondrial que no fue oscilatorio (Figura 7A). Además, la magnitud del aumento Ca^{2+} citoplasmático aumentó cuando se incrementó la osmolaridad de las soluciones de sorbitol en una manera dosis dependiente (Figura 7B). Estos resultados indican que el estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) induce en los cardiomiocitos un aumento de Ca^{2+} citoplasmático caracterizado por 2 fases. La primera correspondiente a un aumento pequeño pero rápido y la segunda fase correspondiente a un aumento tardío pero de mayor magnitud. Además, el aumento citoplasmático de Ca^{2+} está asociado con un aumento simultáneo del Ca^{2+} mitocondrial.

6.1.2. Efecto del estrés hiperosmótico sobre la depolarización de la membrana mitocondrial

Con el objeto de determinar si el aumento del Ca^{2+} mitocondrial producía una depolarización de la membrana mitocondrial, cardiomiocitos se preincubaron con TMRM (100 nM), una sonda usada para determinar potencial de membrana mitocondrial. Se determinó que el estrés hiperosmótico indujo una depolarización mitocondrial en una manera dosis dependiente (Figuras 7C-D). Como control positivo de depolarización se utilizó CCCP (10 μM) (Figuras 7C-D). Esta depolarización mitocondrial fue completamente dependiente de la entrada de Ca^{2+} ya que no se observó en cardiomiocitos mantenidos en Krebs libre de Ca^{2+} (Figura 7E). Estos resultados sugieren que el aumento del Ca^{2+} mitocondrial induce la depolarización de la mitocondrial y que esta depolarización es dependiente con una entrada del Ca^{2+} desde el extracelular.

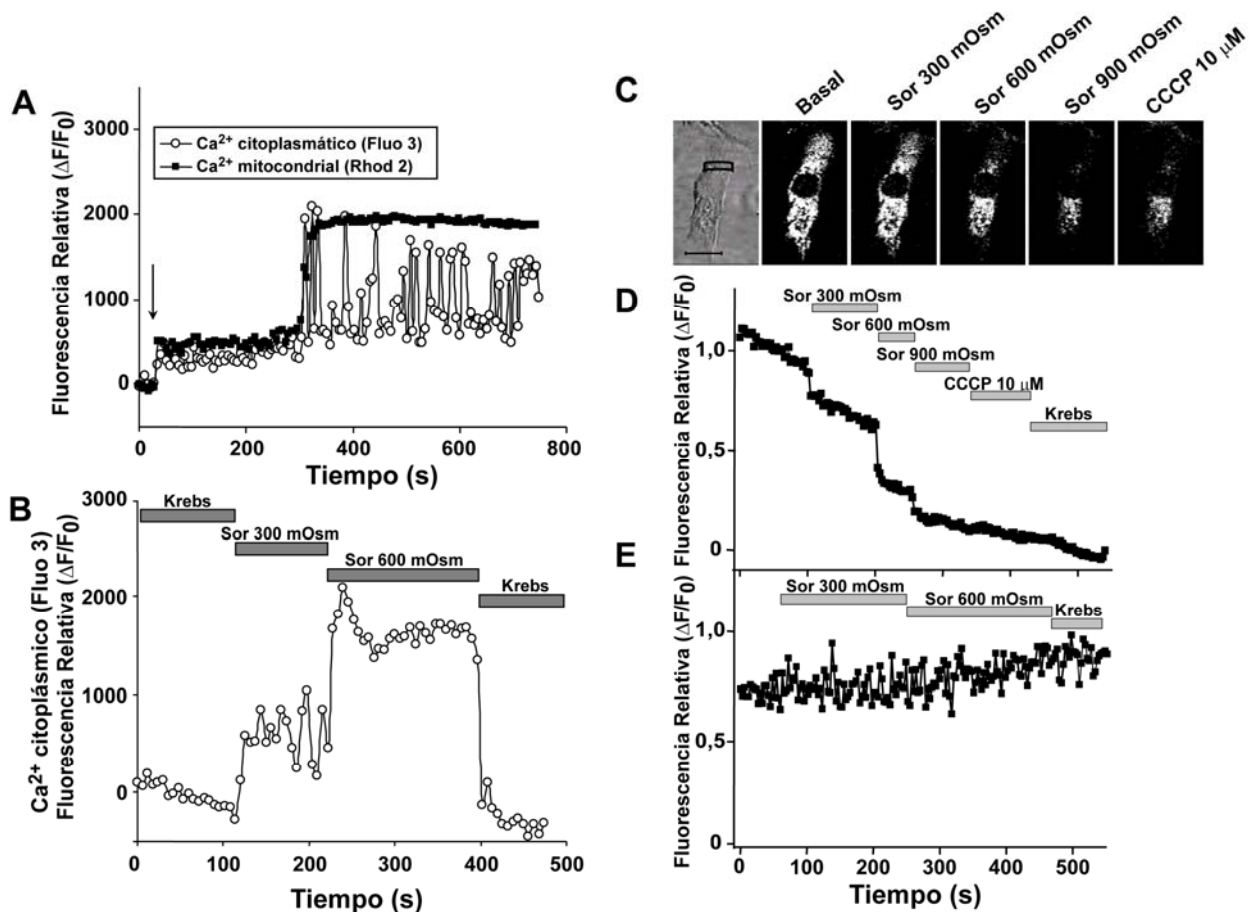


Figura 7. El estrés hiperosmótico induce aumentos citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+} que promueven una depolarización mitocondrial.

A) Cardiomiocitos mantenidos en Krebs con Ca^{2+} se preincubaron por 15 min a 4°C con Rhod2-AM ($5,4 \mu\text{M}$) para determinar Ca^{2+} mitocondrial (■) y luego por 30 min a temperatura ambiente con Fluo3-AM ($5,4 \mu\text{M}$) para determinar Ca^{2+} citoplasmático (○). Las células se lavaron y se estimularon (↓) con medio de cultivo conteniendo sorbitol (600 mOsm). Se capturaron imágenes cada 3 - 5 s con una configuración multi canal (canal A: Fluo3-AM, excitación 488 nm y emisión 526 nm; canal B: Rhod2-AM, excitación 543 nm y emisión 580 nm). B) Cardiomiocitos mantenidos en Krebs con Ca^{2+} se preincubaron por 30 min a temperatura ambiente con Fluo3-AM ($5,4 \mu\text{M}$), lavados y estimulados con Krebs conteniendo 300 o 600 mOsm sorbitol. C y D) Células mantenidas en Krebs con Ca^{2+} se preincubaron por 30 min con tetrametilrodamina metiléster (TMRM 100 nM) y luego expuestas a Krebs con Ca^{2+} suplementado con 300, 600 o 900 mOsm sorbitol. Se agregó el agente desacoplador CCCP ($10 \mu\text{M}$) para depolarizar completamente la mitocondria. C) Imágenes representativas de células precargadas con TMRM y tratadas con sorbitol y CCCP. La escala corresponde a $10 \mu\text{M}$. D) Se analizó la fluorescencia del TMRM en el área indicada en la célula mostrada en luz transmitida. E) Células mantenidas en Krebs sin Ca^{2+} se preincubaron con TMRM (100 nM), se lavaron y se expusieron a Krebs sin Ca^{2+} suplementados con 300 ó 600 mOsm sorbitol. Los resultados están expresados como fluorescencia relativa $[(F-F_0)/F_0]$ y son representativas de al menos 5 experimentos.

6.1.3. Estrés hiperosmótico y la activación de la apoptosis dependiente de caspasas

La depolarización de la mitocondria puede inducir la apertura del poro de transición mitocondrial, liberando factor inductor de la apoptosis (AIF) o citocromo c (127). El análisis por inmunofluorescencia de los cardiomiocitos en condiciones basales reveló que AIF se encuentra localizado en un patrón punteado en el citoplasma. La exposición de los cardiomiocitos hasta por 4 h al estrés hiperosmótico dependiente de sorbitol (600 mOsm) no modificó la localización de AIF (Figura 8A). La inmunolocalización de citocromo c también se visualizó como un patrón punteado en el citoplasma, muy similar al encontrado para AIF. Sin embargo, la exposición a estrés hiperosmótico por 2 h cambió el patrón punteado del citocromo c a una tinción más difusa (Figura 8B). Estos resultados sugieren que el estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) induce la liberación desde la mitocondria de citocromo c y no de AIF.

La exposición de los cardiomiocitos a un medio de cultivo que contiene sorbitol (600 mOsm) indujo la fragmentación de las procaspasas 3 y 9, con un máximo alrededor de las 2 h (Figura 9A). La fragmentación de la procaspasa 9 se correlacionó con un aumento de la actividad de la caspasa 9 (Figura 9B). Sin embargo, la preincubación de los cardiomiocitos con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk no protegió a los cardiomiocitos de la muerte inducida por sorbitol (600 mOsm) (Figura 9C), sugiriendo que el estrés hiperosmótico induce una muerte celular independiente de caspasas.

6.1.4. Estrés hiperosmótico y colapso metabólico

La depolarización mitocondrial se ha asociado con una disminución de la síntesis mitocondrial de ATP (128). El estrés hiperosmótico indujo a las 2 h de incubación una disminución del 25% del contenido ATP total de los cardiomiocitos (Figura 10). Esta reducción en el contenido del ATP sugiere que el estrés hiperosmótico induce la muerte de los cardiomiocitos por medio de un colapso metabólico, y no por un mecanismo de apoptosis dependiente de caspasa.

En resumen, estos resultados sugieren que el estrés hiperosmótico induce la entrada de Ca^{2+} desde el extracelular aumentando los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. Este aumento del Ca^{2+} causaría un aumento del Ca^{2+} mitocondrial el cual contribuiría a la depolarización mitocondrial. La reducción en la síntesis mitocondrial de ATP provocaría una disminución del contenido de ATP celular el que sería responsable de una muerte celular independiente de caspasa.

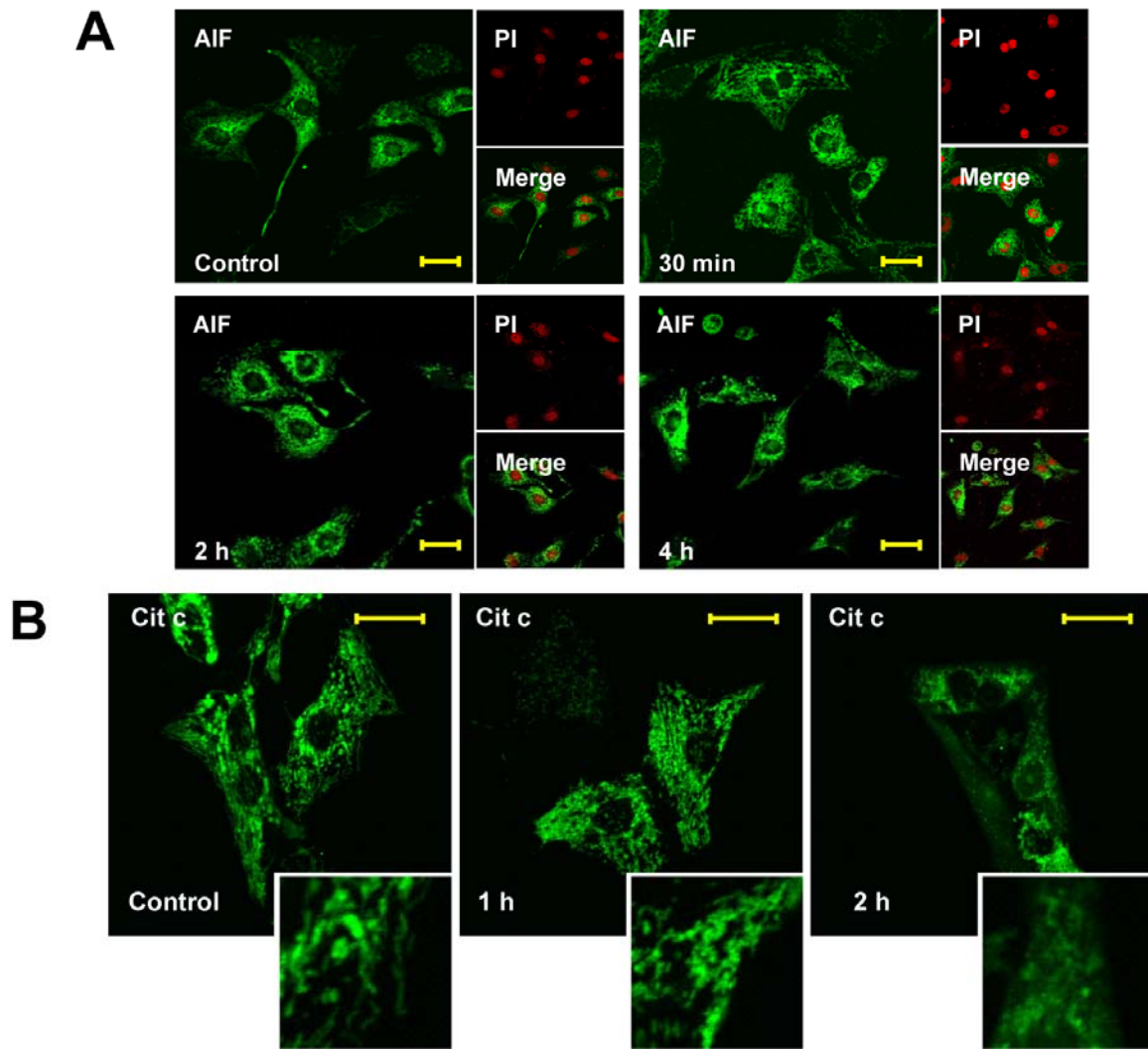


Figura 8. Estrés hiperosmótico induce salida de la mitocondria de citocromo c, pero no del factor inductor de la apoptosis (AIF).

Cardiomiocitos cultivados sobre cubreobjetos fueron expuestos a medio de cultivo conteniendo sorbitol (600 mOsm) y en los tiempos indicados fueron fijados, bloqueados con BSA e incubados con anticuerpo A) anti-factor inductor de apoptosis (AIF) o B) anti citocromo c (Cit c), y revelado con anticuerpo anti ratón IgG-Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (PI). La escala corresponde a 20 μ m. las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

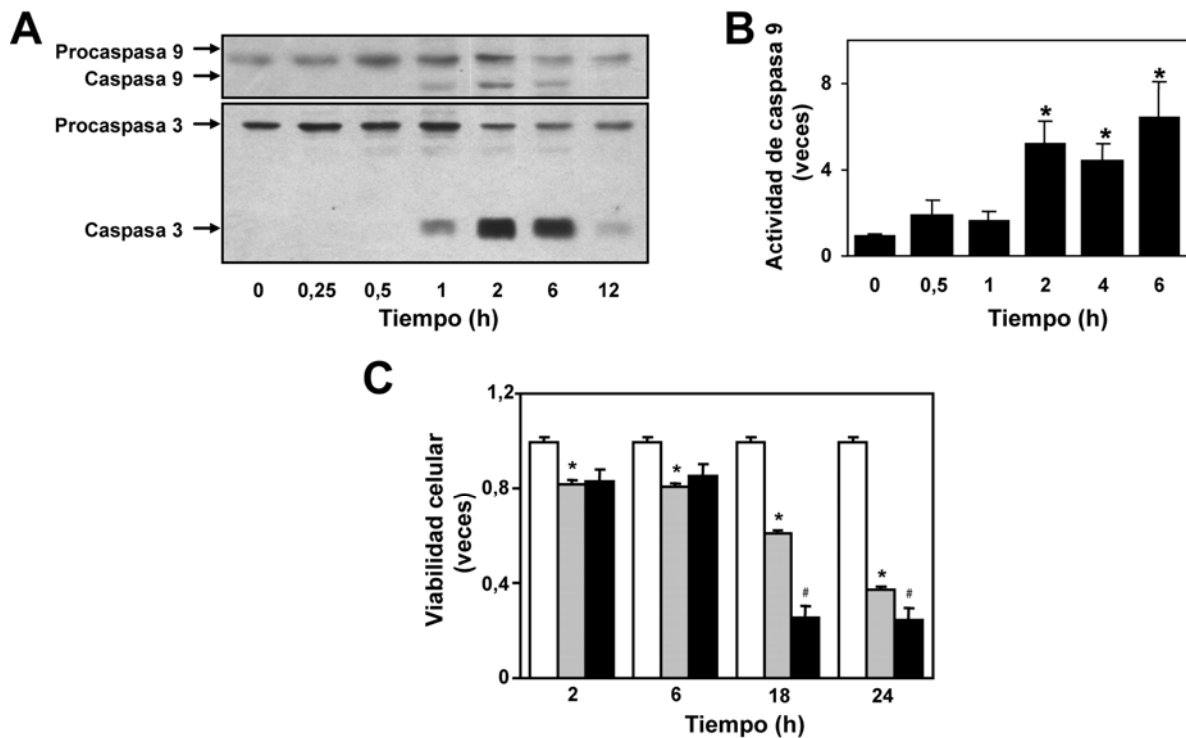


Figura 9. El estrés hiperosmótico induce activación de caspasas 3 y 9, pero no participan en la muerte inducida por sorbitol 600 mOsm.

Las células se expusieron a estrés hiperosmótico (sorbitol 600 mOsm) y a diferentes tiempos se obtuvieron extractos proteicos totales. A) Las procaspasas y caspasas 9 y 3 se detectaron por análisis de Western blot. Los geles son representativos de 5 experimentos diferentes. B) La actividad enzimática de caspasa 9 se determinó espectrofotométricamente usando Ac LEHD-pNA como sustrato. C) Los cardiomiocitos se incubaron con medio de cultivo (control, barras blancas), sorbitol (600 mOsm, barras grises) o sorbitol suplementado con el inhibidor general de caspasas Z VAD fmk (10 μ M, barras negras). A distintos tiempos las células viables se cuantificaron de por el método de exclusión del azul de tripán. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs 0 min, # $p < 0,05$ vs sorbitol.

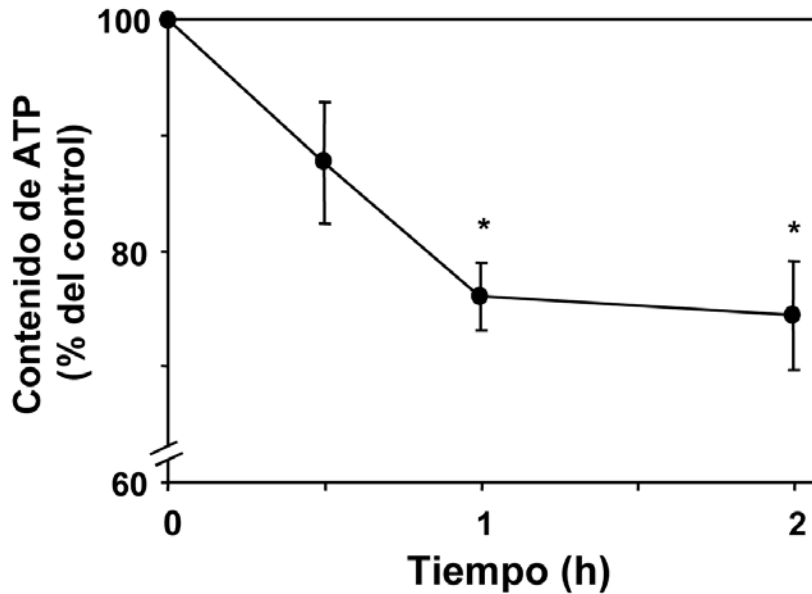


Figura 10. El estrés hiperosmótico induce disminución de los niveles intracelulares de ATP.

Los cardiomiocitos se expusieron a estrés hiperosmótico (sorbitol 600 mOsm) y a diferentes tiempos las células se lisaron y se obtuvieron extractos totales. El contenido total de ATP se determinó usando un ensayo de luciferina/luciferasa de acuerdo con lo indicado en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs 0 h.

6.1.5. Participación del Ca^{2+} extracelular en la muerte inducida por estrés hiperosmótico

Para evaluar la participación del Ca^{2+} extracelular en la muerte inducida por el estrés hiperosmótico, se evaluó la viabilidad de los cardiomiocitos en presencia de sorbitol (600 mOsm) variando la concentración de Ca^{2+} en el extracelular utilizando el quelante de Ca^{2+} EGTA. El medio de cultivo utilizado para la mantención de los cardiomiocitos contiene 1,8 mM Ca^{2+} . La adición de EGTA hasta una concentración final de 1 mM en el medio de cultivo no indujo la muerte de los cardiomiocitos. Concentraciones superiores a 1 mM EGTA final en el medio de cultivo indujo muerte de los cardiomiocitos caracterizado por una marcada fragmentación del DNA (Figuras 11A-B).

La adición de 0,5 mM EGTA al medio de cultivo, que produce aproximadamente 1,3 mM Ca^{2+} final en el medio de cultivo, no produjo ningún efecto sobre la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico, determinado por viabilidad celular y por fragmentación del DNA (Figuras 11A-B). Sin embargo, la adición al medio de cultivo de

1 mM EGTA, que produce aproximadamente 0,8 mM de Ca^{2+} libre, previno la muerte inducida por estrés hiperosmótico, determinado por viabilidad celular y por fragmentación del DNA (Figuras 11A-B). Concentraciones superiores a 1 mM EGTA final en el medio de cultivo indujo muerte de los cardiomiocitos sin diferencias significativas en los niveles de muerte en presencia y en ausencia de estrés hiperosmótico (Figuras 11A-B).

Estos resultados indican que la ausencia o niveles inferiores a 0,8 mM de Ca^{2+} en el medio extracelular inducen muerte de los cardiomiocitos. Además, sugieren que el estrés hiperosmótico requiere concentraciones superiores a 0,8 mM de Ca^{2+} en el medio de cultivo para poder inducir muerte celular. Probablemente sólo concentraciones superiores a 0,8 mM en el medio de cultivo permite la entrada de Ca^{2+} suficiente para provocar depolarización mitocondrial y con ello inducir la apoptosis independiente de caspasas.

Con el fin de evaluar si los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L están involucrados en la entrada de Ca^{2+} asociada a la muerte celular inducida por estrés hiperosmótico, se probó el efecto de nifedipino sobre la viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a sorbitol (600 mOsm). Para ello los cardiomiocitos se preincubaron 30 min con 1 o 5 μM nifedipino y luego se expusieron a sorbitol (600 mOsm). En estas condiciones se observó una disminución significativa en la fragmentación del DNA inducida por estrés hiperosmótico. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de muerte inducido por sorbitol (600 mOsm) (Figuras 11C-D).

Estos resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} desde el extracelular, probablemente a través de un canal de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L estaría involucrado en la muerte de los cardiomiocitos inducido por estrés hiperosmótico.

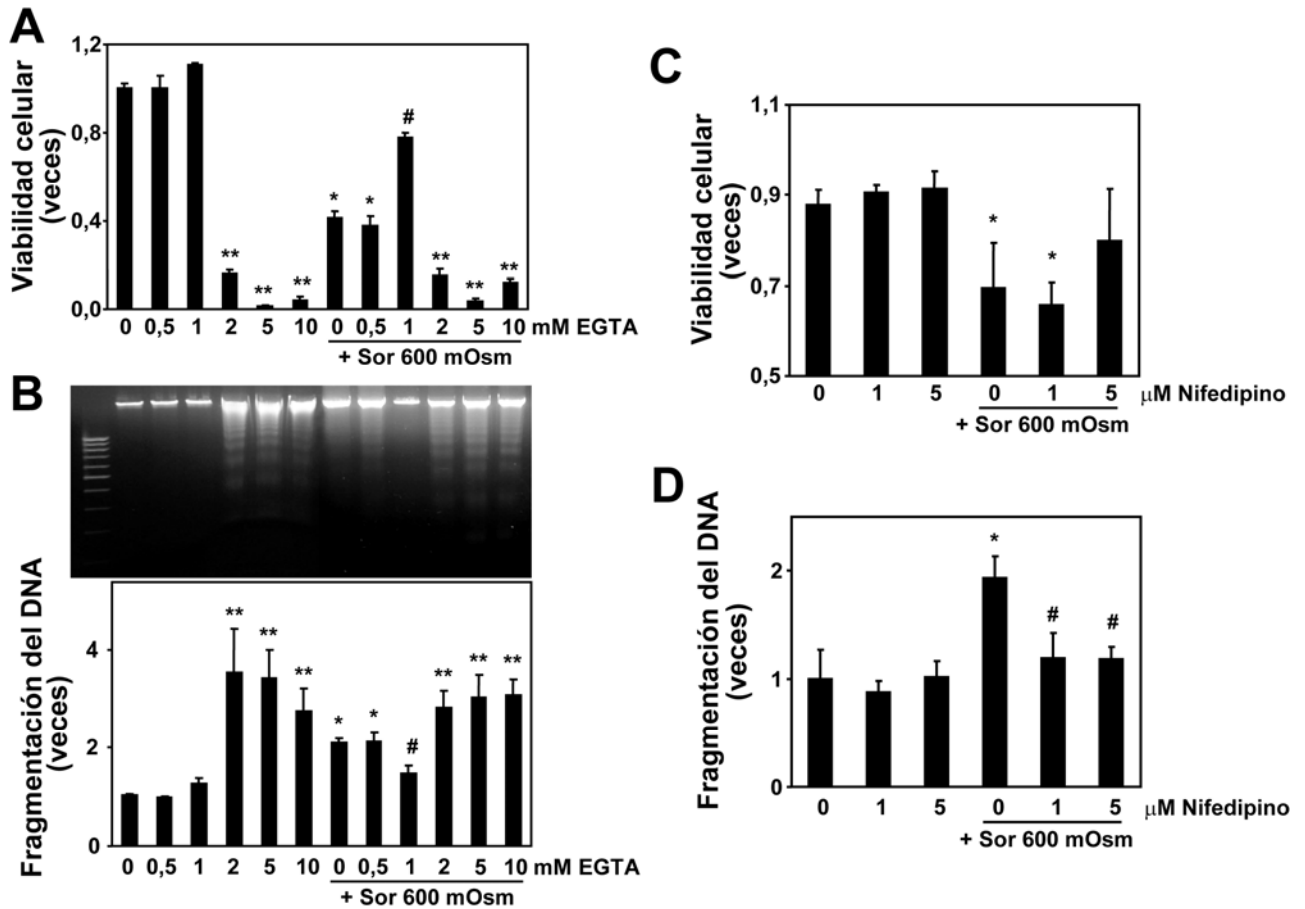


Figura 11. El Ca^{2+} extracelular es relevante para la muerte inducida por estrés hiperosmótico.

Las células se incubaron por 24 h en medio DME:199 (4:1) que contenía 0-10 mM EGTA con o sin sorbitol (600 mOsm). A) La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión del azul de tripán. B) El DNA se extrajo usando el método del fenol:cloroformo y se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizado por bromuro de etidio/UV. El estándar corresponde a un DNA ladder de 100 bp. Los resultados corresponden al promedio \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control (0 mM EGTA sin sorbitol); ** $p < 0,01$ vs control; # $p < 0,05$ vs 0 mM EGTA más sorbitol 600 mOsm. Las células se preincubaron por 30 min con 1 o 5 μM nifedipino y luego se expusieron por 24 h a DME:199 (4:1) suplementado con o sin sorbitol (600 mOsm, Sor). C) viabilidad celular y D) fragmentación del DNA. Los resultados corresponden al promedio \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control 0 μM nifedipino; # $p < 0,05$ vs 0 μM nifedipino más sorbitol 600 mOsm.

6.2. Efecto de la isquemia sobre TonEBP

Para resolver el objetivo específico 2: “Determinar si el factor de transcripción TonEBP se activa bajo condiciones de isquemia cardiaca *in vivo* e *in vitro*”, se procedió a evaluar en un modelo *in vivo* de infarto al miocardio la activación de TonEBP, medido como aumento de los niveles de este factor transcripcional, en tejido cardíaco. Como modelo *in vitro*, se utilizó cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas sometidas a isquemia simulada seguida de reperfusión. En este caso la activación de TonEBP se determinó midiendo el aumento de la masa de esta proteína y de la expresión de uno de sus genes blancos, la enzima AR.

Se ha descrito que la isquemia incrementa la osmolaridad extracelular (38,40). De acuerdo a lo descrito en la Figura 3, el incremento de la osmolaridad en el tejido cardíaco durante la isquemia se produciría por un aumento del número de moléculas intracelulares debido a la hidrólisis de ATP, ADP, creatina fosfato y de macromoléculas como glicógeno y ácidos grasos (40), detectándose una elevación de la osmolaridad extracelular de entre 50 a 60 mOsm en 60 min de isquemia (38,41,42). Sin embargo, se desconoce si TonEBP es activado durante la isquemia.

6.2.1. Efecto del infarto al miocardio sobre los niveles proteicos de TonEBP

Ratas Sprague-Dawley de 200 g se sometieron a infarto experimental por ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (IAM). Como control se utilizó un grupo de ratas sometidas al mismo procedimiento quirúrgico pero sin realizar la ligación de la arteria coronaria (Sham). El infarto al miocardio se confirmó por ecocardiografía y electrocardiograma 24 h después de la cirugía. El infarto experimental indujo un 33% de mortalidad en las primeras 48 h post cirugía. El tamaño del infarto, determinado por planimetría de la circunferencia endocárdica del ventrículo izquierdo usando secciones histológicas fue de $27 \pm 1\%$. Estos resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente por nuestro grupo (123).

La activación de TonEBP comprende dos mecanismos. El primero consiste en la activación del factor transcripcional preexistente y el segundo involucra el aumento de los niveles proteicos de TonEBP (76). Se determinó que a dos días post-infarto el nivel proteico de TonEBP en el sitio vecino al infarto aumentó $2,44 \pm 0,54$ veces ($p < 0,01$ vs Sham, $n=8$) respecto al control (Sham SVI). En el sitio del infarto se observó una disminución a $0,65 \pm 0,19$ veces respecto al control ($p < 0,01$ vs IAM SVI y no significativo vs Sham SI, $n=8$) (Figura 12).

El gen de AR es un blanco transcripcional del factor transcripcional TonEBP, por lo que un aumento de los niveles proteicos de esta enzima pueden ser usados como un indicador indirecto de la actividad transcripcional de TonEBP (73,129). Al comparar los niveles proteicos de AR en los corazones infartados con los provenientes de ratas Sham, se detectó una reducción no significativa en los niveles de esta enzima en el sitio del infarto. Por otra parte, en el sitio vecino del infarto no se observó ningún cambio en estos niveles (Figura 12).

El análisis por Western blot mostró que en el sitio del infarto, y no en el sitio vecino al infarto, la β -actina presentó degradación (Figura 12). Esto sugiere la existencia de muerte celular en esta región, y que la disminución observada en los niveles proteicos de TonEBP y de AR podrían estar asociadas a este fenómeno.

6.2.2. Efecto de la isquemia / reperfusión simulada sobre los niveles proteicos de TonEBP y aldosa reductasa

Como una manera de corroborar que la isquemia incrementa los niveles proteicos de TonEBP, se procedió a realizar experimentos *in vitro* de isquemia y reperfusión simulada en cardiomiocitos en cultivo.

Para ello, cultivos de cardiomiocitos provenientes de ratas neonatas se privaron de suero por 24 h y se sometieron a 30 ó 60 min de isquemia simulada. La isquemia simulada consistió en reemplazar el medio de mantención (DME:M199=1:4) con medio RPMI1640 (sin glucosa) suplementado con 20 mM 2-deoxiglucosa y 10 mM NaN_3 . La reperfusión se realizó reemplazando el medio isquémico con medio de mantención y posterior cultivo en condiciones de normoxia. Al realizar isquemia simulada por 30 ó 60 min, seguido por reperfusión de 4, 8, 12, 18 y 24 h, no se detectó reducción de la viabilidad celular superior al 10% (dato no mostrado).

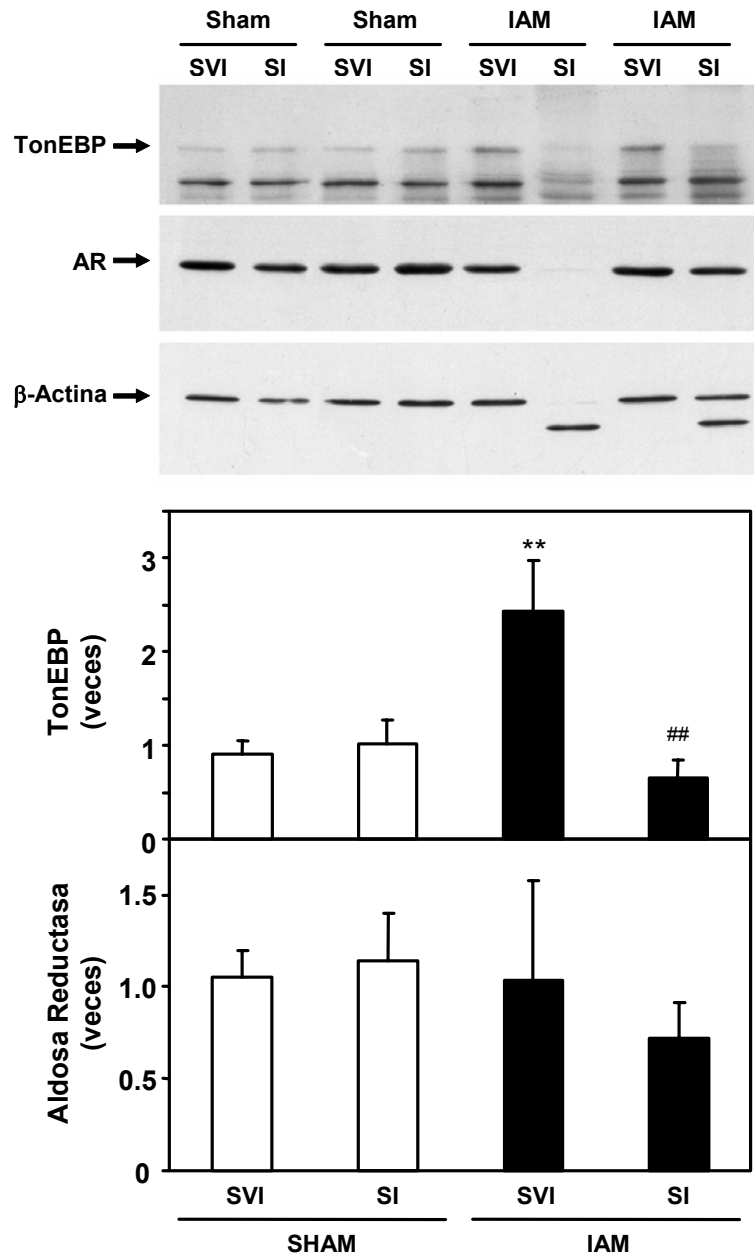


Figura 12. Efecto del infarto al miocardio sobre los niveles de TonEBP y aldosa reductasa.

Ratas Sprague-Dawley de 200 g se sometieron a una ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (IAM) o a una cirugía similar pero sin ligación de la arteria (Sham). El infarto se evaluó a las 24 h por ecocardiografía y las ratas se sacrificaron 48 h después de la cirugía. Los corazones se removieron y se obtuvieron tejidos del sitio del infarto (SI) o de sitios vecinos al infarto (SVI). Se prepararon extractos proteicos de ambos tejidos y cantidades iguales de proteínas se resolvieron por electroforesis, se sometieron a Western Blot, y se revelaron usando anticuerpos anti-TonEBP, aldosa reductasa (AR) y β-actina. El panel superior es un Western blot representativo de 2 ratas Sham y 2 ratas IAM. El panel inferior representa la cuantificación de los resultados obtenidos en 8 ratas Sham y 8 ratas IAM. ** $p < 0.01$ vs Sham SVI, ## $p < 0.01$ vs IAM SVI.

Al realizar isquemia simulada de 30 min seguida de reperfusión, se detectó un aumento significativo en los niveles proteicos de TonEBP a las 8 y 12 h de reperfusión con niveles de $2,9 \pm 0,5$ y $2,8 \pm 0,5$ veces el basal ($p < 0,05$ vs basal, $n=4$) (Figura 13). En forma paralela se detectó aumento significativo de los niveles proteicos de AR a las 12, 18 y 24 h de reperfusión ($1,9 \pm 0,3$, $1,7 \pm 0,2$ y $1,9 \pm 0,4$ veces el basal, respectivamente; $p < 0,05$ vs basal, $n=4$) (Figura 13).

En la isquemia simulada de 60 min se detectó aumentos significativos en los niveles de TonEBP a las 12 y 24 h de reperfusión ($2,1 \pm 0,6$ y $1,5 \pm 0,4$ veces el basal, respectivamente; $p < 0,05$ vs basal, $n=4$) (Figura 14). En cambio, se detectaron incrementos significativos en los niveles proteicos de AR a las 4 y 8 h de reperfusión ($1,5 \pm 0,2$ y $1,9 \pm 0,5$ veces el basal, $p < 0,05$ vs basal, $n=4$) (Figura 14).

Debido a que TonEBP está relacionado con la regulación del volumen celular, se quiso investigar también la asociación de este factor transcripcional con la hipertrofia de los cardiomiocitos. La hipertrofia se caracteriza por un aumento del tamaño celular asociado con un incremento de la maquinaria contráctil de la célula cardiaca. Como marcador de hipertrofia se evaluó la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) (6). Se determinó que la isquemia de 30 min muestra una tendencia a la reducción en los niveles proteicos de β -MHC. Esta reducción alcanza significancia estadística con la isquemia simulada de 60 min ($0,6 \pm 0,2$ vs basal; $p < 0,05$ vs basal, $n=4$) (Figuras 13 y 14).

Independientemente si la isquemia fue de 30 ó 60 min, la reperfusión por 8 h incrementó significativamente los niveles de β -MHC en ambos casos a $1,6 \pm 0,2$ veces el basal ($p < 0,05$ vs basal, $n=4$) (Figuras 13 y 14).

Como controles de carga se utilizaron los niveles proteicos de β -actina y β -tubulina. No se observaron cambios relativos entre estos dos controles de carga en ninguno de estos experimentos (Figuras 13 y 14).

Estos resultados indican que la isquemia / reperfusión induce el aumento en los niveles proteicos de TonEBP y AR, sugiriendo una activación de este factor de transcripción.

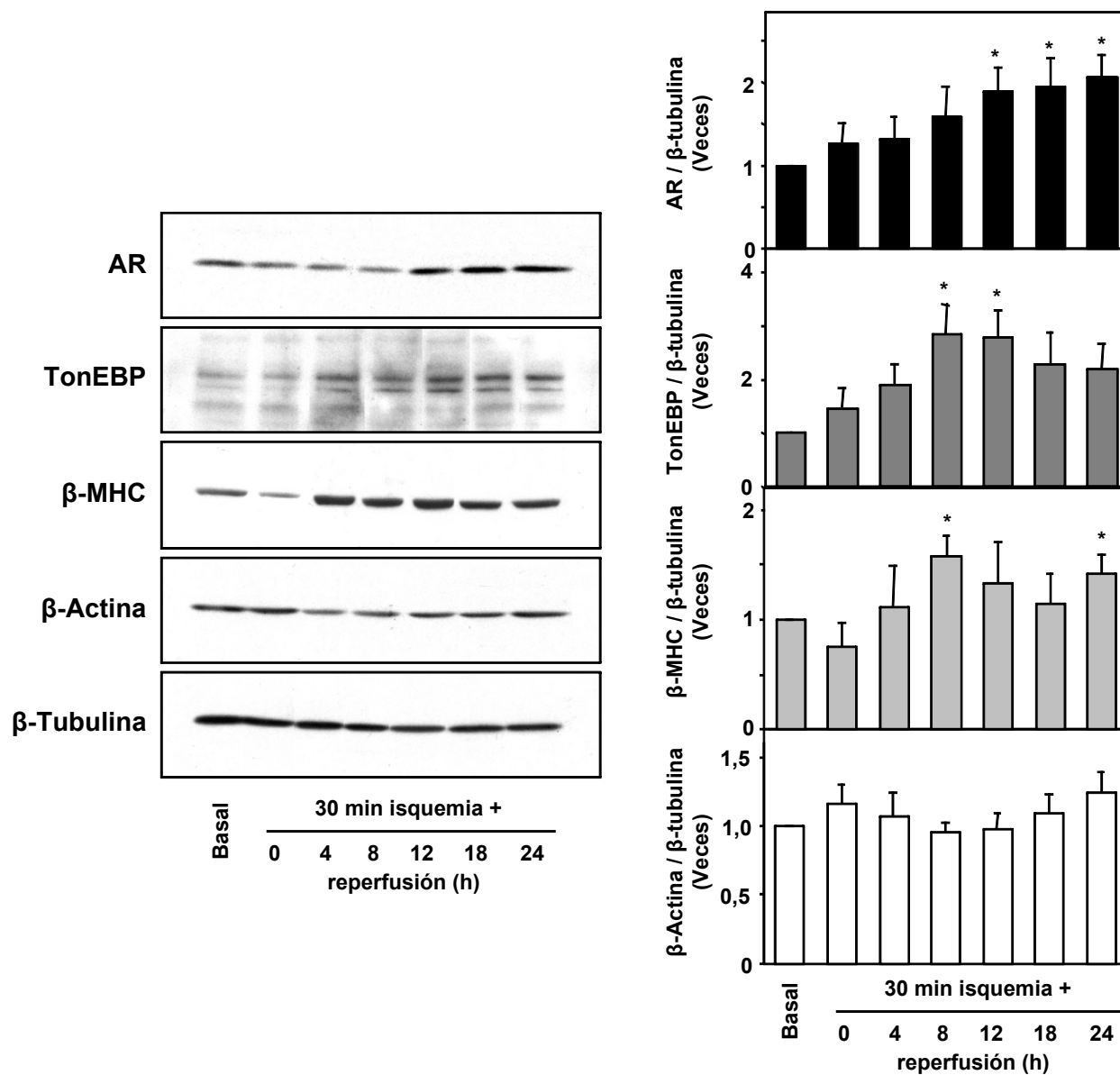


Figura 13. Efecto de 30 min de isquemia química y posterior reperfusion sobre los niveles de TonEBP, aldosa reductasa (AR), β-MHC y β-actina.

Cardiomiocitos en cultivo se sometieron a isquemia química por incubación a 37°C en medio de RPMI 1640 (libre de glucosa) suplementado con 10 mM Na₃ y 20 mM deoxiglucosa. Al cabo de 30 min las células se lavaron y se les agregó medio de mantención (DMEM:M199=4:1) y se incubaron a 37°C en 95% aire/5% CO₂ por diferentes tiempos. Se prepararon extractos proteicos totales y se analizaron por Western blot. El panel izquierdo representa un Western blot representativo y el panel derecho representa la cuantificación de 4 experimentos independientes. *p<0,05 vs basal.

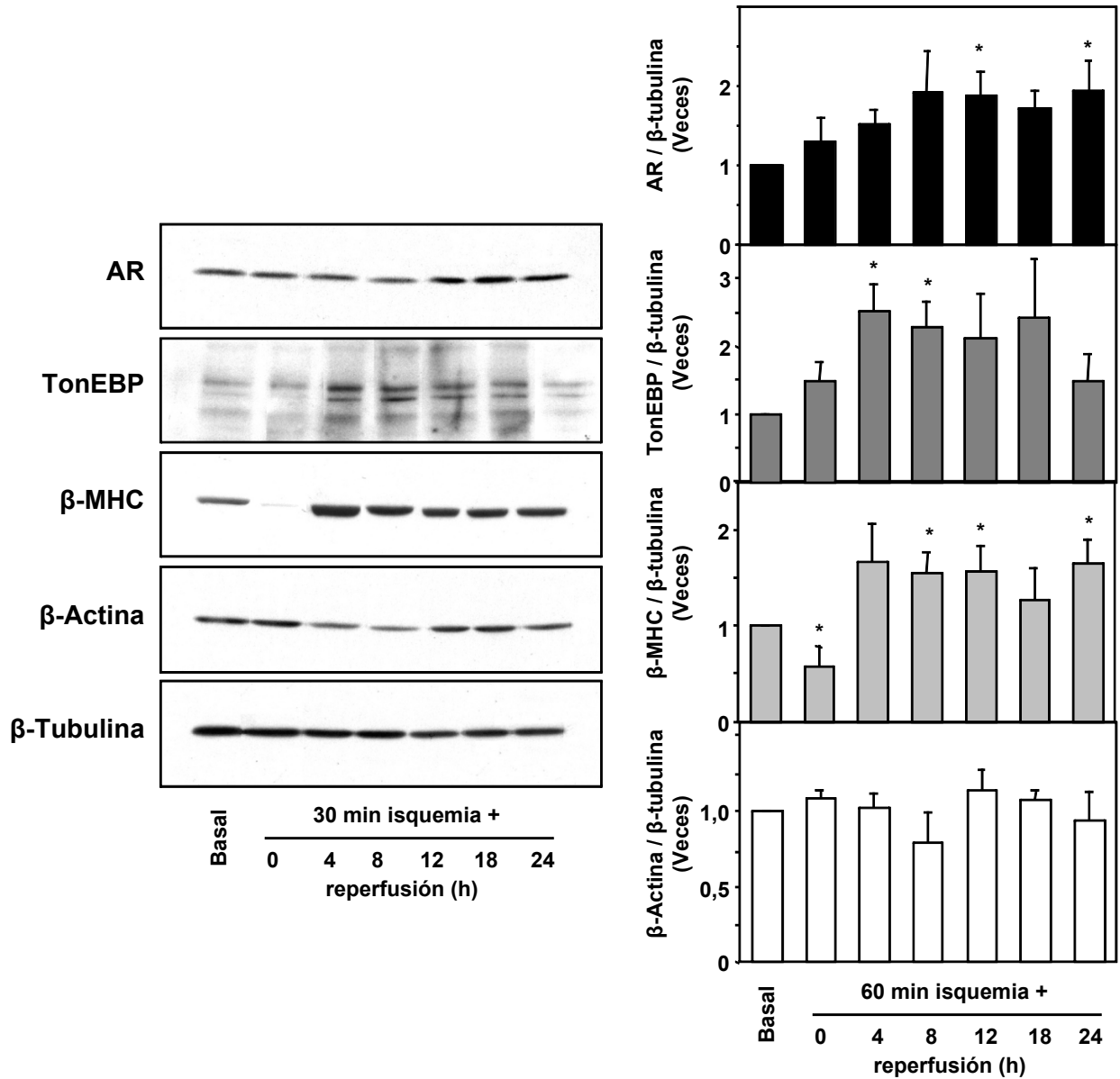


Figura 14. Efecto de 60 min de ischemia química y posterior reperfusion sobre los niveles de TonEBP, aldosa reductasa, β-MHC y β-actina.

Cardiomiocitos en cultivo se sometieron a ischemia química por incubación a 37°C en medio de RPMI 1640 (libre de glucosa) suplementado con 10 mM NaN_3 y 20 mM deoxiglucosa. Al cabo de 60 min las células se lavaron y se les agregó medio de mantención (DMEM:M199=4:1) y se incubaron a 37°C en 95% aire/5% CO_2 por diferentes tiempos. Se prepararon extractos proteicos totales y se analizaron por Western blot. El panel izquierdo representa un Western blot representativo y el panel derecho representa la cuantificación de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs basal.

6.3. Efecto de TonEBP en la viabilidad de los cardiomiocitos

Para desarrollar el objetivo específico 3: “Determinar el efecto directo de TonEBP en la viabilidad del cardiomiocito”, se procedió inicialmente a desarrollar herramientas genéticas que pudieran ser usadas para activar y/o inhibir la actividad del factor transcripcional TonEBP. Fue necesario el desarrollo de estas herramientas, ya que actualmente no existen disponibles activadores y/o inhibidores farmacológicos para TonEBP. Se desarrollaron adenovirus que sobreexpresan TonEBP dominante negativo (dnTonEBP) y TonEBP silvestre (wtTonEBP).

Posteriormente se evaluó *in vitro* el efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP en la viabilidad de los cardiomiocitos, e *in vivo* por la transducción adenoviral de corazones de rata con los dos virus recombinantes desarrollados.

6.3.1 Fabricación de adenovirus que sobreexpresan TonEBP dominante negativo (dnTonEBP) y TonEBP silvestre (wtTonEBP)

6.3.1.1. Subclonamiento de los genes que codifican para dnTonEBP y wtTonEBP en un vector adenoviral

Los genes que codifican para wtTonEBP y dnTonEBP se subclonaron en los vectores lanzadera adenoviral pDC316 y pDC32, según la estrategia descrita en las Figuras 15 y 16, respectivamente. El vector pDC32 / wtTonEBP se obtuvo por linearización del vector adenoviral pDC32 con una doble digestión BamH I / Sal I y ligación con el gen wtTonEBP contenido en un fragmento BamH I / Xho I de 4.653 bp. El vector pDC316 / dnTonEBP se obtuvo por linearización del vector adenoviral pDC316 con una doble digestión Bgl II / EcoICR I y ligación con el gen dnTonEBP contenido en un fragmento BamH I / Pme I de 1.416 bp. La identidad de ambos vectores se verificó por digestión con enzimas de restricción.

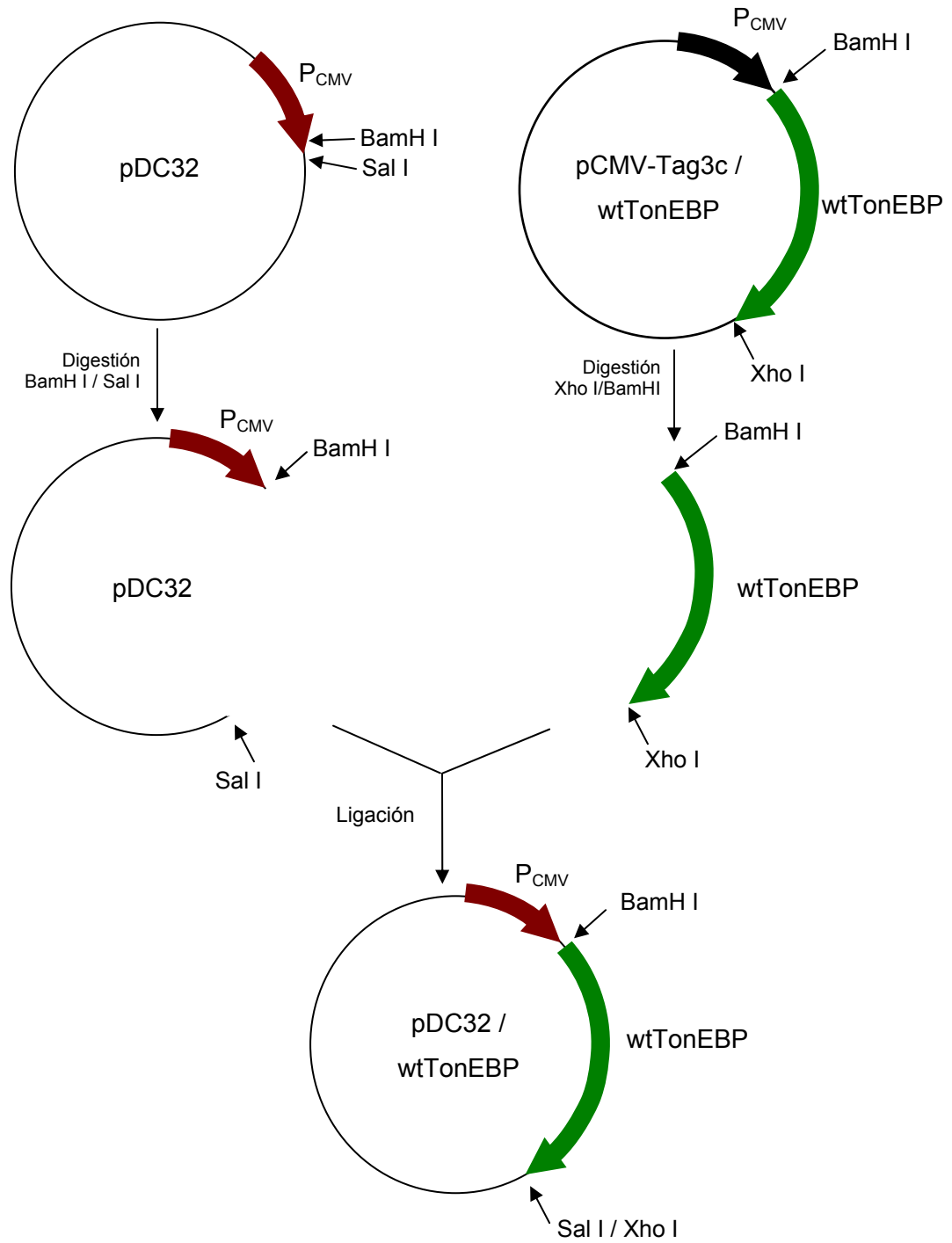


Figura 15. Esquema de subclonamiento del gen que codifica para wtTonEBP en el vector adenoviral pDC32.

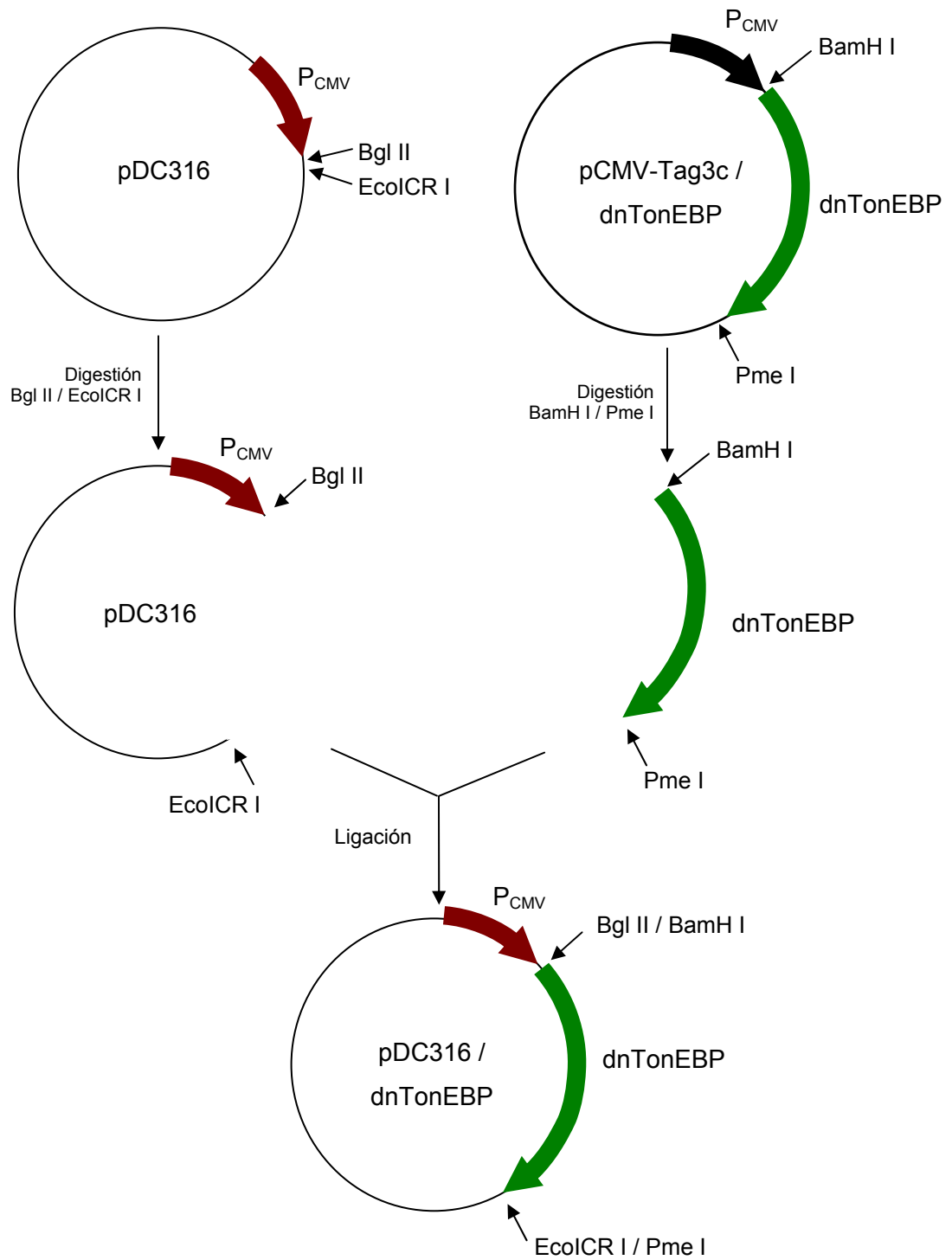


Figura 16. Esquema de subclonamiento del gen que codifica para dnTonEBP en el vector adenoviral PDC316.

6.3.1.2. Obtención de los adenovirus que sobreexpresan dnTonEBP (Ad dnTonEBP) y wtTonEBP (Ad wtTonEBP)

Posteriormente, los vectores pDC316 / dnTonEBP y pDC32 / wtTonEBP se cotransfectaron con el plasmidio pBHGlox Δ E1,3Cre en células HEK293. Los adenovirus recombinantes se generaron por recombinación Cre-LoxP (130) entre ambos plasmidios (Figura 17). Esta reacción es posible gracias a la recombinasa Cre, que cataliza la recombinación trans entre el sitio loxP de pBHGloxP Δ E1,3Cre y el sitio loxP del plasmidio pDC32 / wtTonEBP ó pDC316 / dnTonEBP, transfiriendo así el gen que codifica para wtTonEBP o dnTonEBP hacia pBHGloxP Δ E1,3Cre. El adenovirus recombinante así obtenido tiene ahora un sólo sitio loxP.

Se realizaron series de 4 experimentos (1 por semana) de 6 placas de cultivo cada uno, 18 placas en total, cotransfectando el plasmidio pDC316 / dnTonEBP con el plasmidio pBHGloxP Δ E1,3Cre, y 24 placas más, pero cotransfectando el plasmidio pDC32 / wtTonEBP con el plasmidio pBHGloxP Δ E1,3Cre. En forma paralela, como control de la generación de adenovirus, se realizó la cotransfección de 24 placas con el plasmidio pDC316 con pBHGloxP Δ E1,3Cre, que permitió la obtención de adenovirus vacío (Ad vacío). A partir de los 30 días post-cotransfección comenzaron a aparecer placas que mostraban lisis de células. Con el objeto de determinar que la lisis era debida a la presencia de partículas adenovirales, 1 mL del sobrenadante de las placas sospechosas se agregaron a placas de 100 mm sembradas con HEK293 60% confluentes. Los clones positivos produjeron lisis celular al cabo de 2 a 3 días post-transducción. Usando este procedimiento se logró obtener 23 clones de Ad vacío, 8 clones de Ad wtTonEBP y 2 clones de Ad dnTonEBP.

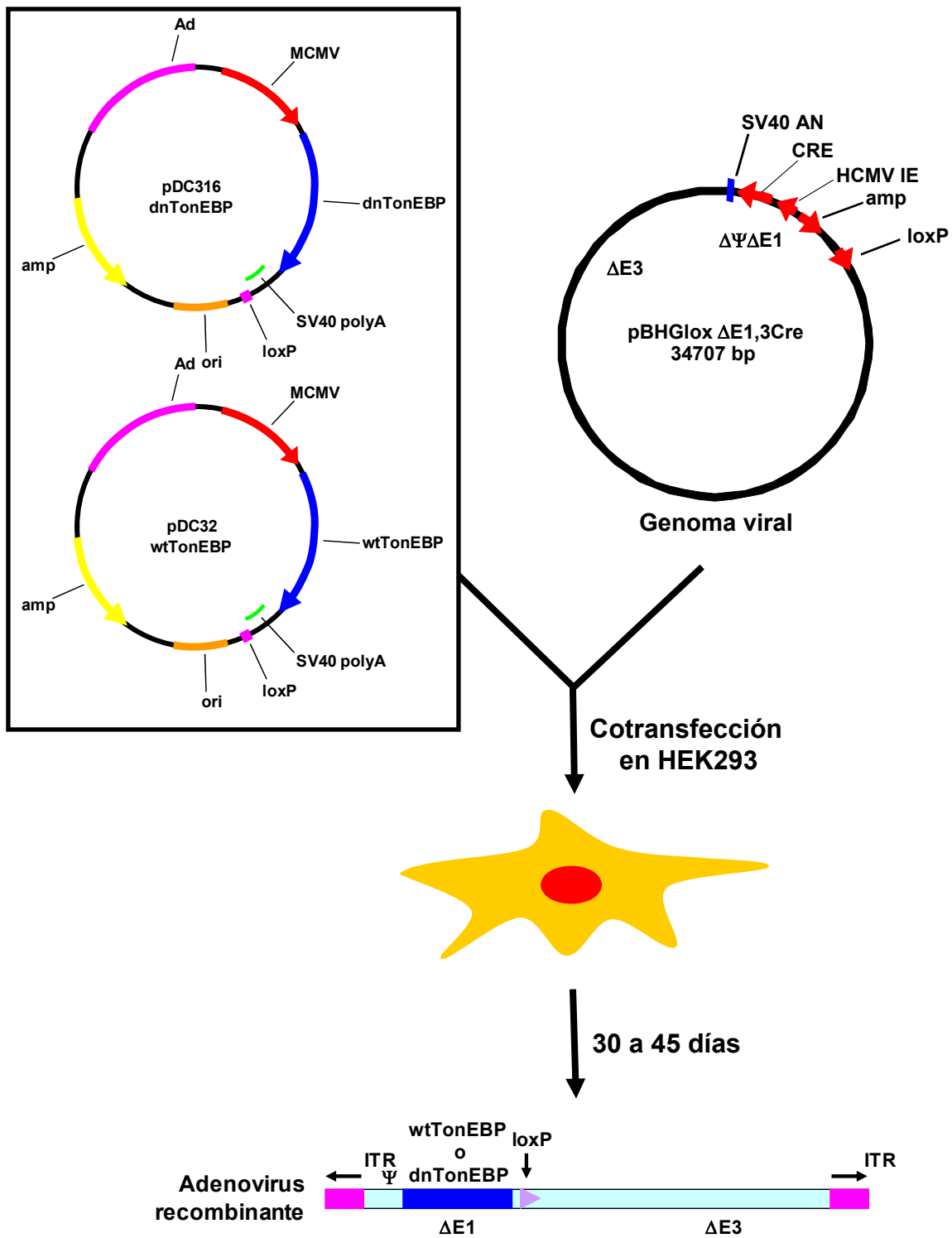


Figura 17. Procedimiento empleado para la obtención de los adenovirus recombinantes Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP.

6.3.1.3. Sobreexpresión de dnTonEBP y wtTonEBP mediante transducción adenoviral en células HEK293 y cardiomiocitos en cultivo

Con el objeto de determinar si los adenovirus fabricados sobreexpresaban wtTonEBP o dnTonEBP, se procedió a transducir HEK293 por 24 h y se determinó los niveles de TonEBP en extractos proteicos totales de estas células mediante Western blot. En la Figura 18 se muestra un ejemplo de estos resultados. En el carril 1 corresponde a células HEK293 no transducidas y se puede detectar la presencia de TonEBP endógeno. En los carriles 2-5 corresponden extractos proteicos obtenidos de HEK293 transducidas con 4 clones de Ad vacío. Los carriles 6-11 corresponden a extractos proteicos obtenidos de 293 transducidas con 6 clones de Ad wtTonEBP.

En la Figura 19 se muestra la sobreexpresión de dnTonEBP mediante dos clones de Ad dnTonEBP en células HEK293. Ya que el dnTonEBP corresponde sólo a los primeros 472 aminoácidos del wtTonEBP (131) esta proteína es reconocida por un anticuerpo dirigido al extremo amino terminal de wtTonEBP, pero no por un anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo terminal de este factor transcripcional (Figura 19).

Con el objeto de determinar si ambos adenovirus eran capaces de sobreexpresar dnTonEBP y wtTonEBP en cardiomiocitos en cultivo, se procedió a transducir cardiomiocitos con diferentes MOIs de Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP. Ambos adenovirus sobreexpresaron sus respectivas proteínas en forma dependiente del MOI empleado. Además, Ad dnTonEBP redujo los niveles endógenos basales de TonEBP, siendo este efecto significativo a partir de MOI 300 (Figura 20).

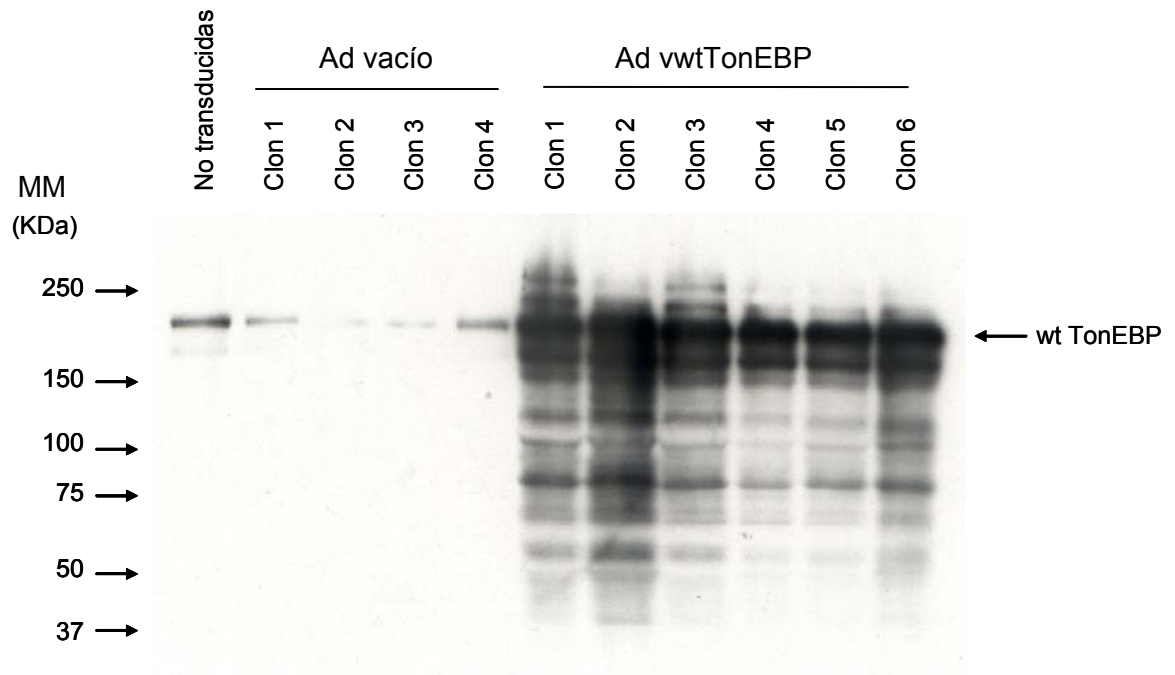


Figura 18. Obtención de adenovirus que sobreexpresa wtTonEBP.

Se subclonó el gen de TonEBP tipo silvestre (wtTonEBP) en el vector adenoviral pDC32. El plasmidio pDC32/wtTonEBP obtenido se cotransfectó con el plasmidio pBHGLox Δ E1,3Cre en células HEK293. Las células transfectadas se incubaron entre 30 y 45 días hasta la aparición de los adenovirus recombinantes. Después de purificar los adenovirus, éstos se usaron para transducir células HEK293. Después de 24 h se prepararon extractos proteicos, se revolvieron por electroforesis y se analizaron por Western blot usando un anticuerpo anti-TonEBP. La figura muestra la sobreexpresión de wtTonEBP por 6 diferentes clones adenovirales. Como control de fabricación de adenovirus se produjeron 4 adenovirus vacíos.

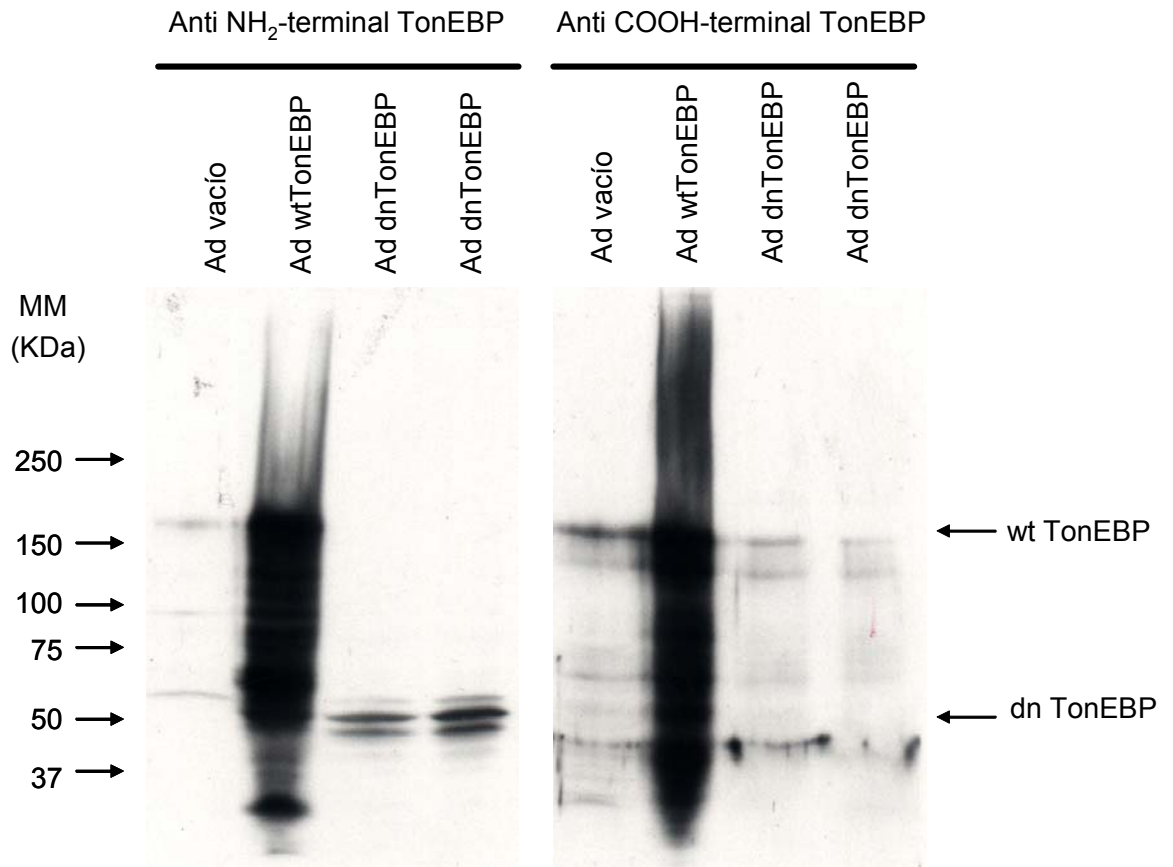


Figura 19. Obtención de adenovirus que sobreexpresa dnTonEBP.

Se subclonó el gen de un dominante negativo TonEBP (dnTonEBP) en el vector adenoviral pDC316. Se cotransfectó el plasmidio pDC316/dnTonEBP con el plasmidio pBHGLox Δ E1,3Cre en células HEK293. Las células transfectadas se incubaron entre 30 y 45 días hasta la aparición de los adenovirus recombinantes. Después de purificar los adenovirus, éstos se usaron para transducir células HEK293. Después de 24 h se prepararon extractos proteicos, se revolvieron por electroforesis y se analizaron por Western blot usando un anticuerpo anti el extremo amino terminal de TonEBP (panel izquierdo) o un anticuerpo anti el carboxilo terminal de TonEBP (panel derecho). Sólo el anticuerpo anti amino terminal de TonEBP reconoce al dnTonEBP. La figura muestra la sobreexpresión de dnTonEBP por 2 diferentes clones adenovirales.

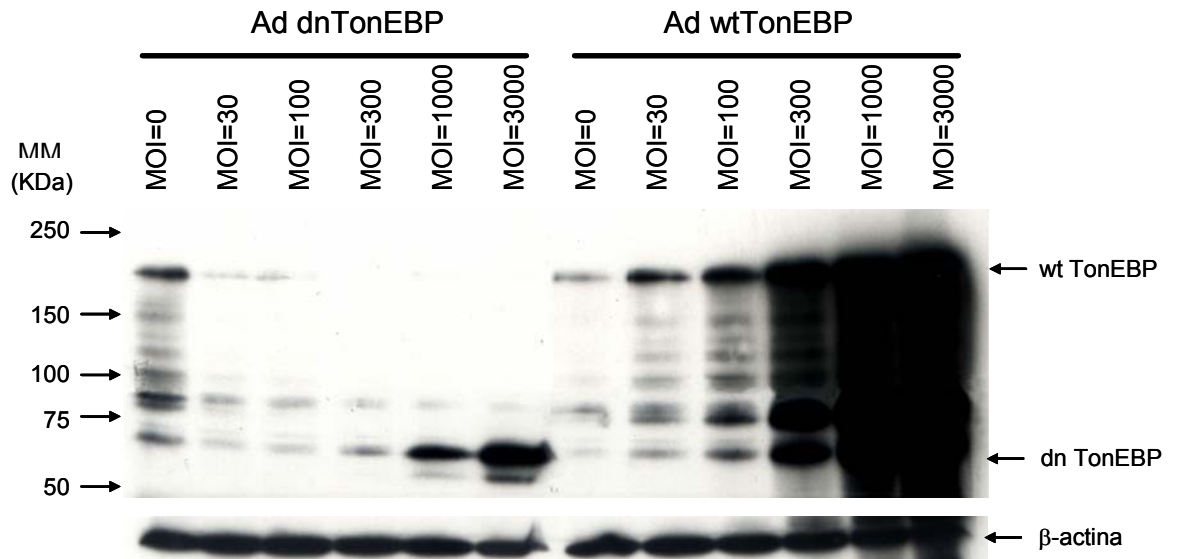


Figura 20. Sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP en cardiomiocitos de rata.

Cardiomiocitos en cultivo se transducieron con los adenovirus wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando distintas multiplicidades de infección (MOI). Después de 24 h, las células se lisaron, se obtuvieron extractos proteicos, se resolvieron por electroforesis y se analizaron por Western blot usando un anticuerpo amino terminal de TonEBP. Se determinó β -actina como control de carga.

6.3.2. Evaluación de la funcionalidad de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP

Con el objeto de determinar si ambos adenovirus son funcionales, se procedió a determinar los niveles de AR al sobreexpresar dnTonEBP y wtTonEBP. AR es una enzima cuya expresión es controlada por este factor transcripcional y por lo tanto puede ser usada como un indicador de la activación transcripcional de TonEBP (52,95,96).

6.3.2.1. Efecto de la sobreexpresión adenoviral de dnTonEBP y wtTonEBP sobre los niveles de aldosa reductasa

Se transdujeron cardiomiocitos con MOIs entre 300 y 10.000 de Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP y se evaluó los niveles de AR. La transducción con distintos MOIs de Ad dnTonEBP no alteró los niveles basales de AR. Sin embargo, de acuerdo a lo esperado, los niveles de AR aumentaron con la transducción en forma MOI-dependiente de Ad wtTonEBP. En cardiomiocitos transducidos con Ad wtTonEBP (MOI 10.000) se detectó un incremento de AR de $13,1 \pm 9,5$ veces respecto al control ($p < 0,05$ vs cardiomiocitos sin transducir) (Figura 21).

Al realizar el mismo experimento anterior, pero en condiciones de hiperosmolaridad (600 mOsm sorbitol), se observó un aumento en los niveles de basales AR. Este aumento presentó una tendencia a ser inhibida en forma dependiente del MOI por Ad dnTonEBP, alcanzándose con MOI 10.000 a $0,62 \pm 0,12$ veces respecto al control sin transducir. En estas condiciones, la sobreexpresión de wtTonEBP aumentó $2,3 \pm 0,3$ veces los niveles de AR ($p < 0,05$ respecto a cardiomiocitos sin transducir) (Figura 22).

En forma interesante, ambos adenovirus modificaron los niveles de β -actina y β -MHC. En condiciones de iso-osmolaridad Ad dnTonEBP no modificó los niveles basales de β -actina y de β -MHC. Sin embargo, la transducción de cardiomiocitos con Ad wtTonEBP MOI 10.000 incrementó $9,5 \pm 8,4$ veces los niveles de β -actina ($p < 0,05$ vs cardiomiocitos sin transducir) y redujo a $0,06 \pm 0,01$ veces los niveles de β -MHC ($p < 0,05$ vs cardiomiocitos sin transducir) (Figura 21). En condiciones de hiperosmolaridad (600 mOsm sorbitol), la transducción con Ad dnTonEBP MOI 10.000 redujo no significativamente los niveles basales de β -actina ($0,33 \pm 0,03$ veces respecto a cardiomiocitos no transducidos), incrementando también no significativamente los niveles de β -MHC ($1,72 \pm 0,82$ veces respecto a cardiomiocitos no transducidos). En cambio la transducción con Ad wtTonEBP MOI 10.000 incrementó los niveles de β -actina a $5,4 \pm 1,4$ veces ($p < 0,05$ respecto a cardiomiocitos no transducidos) y redujo los niveles de β -MHC a $0,23 \pm 0,21$ ($p < 0,05$ respecto a cardiomiocitos no transducidos) (Figura 22).

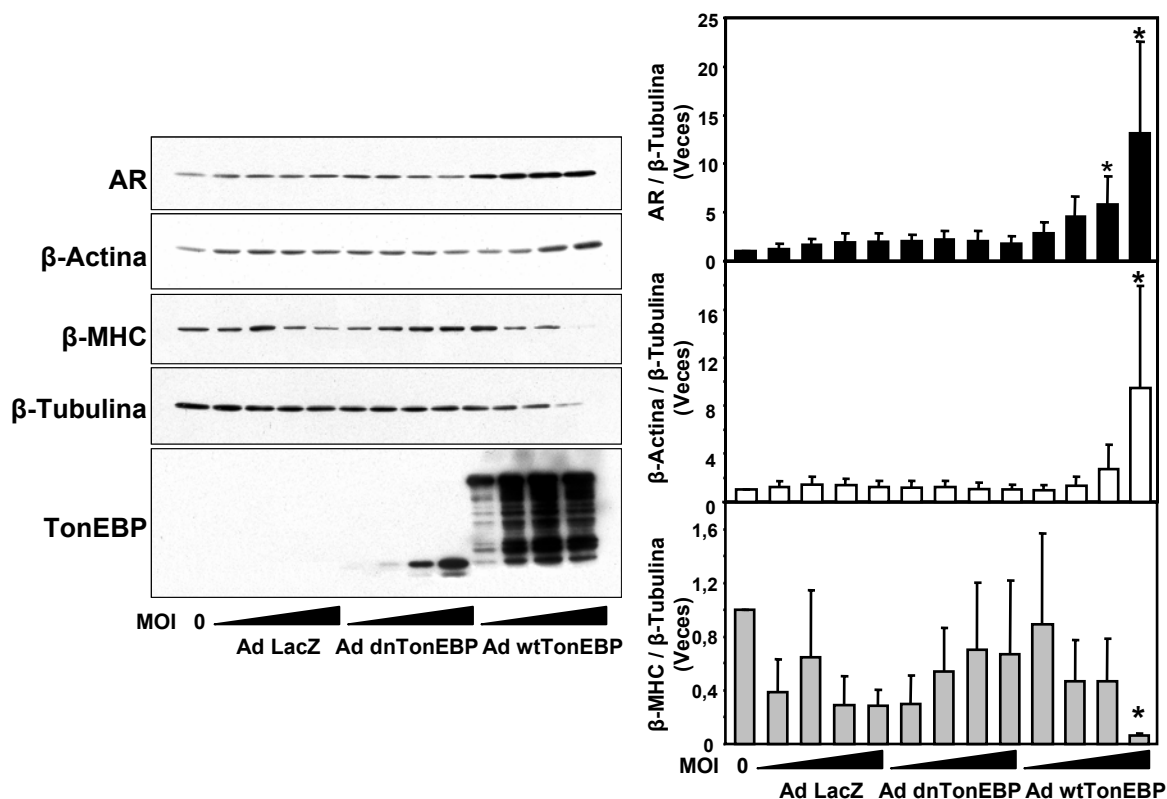


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles de aldosa reductasa, β -actina y β -MHC en cardiomiocitos en condiciones basales.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) y dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando multiplicidades de infección (MOI) de 300, 1.000, 3.000 y 10.000. Después de 24 h, las células se lavaron y se incubaron con medio de mantención por otras 24 h. Las células se lisaron, se prepararon extractos proteicos totales y se analizaron por Western blot usando los anticuerpos anti TonEBP, aldosa reductasa (AR), β -actina, cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) y β -tubulina. El panel izquierdo representa Western blots representativos y el panel derecho representa la cuantificación de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden al promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control sin transducir.

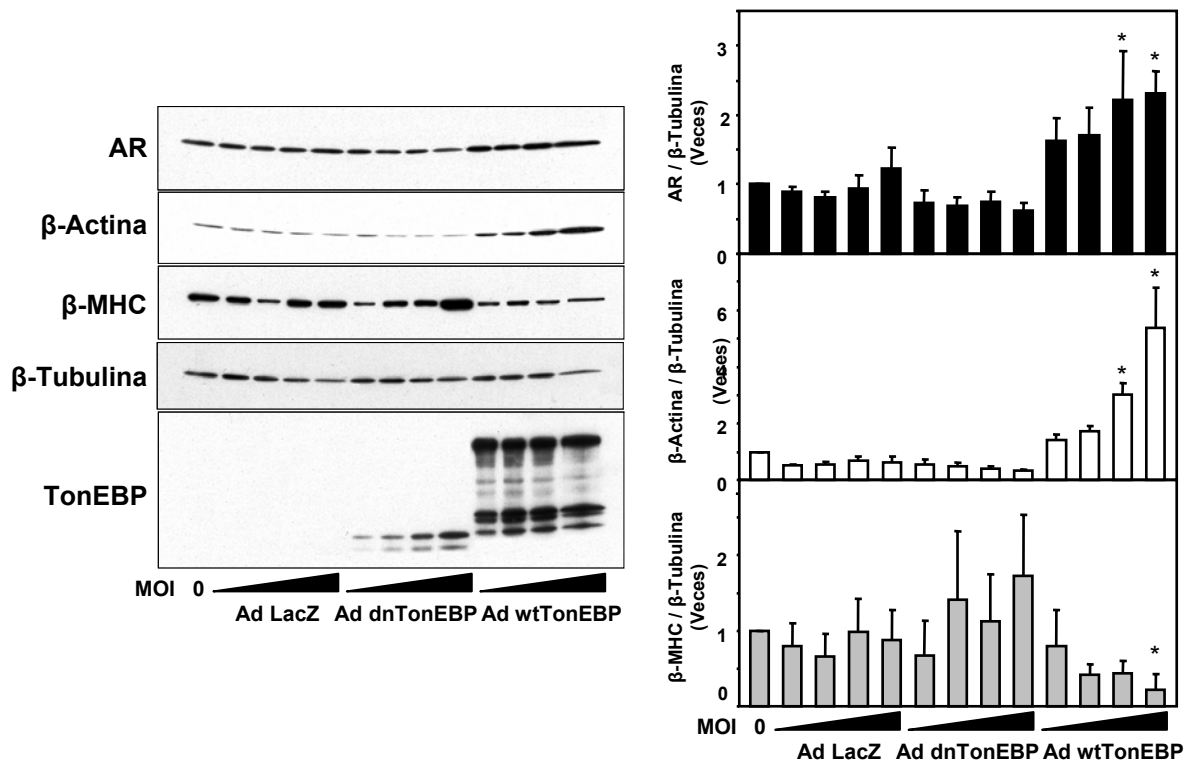


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles de aldosa reductasa, β -actina y β -MHC en cardiomiocitos sometidos a estrés osmótico con sorbitol 600 mOsm.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) y dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando multiplicidades de infección (MOI) de 300, 1.000, 3.000 y 10.000. Después de 24h, las células se lavaron y se incubaron con medio de mantención conteniendo sorbitol 600 mOsm por otras 24 h. Las células se lisaron, se prepararon extractos proteicos totales y se analizaron por Western blot usando los anticuerpos anti TonEBP, aldosa reductasa (AR), β -actina, cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) y β -tubulina. El panel izquierdo representa Western blots representativos y el panel derecho representa la cuantificación de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden al promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control sin transducir.

Estos resultados sugieren que ambos adenovirus, Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP, son funcionales, pudiendo activar y reprimir la expresión de genes controlados por TonEBP.

6.3.2.2. Efecto de los adenovirus Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la morfología del citoesqueleto de cardiomiocitos en cultivo

Debido al efecto que demostraron tener ambos adenovirus sobre los niveles de β -actina y β -MHC, se procedió a analizar por inmunohistoquímica el efecto de Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre el citoesqueleto de cardiomiocitos. Para ello cardiomiocitos de rata neonata se transdujeron con Ad LacZ, Ad wtTonEBP o Ad dnTonEBP usando MOI 3.000. Después de 48 h las células se fijaron con metanol, se bloquearon con BSA, y se incubaron con anticuerpo anti-AR y segundo anticuerpo-FITC (verde). Después de lavar, las células se trataron con faloidina-rodamina para teñir F-actina (rojo).

Se observó que el Ad dnTonEBP disminuyó la sarcomerización que presentaba normalmente el cardiomiocito, efecto que estuvo acompañado con una leve reducción de AR, especialmente en la zona perinuclear (Figura 23). Sin embargo, Ad wtTonEBP indujo también la desorganización de los sarcómeros pero con formación de "bandas" de F-actina en la periferia celular. Además, se detectó un aumento de AR en todo el cardiomiocito (Figura 23).

Cuando estas células se trataron con estrés hiperosmótico (600 mOsm sorbitol) se observó una reducción del tamaño de los cardiomiocitos junto con una completa desorganización de los sarcómeros y un aumento de los niveles de AR (Figura 24). El Ad dnTonEBP inhibió la inducción dependiente de hiperosmolaridad de AR y mantuvo la desorganización de la F-actina (Figura 24). El Ad wtTonEBP mantuvo los niveles elevados de AR, y al igual que en condiciones de normoosmolaridad, se observa agregación de F actina en el interior de los cardiomiocitos (Figura 24).

Estos resultados sugieren que TonEBP modifica la estructura del citoesqueleto de actina de los cardiomiocitos.

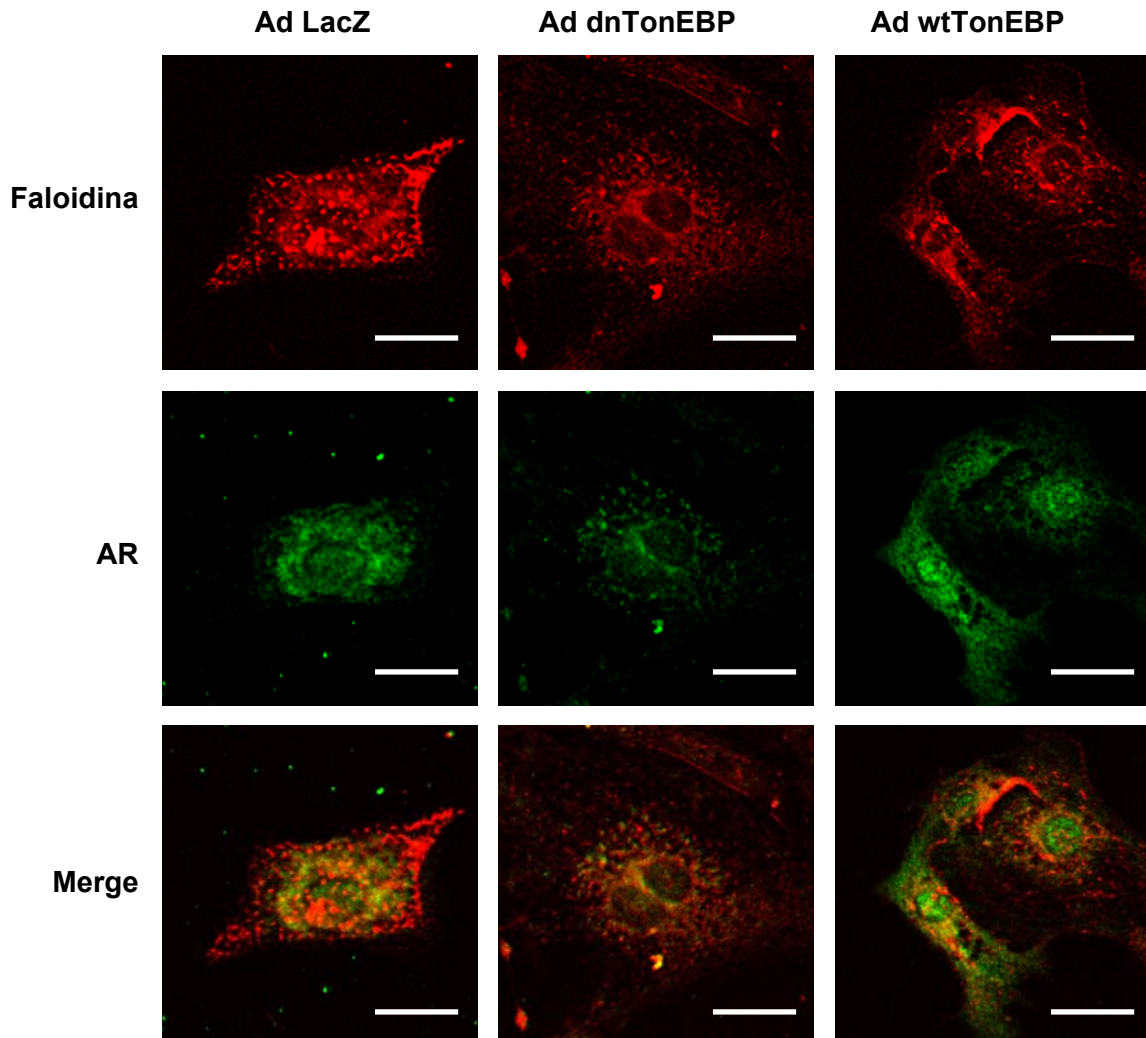


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la morfología de los cardiomiocitos de rata.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando MOI = 3000. Después de 48h las células se fijaron con metanol, se bloquearon con BSA, y se incubaron con anticuerpo anti-aldosa reductasa (AR) y segundo anticuerpo-FITC (verde). Posteriormente, después de lavar, las células se trataron con faloidina-rodamina (rojo) para teñir F-actina. Las células se visualizaron por microscopía confocal. Las fotos son representativas de 3 experimentos independientes. La escala corresponde a 20 μ m.

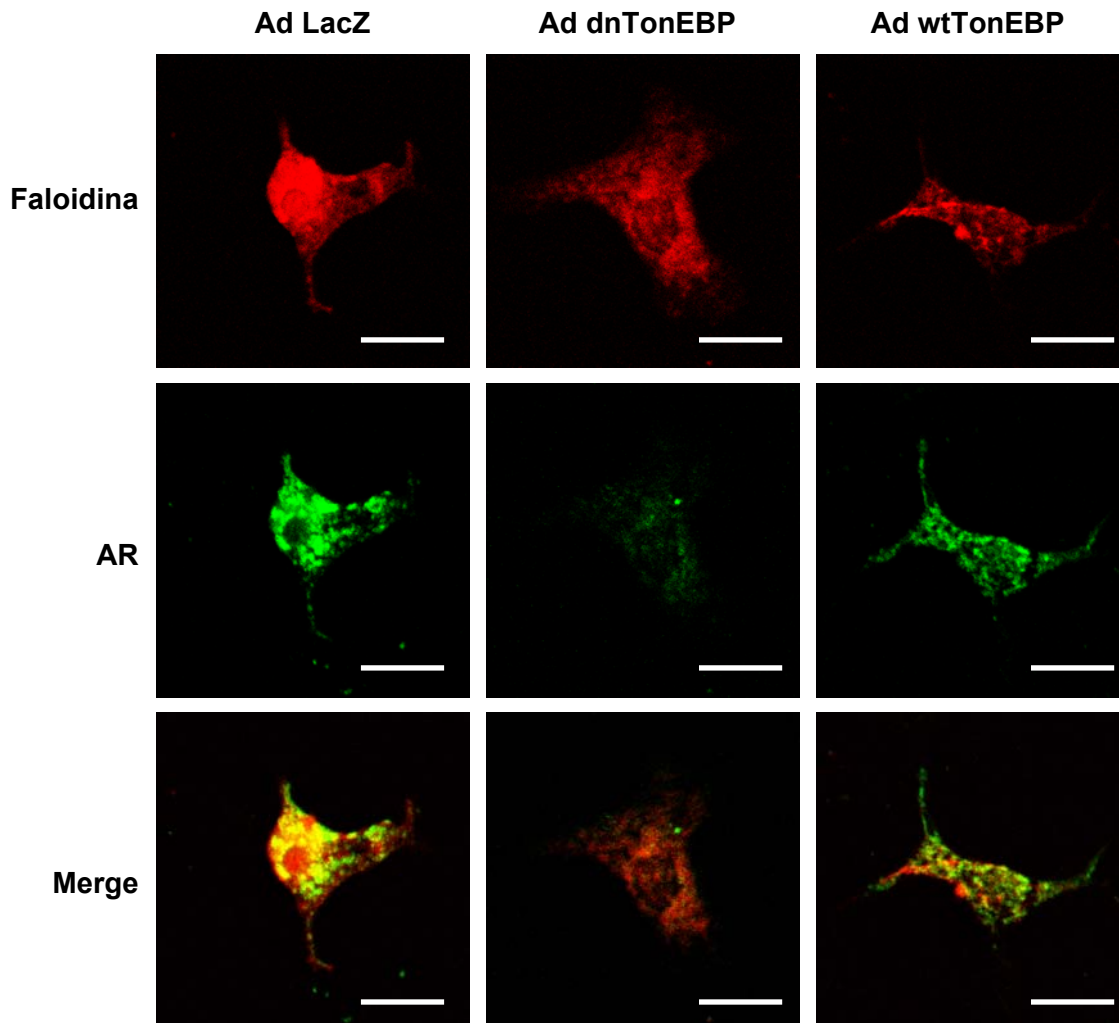


Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la morfología de los cardiomiocitos de rata sometidos a estrés hiperosmótico.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando MOI = 3000. Después de 24h las células se trataron con medio de cultivo que contenía sorbitol 600 mOsm por otras 24 h. Posteriormente, las células se fijaron con metanol, se bloquearon con BSA, y se incubaron con anticuerpo anti-aldosa reductasa (AR) y segundo anticuerpo-FITC (verde). Después de lavar, los cardiomiocitos se trataron con faloidina-rodamina (rojo) para teñir F-actina. Las células se visualizaron por microscopía confocal. Las fotos son representativas de 3 experimentos independientes. La escala corresponde a 20 μ m.

6.3.3. Sobreexpresión de dnTonEBP y wtTonEBP y viabilidad celular

6.3.3.1 Efecto de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la viabilidad del cardiomiocito

Debido a que se desconoce cuál podría ser el papel que cumple TonEBP en el control de la sobrevivencia celular, se procedió a determinar el efecto de la sobreexpresión adenoviral de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la viabilidad de los cardiomiocitos. Como control MOCK se usó adenovirus que sobreexpresaba β -galactosidasa (Ad LacZ). La viabilidad celular se determinó por incorporación de PI en células no permeabilizadas. Las células viables mantienen su membrana plasmática intacta y por lo tanto el PI no marca el DNA nuclear. Las células muertas permeabilizan su membrana dejando que el PI se intercale en el DNA presentando fluorescencia roja. Las células fueron analizadas por citometría de flujo y se separaron poblaciones celulares que incorporaron y que no incorporaron PI (Figuras 25A y B, paneles superiores).

La transducción con Ad dnTonEBP o con Ad LacZ usando MOIs entre 400 y 10.000 por 24 h no afectó la viabilidad de los cardiomiocitos en cultivo (Figura 25A). En cambio, la transducción por 24 h con Ad wtTonEBP MOI 6.000 y MOI 10.000 redujo la viabilidad a un 76 ± 9 y 73 ± 9 %, respectivamente ($p < 0,05$ vs control sin transducir) (Figura 25A).

A las 48 h de transducción Ad LacZ no afectó la viabilidad de los cardiomiocitos a todos los MOIs ensayados. Ad dnTonEBP hasta MOI 6.000 no indujo muerte celular y sólo a MOI 10.000 se observó reducción de la viabilidad de los cardiomiocitos a un 78 ± 4 % ($p < 0,05$ vs control sin transducir) (Figura 25B). Sin embargo, la transducción por 48 h con Ad wtTonEBP mostró un claro incremento de la muerte celular a partir de MOI 2.000 (76 ± 5 %, $p < 0,05$ vs control sin transducir). A MOI 10.000 Ad wtTonEBP indujo una reducción de viabilidad a 42 ± 2 % ($p < 0,01$ vs control sin transducir) (Figura 25B).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de wtTonEBP induce muerte de los cardiomiocitos en forma dependiente del tiempo de exposición y de la cantidad de sobreexpresión de esta proteína. Sólo la alta sobreexpresión (MOI 10.000) por 48 h de dnTonEBP indujo bajos niveles de muerte celular.

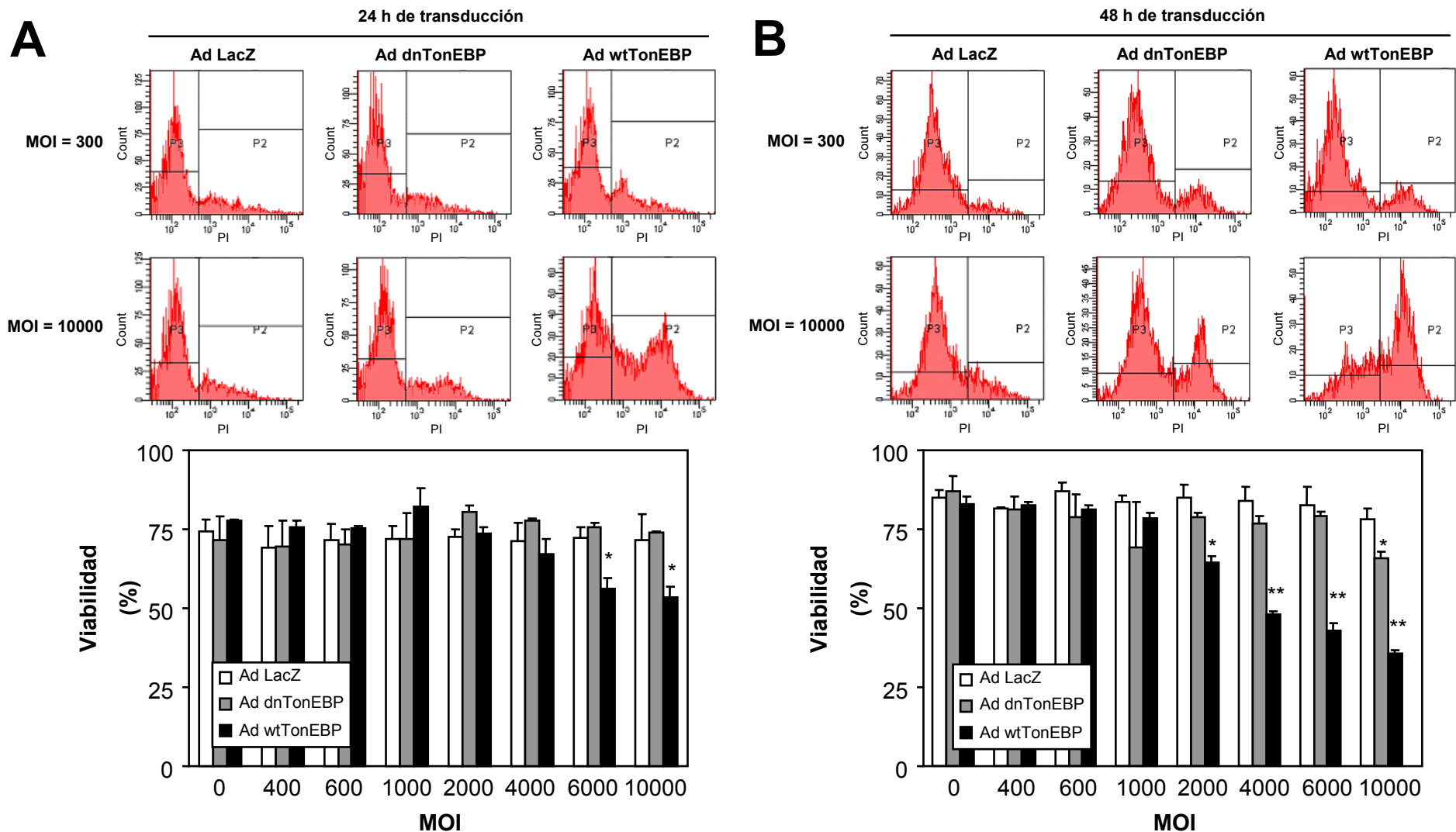


Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la viabilidad de cardiomiocitos de rata.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando distintas multiplicidades de infección (MOI). Después de 24 h (A) o 48 h (B) las células se soltaron con tripsina, se incubaron con yoduro de propidio (PI) y se evaluaron por citometría de flujo. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs sin adenovirus.

6.3.3.2. Efecto de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la apoptosis del cardiomiocito

Como una manera de caracterizar el tipo de muerte celular inducido por la sobreexpresión de TonEBP se procedió a determinar los niveles de apoptosis generados por la transducción de cardiomiocitos con Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP. Para medir apoptosis se utilizó la cuantificación de la fragmentación de DNA por citometría de flujo. Dicha fragmentación se detectó como población subG1 (ver población P3 en las Figuras 26A y B, paneles superiores) en células permeabilizadas y tratadas con PI.

La transducción con Ad LacZ, Ad dnTonEBP o Ad wtTonEBP usando MOIs entre 400 y 10.000 por 24 h no indujo apoptosis de los cardiomiocitos en cultivo (Figura 26A).

A las 48 h de transducción Ad LacZ no indujo apoptosis de los cardiomiocitos a todos los MOIs ensayados. Ad dnTonEBP hasta MOI 4.000 no indujo apoptosis y a MOIs 6.000 y 10.000 indujo $14 \pm 1\%$ ($p < 0,05$ vs control sin transducir) y $24 \pm 2\%$ ($p < 0,01$ vs control sin transducir) de apoptosis (Figura 26B). La transducción por 48 h con Ad wtTonEBP indujo apoptosis en forma MOI dependiente. A MOI 1.000, la transducción con Ad wtTonEBP indujo un $14 \pm 4\%$ de apoptosis ($p < 0,05$ vs control sin transducir), mientras que a MOI 10.000 se observó la inducción de $25 \pm 2\%$ de apoptosis ($p < 0,05$ vs control sin transducir) (Figura 26B).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de wtTonEBP indujo apoptosis de los cardiomiocitos. Los niveles de apoptosis fueron dependientes del tiempo de exposición y de la cantidad de proteína sobreexpresada. En cambio sólo la alta sobreexpresión por 48 h de dnTonEBP (MOI 6.000 y 10.000) indujo niveles detectables de apoptosis en los cardiomiocitos.

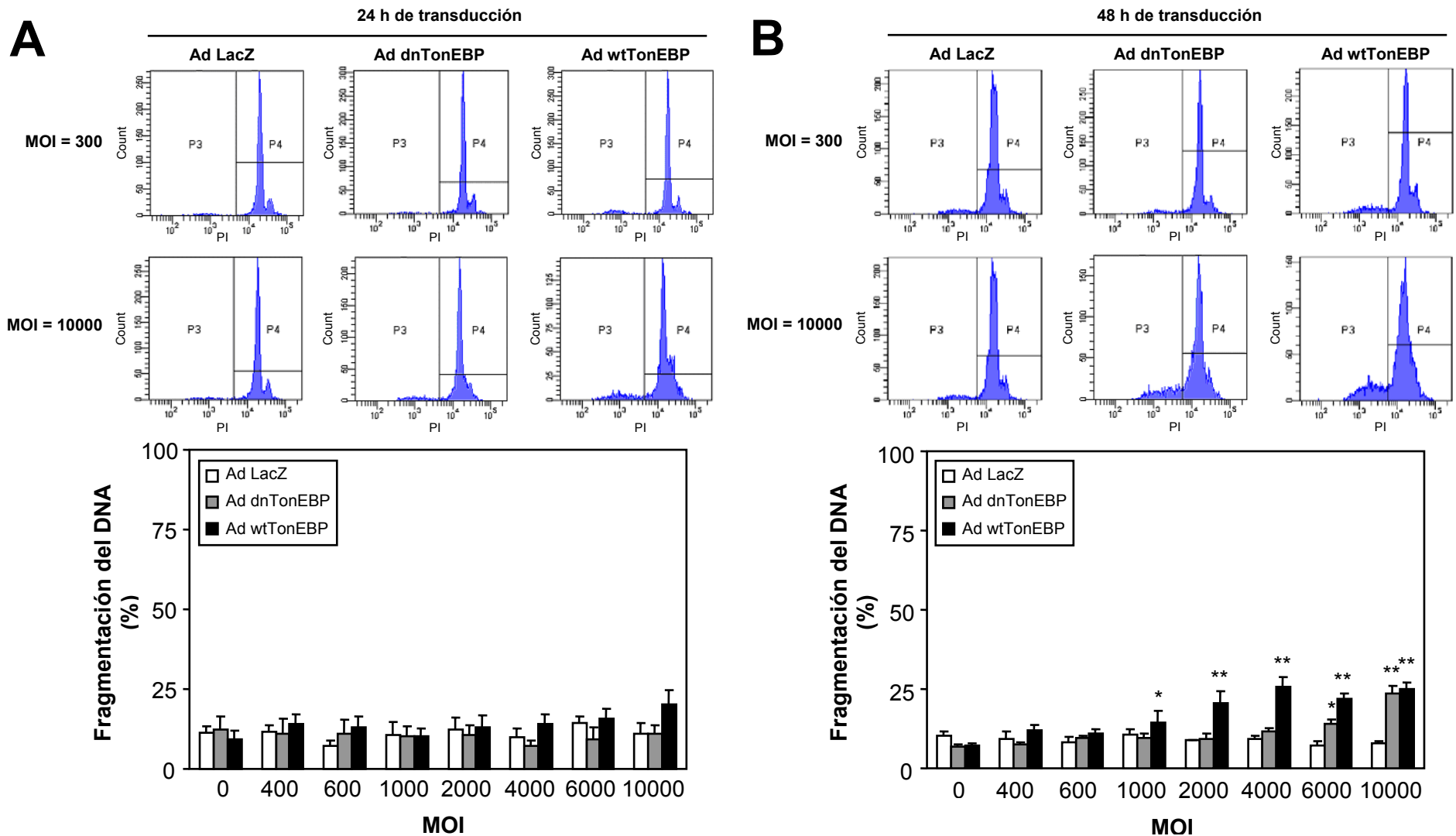


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la apoptosis de cardiomiocitos de rata.

Cardiomiocitos en cultivo se transducieron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando distintas multiplicidades de infección (MOI). Después de 24 h (A) o 48 h (B) las células se soltaron con tripsina, se permeabilizaron con etanol, se trataron con RNAsa, se incubaron con yoduro de propidio (PI) y se evaluaron por citometría de flujo las poblaciones subG1. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs sin adenovirus.

6.3.3.3 Efecto de los Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP sobre la necrosis del cardiomiocito

La necrosis se caracteriza por la liberación del contenido citoplasmático al medio de cultivo por lisis celular. En este trabajo se determinó los niveles de necrosis mediante la cuantificación de la liberación al medio de cultivo de LDH. La transducción con Ad LacZ o dnTonEBP usando MOIs entre 400 y 10.000 por 24 h no indujo necrosis de los cardiomiocitos en cultivo (Figura 27A). La transducción con Ad wtTonEBP indujo liberación significativa de LDH a partir de MOI 2.000 ($29 \pm 3\%$, $p < 0,05$ vs control sin transducir). Ad wtTonEBP transducido a MOI 10.000 indujo a las 24 h un $58 \pm 6\%$ de necrosis (Figura 27A).

A las 48 h de transducción Ad LacZ no indujo necrosis de los cardiomiocitos a todos los MOIs ensayados. Ad dnTonEBP hasta MOI 6.000 no indujo necrosis y a MOI 10.000 indujo $37 \pm 7\%$ ($p < 0,05$ vs control sin transducir) de necrosis (Figura 27B). La transducción por 48 h con Ad wtTonEBP indujo necrosis en forma MOI dependiente. A MOI 2.000, la transducción con Ad wtTonEBP indujo un $49 \pm 5\%$ de necrosis ($p < 0,01$ vs control sin transducir), mientras que a MOI 10.000 se observó la inducción de $88 \pm 3\%$ de necrosis ($p < 0,01$ vs control sin transducir) (Figura 27B).

Estos resultados muestran que la sobreexpresión de wtTonEBP indujo una potente necrosis de los cardiomiocitos. Los niveles de necrosis fueron dependientes del tiempo de exposición y de la cantidad de proteína sobreexpresada. En cambio sólo la alta sobreexpresión por 48 h de dnTonEBP (MOI 10.000) indujo niveles detectables de necrosis en los cardiomiocitos. Al comparar los niveles de inducción de necrosis y apoptosis por Ad wtTonEBP (Figuras 26 y 27) se puede concluir que la sobreexpresión de wtTonEBP induce principalmente necrosis más que apoptosis.

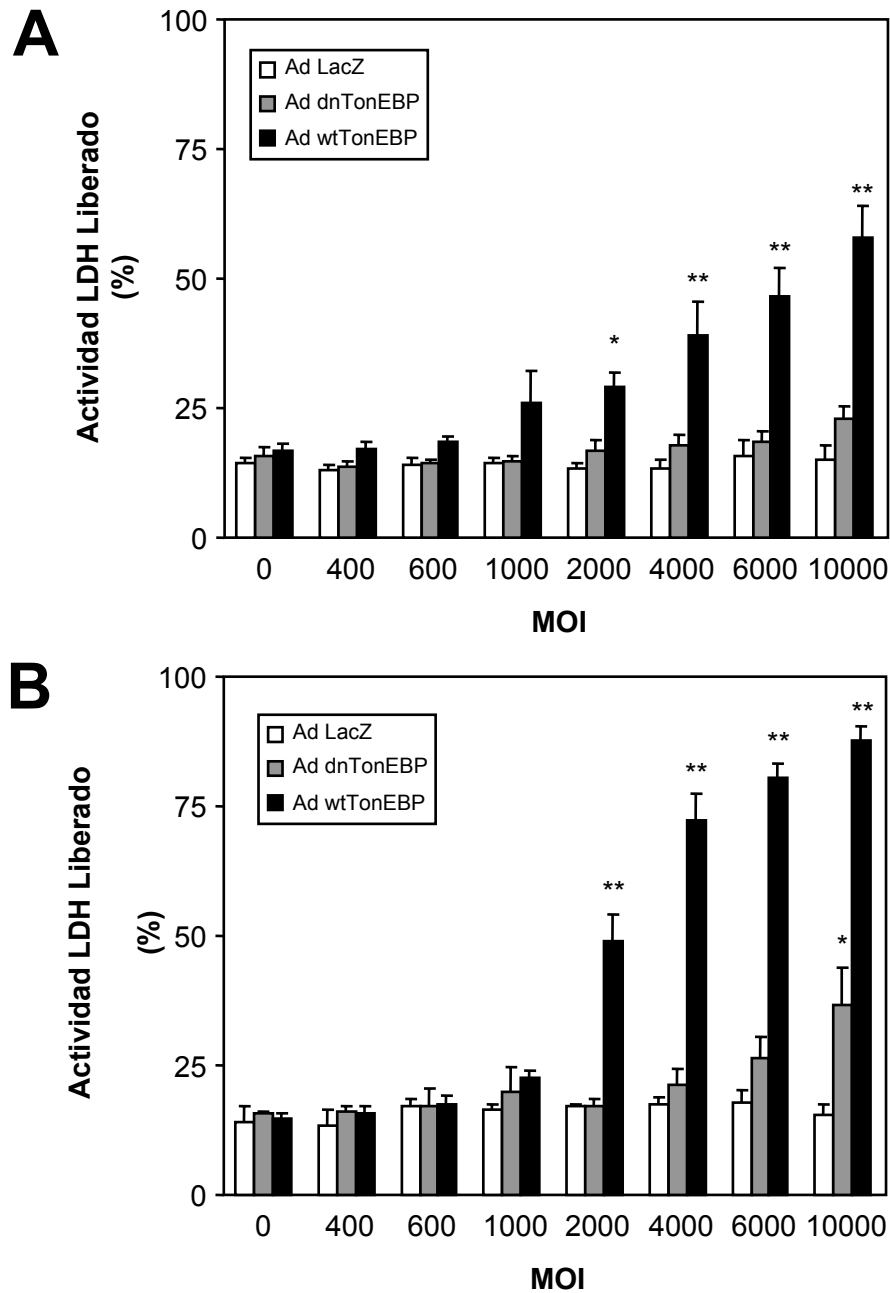


Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la necrosis de cardiomiocitos de rata.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando distintas multiplicidades de infección (MOI). Después de 24 h (A) o 48 h (B) se determinó la actividad láctico deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del medio de cultivo y en las células adheridas. La actividad de LDH liberado se calculó como porcentaje de actividad de LDH en el medio de cultivo sobre el total de LDH. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs sin adenovirus.

6.3.4. Mecanismos de inducción de muerte por sobreexpresión de wtTonEBP

6.3.4.1. Efecto de la inhibición de aldosa reductasa sobre la muerte inducida por sobreexpresión de wtTonEBP

Resultados previos del Laboratorio mostraron que el estrés hiperosmótico por sorbitol induce la masa y la actividad de AR. Además, la inhibición de AR con zopolrestat protegió a los cardiomiocitos de la muerte inducida por sorbitol (37). Debido a que TonEBP controla la expresión de AR y que la sobreexpresión de wtTonEBP incrementa los niveles de AR, se evaluó la posibilidad de que la muerte inducida por la sobreexpresión de wtTonEBP fuese mediado por una sobreactivación de AR. Para ello se transdujeron cardiomiocitos con distintos MOIs de Ad wtTonEBP e inmediatamente se incubaron en distintas concentraciones de zopolrestat. Se ensayó hasta 40 μ M de zopolrestat debido a que concentraciones superiores a 50 μ M inducen muerte de los cardiomiocitos. Como control MOCK se utilizó el Ad LacZ.

Se observó que la sobreexpresión de wtTonEBP y no de LacZ indujo muerte de los cardiomiocitos en una forma dependiente del MOI. Sin embargo, esta muerte no fue revertida por la preincubación con zopolrestat (Figura 28).

Este resultado permite concluir que la muerte de los cardiomiocitos inducida por la sobreexpresión de wtTonEBP no es mediada por una sobreactivación de AR.

6.3.4.2 Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles intracelulares de ATP

Como se mostró en el punto 6.1.4, el estrés hiperosmótico induce muerte celular debido a un colapso metabólico que se caracteriza por una reducción en los niveles intracelulares de ATP. Con el objeto de determinar si la muerte de los cardiomiocitos inducida por la sobreexpresión de wtTonEBP se debía también a un colapso metabólico, se transdujeron cardiomiocitos en cultivo con diferentes MOIs de Ad wtTonEBP. Como control se usó la transducción con Ad LacZ o Ad dnTonEBP. Después de incubar 48 h, los cardiomiocitos se lisaron y se determinó los niveles totales de ATP usando el ensayo de luciferina/luciferasa. Debido a que la sobreexpresión de wtTonEBP reduce el número de células, los niveles de ATP se corrigieron por el número de células.

Se observó que la sobreexpresión de LacZ, dnTonEBP o wtTonEBP no alteraron los niveles intracelulares de ATP (Figura 29). Estos resultados sugieren que la muerte inducida por la sobreexpresión de wtTonEBP no es mediada por un colapso metabólico.

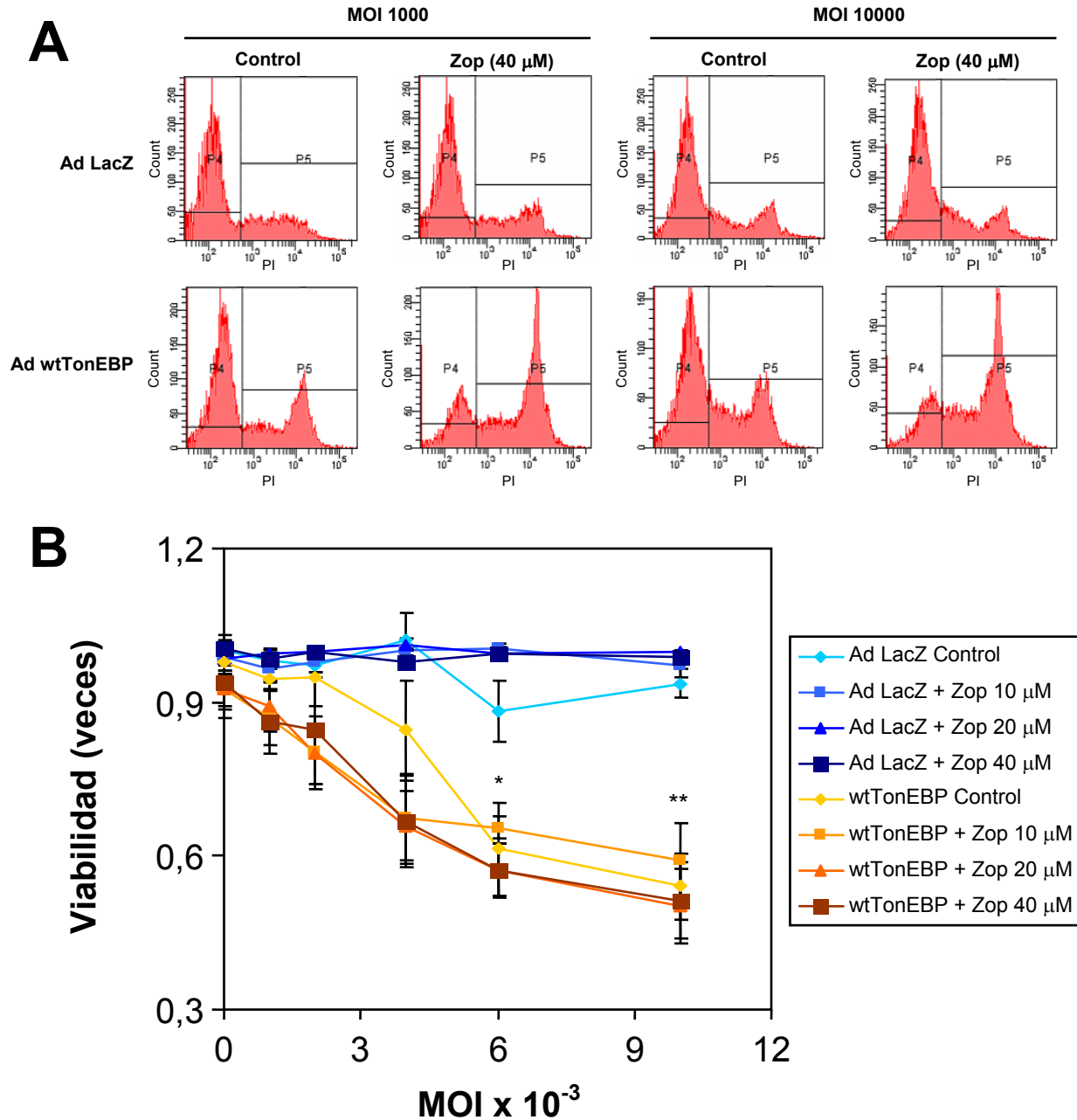


Figura 28. Efecto del inhibidor de aldosa reductasa zopolrestat, sobre la viabilidad de cardiomiocitos de rata transducidos con Ad wtTonEBP.

Cardiomiocitos en cultivo se transducieron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ) o wtTonEBP (Ad wtTonEBP) usando MOIs entre 0 y 1000 y se coincubaron con zopolrestat (Zop) (10 a 40 μ M). Después de 24h las células se determinó la viabilidad por citometría de flujo en células tratadas con yoduro de propidio. A) Diagramas de citometría de flujo representativos. B) Cuantificación de la viabilidad. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs respectivo control Ad LacZ.

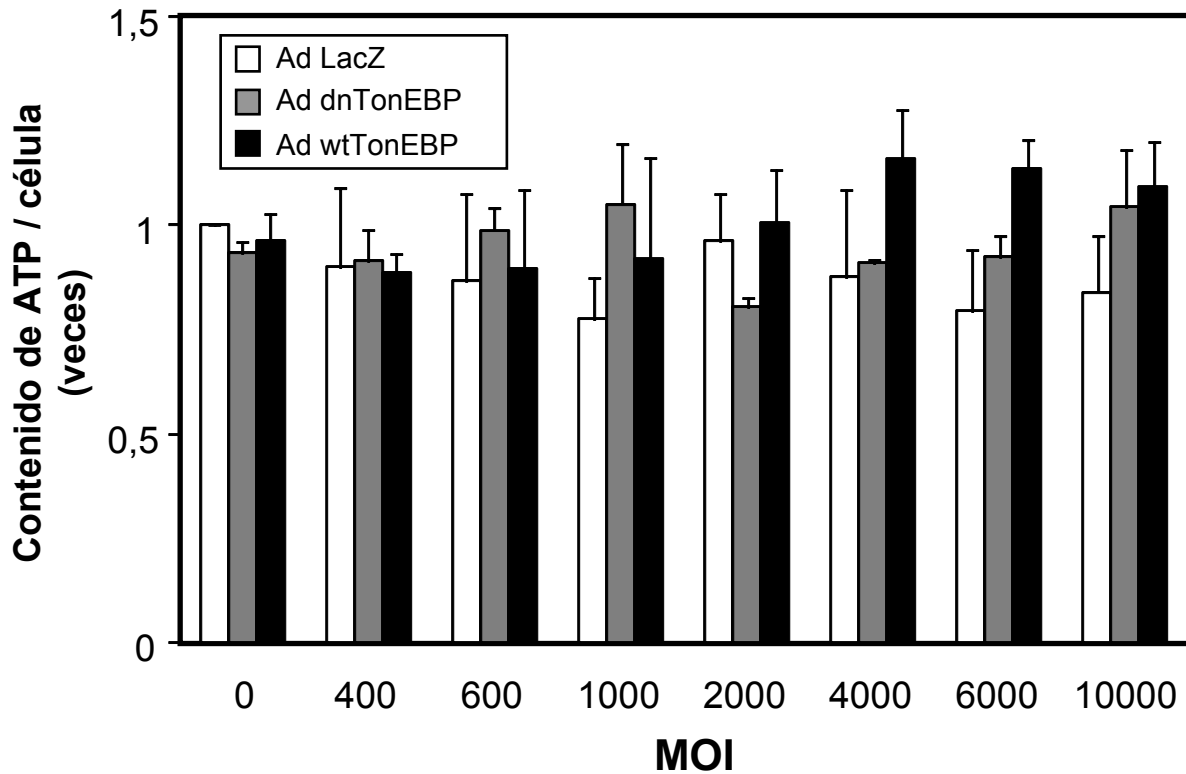


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre los niveles intracelulares de ATP.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), dnTonEBP (Ad dnTonEBP) o wtTonEBP (Ad wtTonEBP) usando MOIs entre 0 y 10.000. Después de 24 h las células se lisaron y se determinó el contenido total de ATP a través del ensayo luciferina/luciferasa. Los valores se normalizaron respecto al número de células viables. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes.

6.3.5. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP *in vivo* mediante sobreexpresión adenoviral

Como una manera de explorar la función que cumple TonEBP en el corazón, se implementó un modelo de sobreexpresión de wtTonEBP o dnTonEBP *in vivo* mediante la transducción intracardiaca con adenovirus. Este procedimiento consiste básicamente en inocular los adenovirus dentro de la cavidad del ventrículo izquierdo en base de la aorta, mientras se mantiene obstruido la aorta y arteria pulmonar. En estas condiciones todo el flujo sanguíneo eyectado por el ventrículo izquierdo es dirigido a las arterias coronarias, arrastrando consigo el adenovirus que está siendo inoculado en la base de la aorta. Después de cerrar el animal y recuperarlo del neumotórax, las ratas se mantuvieron por 15 días hasta su sacrificio.

Para determinar la eficiencia de transducción usando este procedimiento se inoculó un adenovirus que sobreexpresaba la proteína fluorescente verde (Ad GFP). A los 15 días post cirugía, los animales se anestesiaron con ketamina/xilaxina y se sacrificaron. Se extrajeron los corazones, se embebieron en parafina, se hicieron cortes histológicos longitudinales y transversales y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. En la Figura 30 se puede apreciar una expresión homogénea de GFP en el tejido cardíaco.

Utilizando este mismo procedimiento se inocularon 5 animales con Ad LacZ (control), 8 con Ad dnTonEBP y 5 con wtTonEBP. De estas ratas tratadas sobrevivieron las 5 inoculadas con Ad LacZ y las 5 inoculadas con wtTonEBP. Sin embargo, 3 de las 8 inoculadas con dnTonEBP murieron. Las ratas inoculadas con dnTonEBP no presentaron diferencias significativas en el peso corporal, peso del corazón y masa relativa del corazón respecto a las ratas inoculadas con Ad LacZ (Figura 31). Las ratas inoculadas con Ad wtTonEBP presentaron un menor peso corporal y mayor masa relativa del corazón, sin cambio en el peso del corazón, respecto a las ratas inoculadas con Ad LacZ (Figura 31).

Estos resultados sugieren que TonEBP debe cumplir una función importante en el corazón ya que la inhibición de su función mediante la sobreexpresión un dominante negativo induce mortalidad.

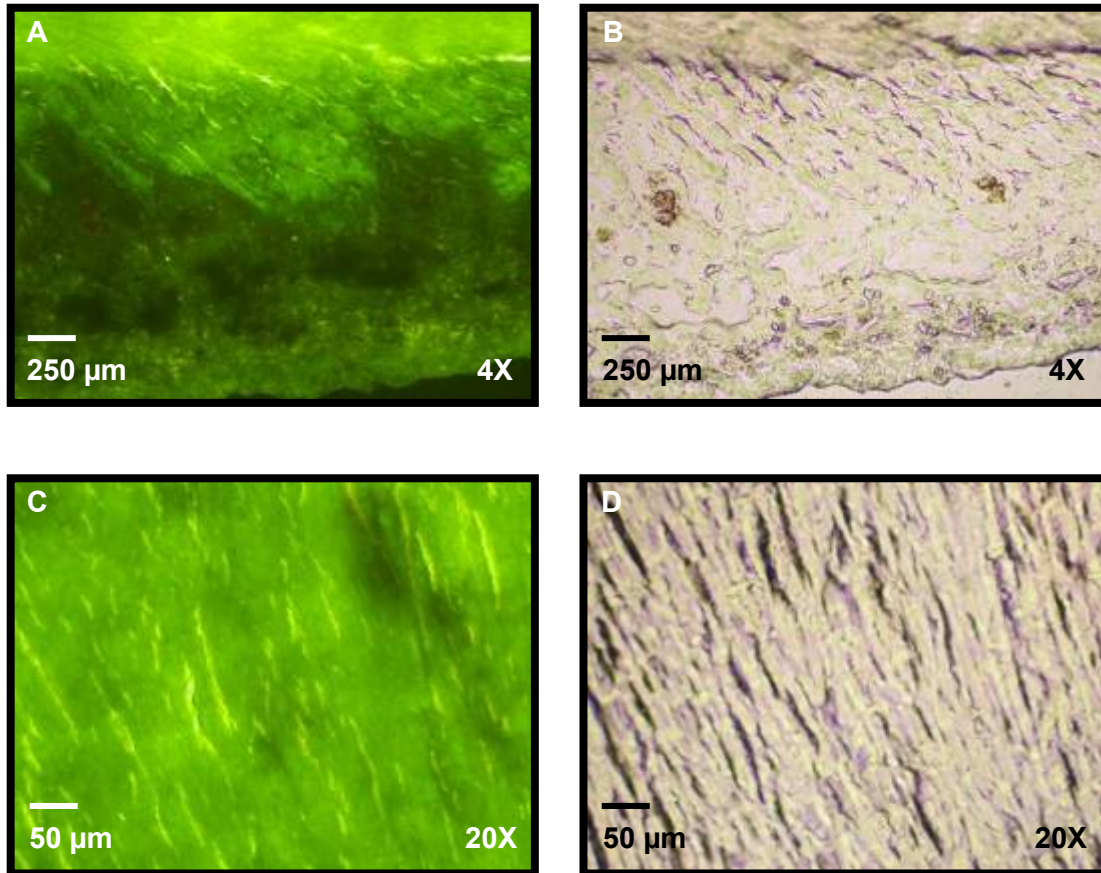


Figura 30. Fotografías del ventrículo izquierdo de ratas sometidas a transducción intracardiaca con un adenovirus que sobreexpresa la proteína fluorescente verde (Ad GFP) vistos bajo microscopía de fluorescencia. Corazones de ratas se transdujeron con 1×10^{11} partículas virales/corazón de Ad GFP. A los 15 días post transducción los animales se sacrificaron y se les extrajo los corazones. A y B) Cortes transversales de $10 \mu\text{m}$ del ventrículo izquierdo (VI) de ratas transducidas con Ad GFP vistas bajo fluorescencia y en campo claro, respectivamente; C y D) cortes longitudinales de $10 \mu\text{m}$ del VI de ratas transducidas con Ad GFP vistas bajo fluorescencia y en campo claro, respectivamente.

A

Mortalidad (Total/muertos)	
Ad LacZ	5 / 0
Ad dnTonEBP	8 / 3
Ad wtTonEBP	5 / 0

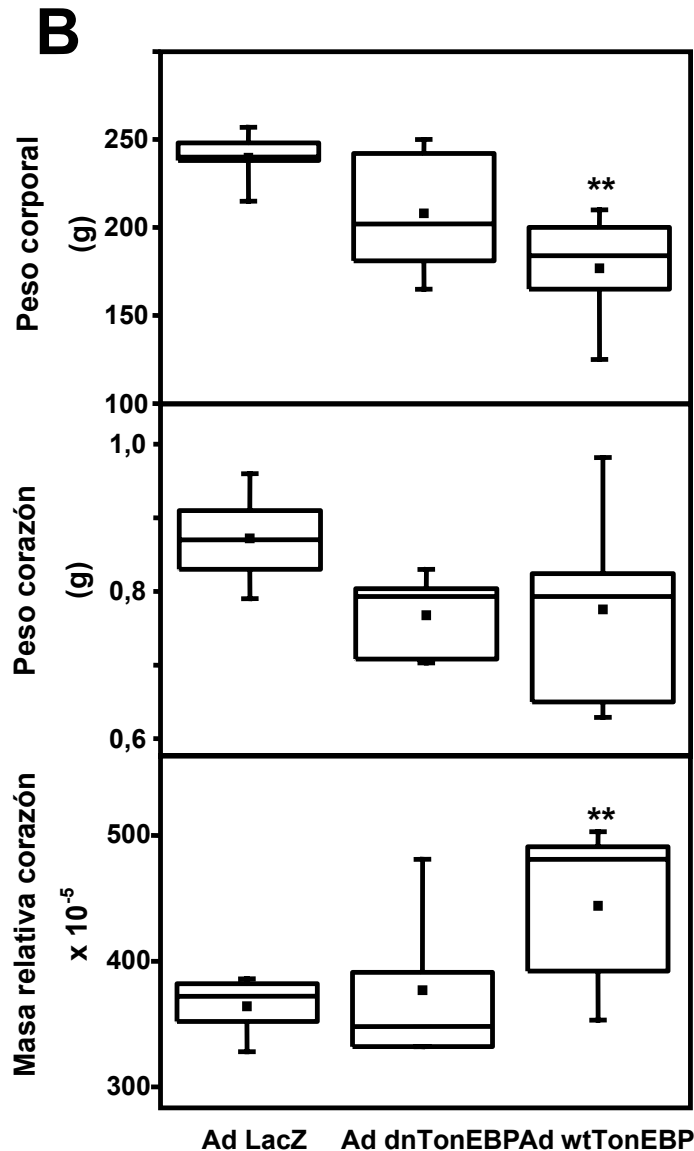


Figura 31. Efecto de la transducción cardiaca de Ad wtTonEBP, Ad dnTonEBP o Ad LacZ sobre la mortalidad y tamaño del corazón.

Corazones de ratas se transdujeron con 1×10^{11} partículas virales/corazón de Ad wtTonEBP, Ad dnTonEBP o Ad LacZ. (A) Se consideró mortalidad asociada al adenovirus sólo a los animales muertos después de las 24 h post-procedimiento. (B) A los 15 días, los animales se sacrificaron y se les determinó el peso corporal, peso del corazón y la masa relativa del corazón (peso corazón/peso animal). ** $p < 0,01$ vs Ad LacZ.

6.4. Sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP y protección frente al estrés hiperosmótico

Se ha demostrado que TonEBP protege frente al estrés hiperosmótico en células renales (115), timocitos (86), células de la fibra del lente (114) y linfocitos (132). En nuestro Laboratorio se ha descrito que TonEBP se activa por estrés hiperosmótico en cardiomiocitos (76,77). Debido a que se desconoce si esta activación es capaz de proteger a los cardiomiocitos frente a un estrés osmótico, se procedió a desarrollar el objetivo específico 4: “Evaluar si TonEBP protege a los cardiomiocitos de la muerte inducida por hiperosmolaridad”.

6.4.1. Efecto de los Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP sobre muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron por 24 h con Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP usando un MOI 1.000. Posteriormente, se determinó la viabilidad de los cardiomiocitos en condiciones basales (300 mOsm) y en condiciones de hiperosmolaridad con sorbitol de 400, 500 y 600 mOsm. Como control MOCK se utilizó un adenovirus que sobreexpresaba β -galactosidasa (Ad LacZ).

En la figura 32A se observa que a las 24 h de tratamiento con hiperosmolaridad sólo la condición de 600 mOsm indujo significativamente muerte de los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ, Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP. Usando el adenovirus MOCK se detectó una viabilidad del $58 \pm 6\%$ respecto a la condición de 300 mOsm ($p < 0,05$ vs Ad LacZ 300 mOsm). Un comportamiento similar se observó en los cardiomiocitos transducidos con Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP, que redujeron la viabilidad a $53 \pm 7\%$ ($p < 0,05$ vs Ad wtTonEBP 300 mOsm) y $46 \pm 4\%$ ($p < 0,01$ vs Ad dnTonEBP 300 mOsm), respectivamente. No se observaron diferencias significativas sobre la muerte inducida por la condición de hiperosmolaridad (600 mOsm sorbitol) entre los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ, Ad dnTonEBP y Ad wtTonEBP.

Las exposiciones por 48 h a hiperosmolaridades entre 400 a 600 mOsm de cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ y Ad dnTonEBP no modificaron los niveles de muerte respecto a los observados a las 24 h y respecto al control de 300 mOsm (Figura 32B). Sin embargo, la transducción con Ad wtTonEBP indujo una muerte significativa a partir de 400 mOsm. Las viabilidades obtenidas con Ad wtTonEBP para 400, 500 y 600 mOsm fueron $47 \pm 6\%$ ($p < 0,05$ vs Ad LacZ 400 mOsm), $36 \pm 8\%$ ($p < 0,05$ vs Ac LacZ 500

mOsm y $p < 0,05$ vs Ad wtTonEBP 300 mOsm) y $32 \pm 11\%$ ($p < 0,05$ vs Ad wtTonEBP 300 mOsm), respectivamente (Figura 32B).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP no protegen de la muerte a los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, sugiriendo que TonEBP no estaría implicado en la protección de los cardiomiocitos a la muerte inducida por hiperosmolaridad.

6.4.2. Efecto de los Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP sobre la apoptosis y la necrosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico

Previamente, se había descrito en el Laboratorio que el estrés hiperosmótico (sorbitol 600 mOsm) indujo apoptosis en los cardiomiocitos (33). A pesar de que la sobreexpresión de wtTonEBP o dnTonEBP no protegió a los cardiomiocitos de la muerte inducida por estrés osmótico, se procedió a determinar si TonEBP podía modificar el mecanismo de muerte inducido por estrés hiperosmótico. Para ello se transdujeron por 24 h con Ad wtTonEBP y Ad dnTonEBP usando un MOI 1.000. Posteriormente, se determinó los niveles de apoptosis y necrosis en condiciones basales (300 mOsm) y en condiciones de hiperosmolaridad con sorbitol de 400, 500 y 600 mOsm. Como control MOCK se utilizó un adenovirus que sobreexpresaba β -galactosidasa (Ad LacZ).

La Figura 33A muestra que en los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ a las 24 h de tratamiento con hiperosmolaridad, sólo la condición de 600 mOsm indujo significativamente apoptosis de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos transducidos con Ad dnTonEBP presentaron apoptosis a las 24 h de ser expuestos a 500 y 600 mOsm ($22 \pm 2\%$ $p < 0,05$ vs Ad dnTonEBP 300 mOsm y $38 \pm 1\%$ $p < 0,01$ vs Ad dnTonEBP 300 mOsm, respectivamente). En cambio los cardiomiocitos transducidos con Ad wtTonEBP presentaron niveles basales aumentados de apoptosis respecto a los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ, y esta apoptosis no se incrementó con el aumento del estrés osmótico (Figura 33A). Este nivel basal aumentado de apoptosis se debería a la sobreexpresión de wtTonEBP y no a un efecto del estrés hiperosmótico.

En los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ la exposición por 48 h a distintos niveles de hiperosmolaridad mostró un aumento de los niveles de apoptosis sólo a los 600 mOsm ($50 \pm 9\%$, $p < 0,05$ vs Ad LacZ 300 mOsm). Un comportamiento muy similar se obtuvo en cardiomiocitos transducidos con Ad dnTonEBP. Sin embargo, al igual que lo observado a las 24 h, Ad wtTonEBP indujo basalmente un incremento en los niveles de apoptosis, que no se alteró con aumentos crecientes de osmolaridad (Figura 33B).

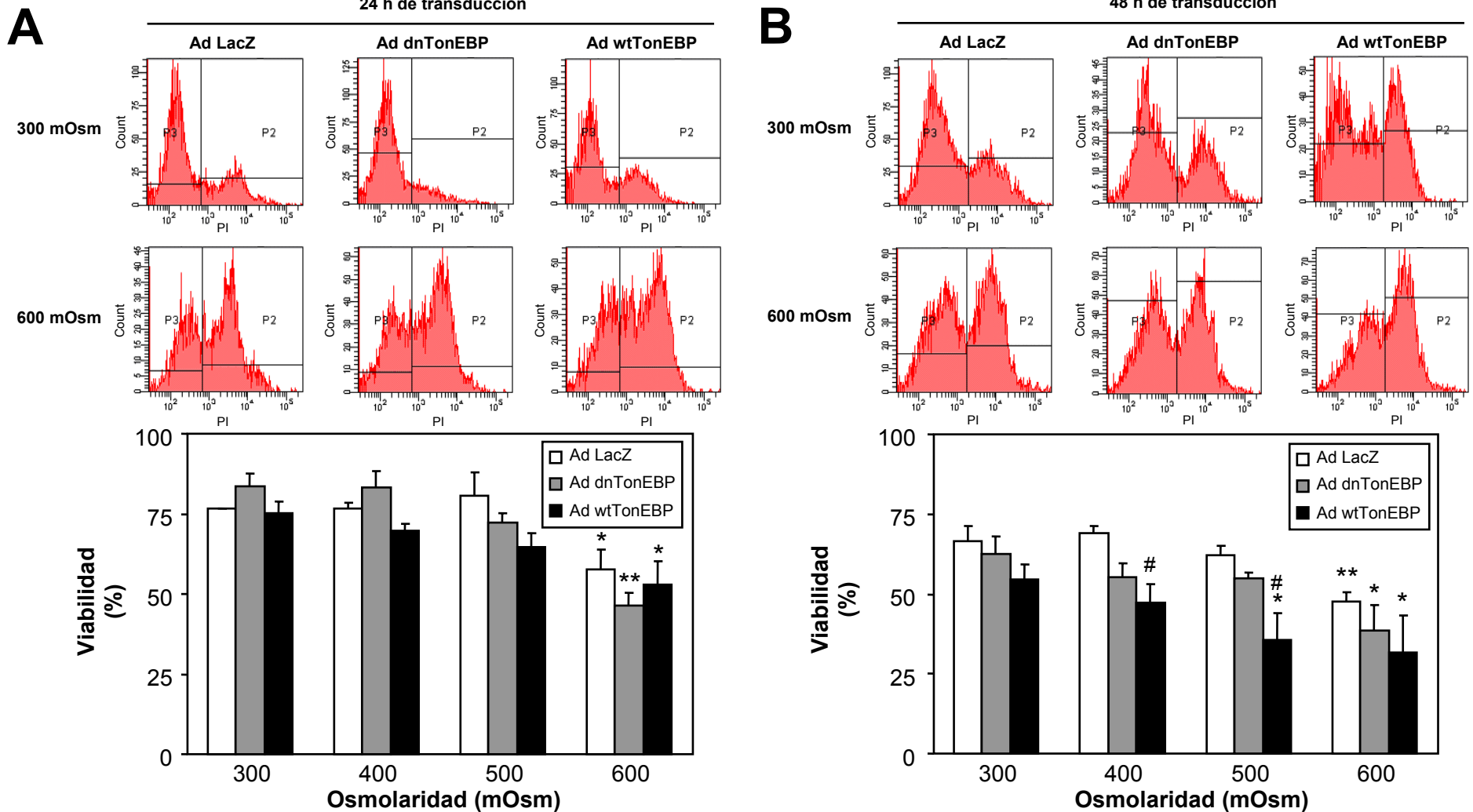


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la viabilidad de cardiomiocitos de rata sometidos a estrés osmótico.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando MOI = 1000. Después de 24h las células se incubaron con medio de cultivo (300 mOsm) o medio de cultivo conteniendo sorbitol 400, 500 o 600 mOsm. Después de 24 h (A) o 48 h (B) se contaron las células vivas y muertas usando yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs respectivo control a 300 mOsm. # $p < 0,05$ vs Ad LacZ de la misma osmolaridad.

De estos resultados se puede concluir que la sobreexpresión de wtTonEBP indujo niveles basales aumentados de apoptosis comparados con la sobreexpresión de LacZ (control MOCK) o dnTonEBP. Además, en condiciones de hiperosmolaridad de 600 mOsm, la sobreexpresión de dnTonEBP o wtTonEBP no modificó los niveles de apoptosis comparados con LacZ.

Al determinar la liberación de LDH como marcador de necrosis se observó que en los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ y Ad dnTonEBP sólo el estrés hiperosmótico con 600 mOsm indujo necrosis a las 24 h de incubación ($34 \pm 9\%$, $p < 0,05$ vs Ad LacZ 300 mOsm y $42 \pm 9\%$, $p < 0,01$ vs Ad dnTonEBP 300 mOsm, respectivamente). Los cardiomiocitos transducidos con Ad wtTonEBP presentaron basalmente un nivel elevado de necrosis comparado con los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ ($20 \pm 2\%$ vs $9 \pm 1\%$, respectivamente, $p < 0,01$). En estos cardiomiocitos, la hiperosmolaridad aumentó la necrosis alcanzándose a un $54 \pm 4\%$ cuando se incubó por 24 h con 600 mOsm ($p < 0,05$ vs Ad wtTonEBP 300 mOsm) (Figura 34A).

A las 48 h de incubación sólo la exposición a 600 mOsm indujo necrosis significativa en los cardiomiocitos transducidos con Ad lacZ y Ad dnTonEBP ($54 \pm 7\%$, $p < 0,01$ vs Ad LacZ 300 mOsm y $70 \pm 7\%$, $p < 0,01$ vs Ad dnTonEBP 300 mOsm, respectivamente) y estos niveles fueron muy superiores a aquellos observados a las 24 h. A igual que lo observado a las 24 h, la transducción con Ad wtTonEBP aumentó los niveles basales de necrosis respecto a los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ ($47 \pm 3\%$ vs $14 \pm 2\%$, $p < 0,05$). Asimismo, el aumento de la osmolaridad incrementó la necrosis alcanzándose a un $82 \pm 2\%$ con 600 mOsm ($p < 0,01$ vs Ad wtTonEBP 300 mOsm) (Figura 34B).

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de wtTonEBP induce basalmente necrosis y no protege a los cardiomiocitos frente al estrés hiperosmótico. Por otro lado, la sobreexpresión con dnTonEBP no modifica la viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico respecto a los cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ.

En conjunto, ambos resultados permiten indicar que la sobreexpresión de wtTonEBP modifica basalmente los perfiles de muerte respecto a dnTonEBP y LacZ. En condiciones de estrés hiperosmótico de 600 mOsm la sobreexpresión de dnTonEBP o wtTonEBP no modifican el mecanismo de muerte inducida por sorbitol (600 mOsm) respecto a LacZ. Estos resultados permiten sugerir que TonEBP no participaría en la protección de los cardiomiocitos sometidos a estrés hiperosmótico.

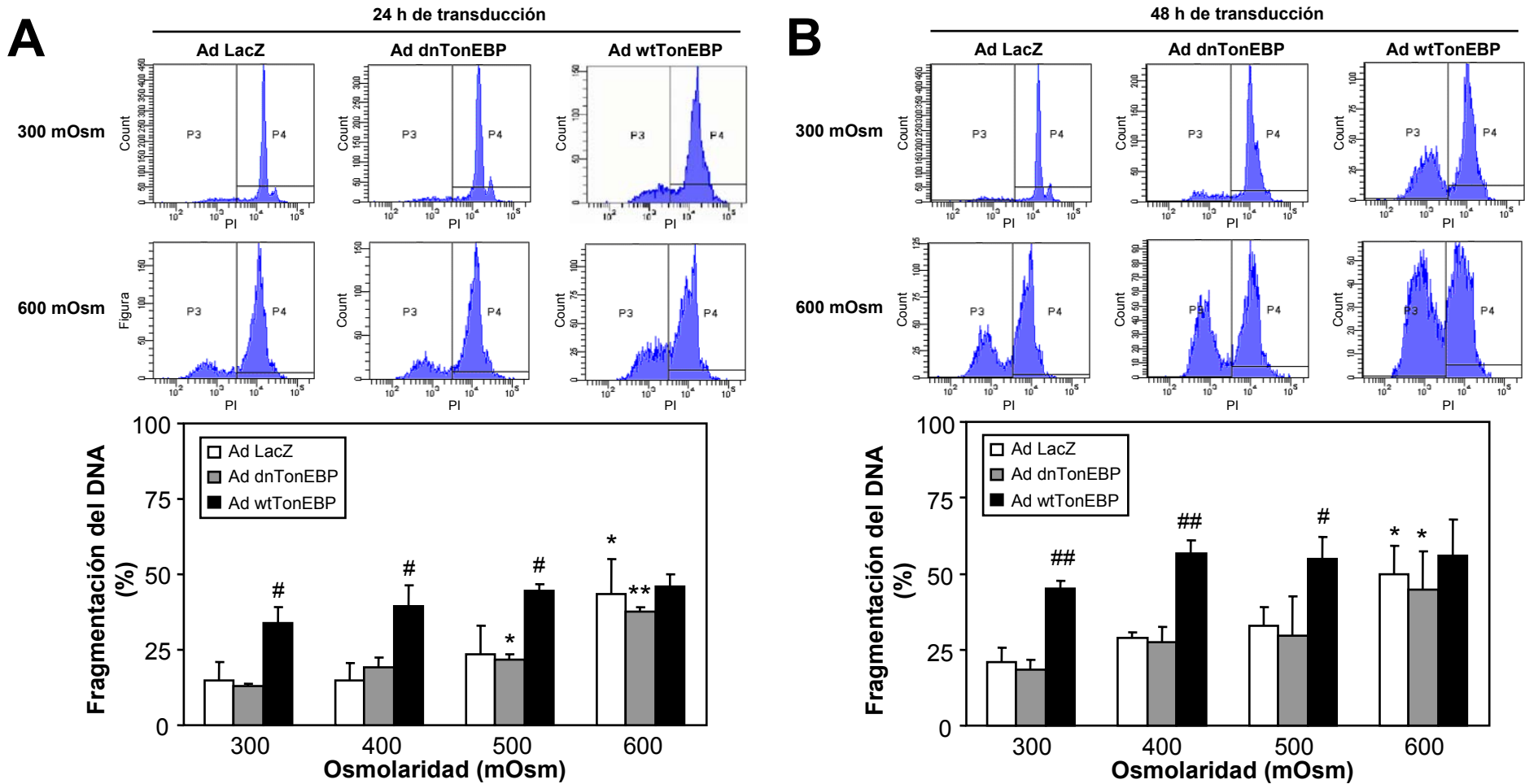


Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la apoptosis de cardiomiocitos de rata sometidos a estrés osmótico.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando MOI = 1000. Después de 24 h las células se incubaron con medio de cultivo (300 mOsm) o medio de cultivo conteniendo sorbitol 400, 500 o 600 mOsm. Después de 24 h (A) o 48 h (B) se determinó la fragmentación del DNA cuantificando la población subG1 por citometría de flujo de células permeabilizadas tratadas con yoduro de propidio. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs respectivo control a 300 mOsm. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs Ad LacZ de la misma osmolaridad.

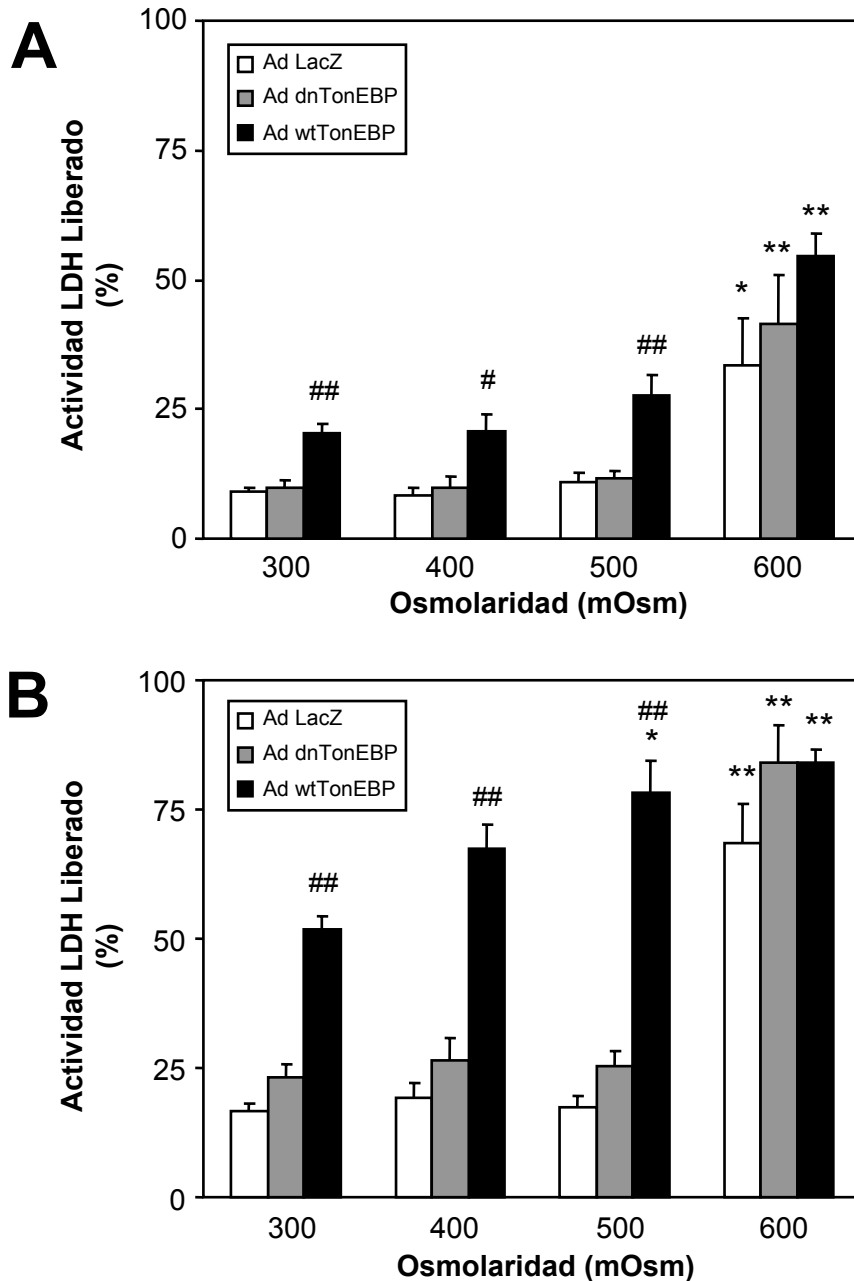


Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP sobre la necrosis de cardiomiocitos de rata sometidos a estrés osmótico.

Cardiomiocitos en cultivo se transdujeron con los adenovirus β -galactosidasa (Ad LacZ), wtTonEBP (Ad wtTonEBP) o dnTonEBP (Ad dnTonEBP) usando MOI = 1000. Después de 24 h las células se incubaron con medio de cultivo (300 mOsm) o medio de cultivo conteniendo sorbitol 400, 500 o 600 mOsm. Después de 24 h (A) o 48 h (B) se determinó la liberación de LDH hacia el medio de cultivo. Los resultados son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs respectivo control a 300 mOsm. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs Ad LacZ de la misma osmolaridad.

7. DISCUSIÓN

Los resultados más importantes de esta tesis son: a) El estrés hiperosmótico induce muerte de los cardiomiocitos por un mecanismo independiente de caspasas, que involucra entrada de Ca^{2+} desde el extracelular, aumento del Ca^{2+} citoplasmático y mitocondrial, depolarización mitocondrial y caída en los niveles intracelulares del ATP causando un colapso metabólico; b) en un modelo *in vivo* de infarto cardiaco, los niveles proteicos de TonEBP aumentan en el sitio vecino al infarto; c) en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos en cultivo, la isquemia y reperfusión simulada incrementa los niveles de TonEBP; d) se fabricaron adenovirus que sobreexpresan wtTonEBP o dnTonEBP; e) la sobreexpresión de wtTonEBP, pero no dnTonEBP, indujo muerte de los cardiomiocitos principalmente por necrosis en una manera MOI y tiempo dependiente; f) la sobreexpresión de wtTonEBP o de dnTonEBP no protegieron a los cardiomiocitos de la muerte inducida por estrés hiperosmótico; g) la muerte inducida por sobreexpresión de wtTonEBP no fue prevenida inhibiendo AR con zopolrestat y no se asoció a un colapso metabólico; y i) la expresión intracardíaca de dnTonEBP, pero no de wtTonEBP, indujo muerte de las ratas inoculadas con los adenovirus.

A pesar de que los cardiomiocitos responden a la hiperosmolaridad activando a TonEBP y este a su vez, regulando la expresando genes osmoprotectores (76,77), nuestros resultados sugieren que el aumento de la actividad de TonEBP no sería suficiente para conferir osmoprotección a las células cardíacas. De hecho, la sobreexpresión de TonEBP induce por sí sola la muerte de los cardiomiocitos por necrosis, y no confiere protección a estas células frente a un estrés hiperosmótico. Estos resultados indican que la hipótesis planteada para esta tesis es falsa.

Una posibilidad que podría explicar los hallazgos de esta tesis es que el estrés hiperosmótico induce una muerte en los cardiomiocitos que no puede ser prevenida por la activación de TonEBP. Otra posibilidad podría corresponder a hecho de que TonEBP cumpliría una función en el corazón no relacionada con la osmoprotección. Estas dos ideas se desarrollarán a través de esta discusión.

7.1. Mecanismo de muerte inducido por estrés hiperosmótico

7.1.1. Participación del Ca^{2+} en la muerte inducida por estrés hiperosmótico

El Ca^{2+} cumple funciones muy importantes en el proceso de contracción-relajación y en la regulación de la expresión génica de los cardiomiocitos (133). En este trabajo

demostramos que el Ca^{2+} cumple también un papel importante como mediador de la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico. En el corazón se ha descrito alteraciones en la osmolaridad en isquemia y reperfusión, shock séptico y coma diabético (35). La exposición de cardiomiocitos mantenidos en Krebs con Ca^{2+} a sorbitol 600 mOsm indujo un aumento del Ca^{2+} citoplasmático compuesto por dos componentes. El primero correspondió a un aumento leve pero rápido de Ca^{2+} citoplasmático, mientras que el segundo componente correspondió a un aumento grande, tardío y oscilatorio del Ca^{2+} citoplasmático.

Se ha descrito que el estrés hiperosmótico induce aumentos de Ca^{2+} intracelular en levadura (134), células y fibras de músculo esquelético (135-137), células musculares lisas y endoteliales de aorta (138-140), keratinocitos (141), células hipocampales (142), células de leiomiocoma (143) y células del disco intervertebral (144). En cardiomiocitos adultos de rata, Xie y cols (144) describieron que el estrés hiperosmótico producido por sacarosa (425 mOsm) indujo un aumento en la frecuencia de oscilaciones del Ca^{2+} intracelular. Este fenómeno es muy similar al que observamos en el segundo componente de aumento de Ca^{2+} en cardiomiocitos neonatos de rata estimulados con sorbitol (600 mOsm). Este aumento en las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por estrés hiperosmótico también se observaron en células de músculo esquelético (136). Sin embargo, en células hipocampales, el estrés osmótico disminuyó la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} , pero aumentó la amplitud de éstas (142). Las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular observadas en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico pueden deberse a un proceso de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR). Estas oscilaciones están involucradas en muchas y variadas funciones celulares (145,146). En general, la entrada de Ca^{2+} a través de un canal de Ca^{2+} activado por voltaje en células excitables eléctricamente (147) activa la fosfolipasa C y la producción de IP_3 . El IP_3 induce liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, el cual promueve a liberación de Ca^{2+} a través del receptor de rianodina por CICR, dando origen a las oscilaciones de Ca^{2+} (145,146,148).

En nuestro modelo, nifedipino, un antagonista de los canales de Ca^{2+} activado por voltaje, inhibió completamente la entrada de Ca^{2+} y la fragmentación del DNA inducida por estrés hiperosmótico. La participación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje en el aumento del Ca^{2+} inducido por estrés hiperosmótico también se ha descrito en células del músculo esquelético (135-137) y en keratinocitos (141). Por otra parte, la participación de los canales de rianodina se ha descrito sólo en músculo esquelético (135,136). En cambio, la participación de IP_3 en el aumento de Ca^{2+} inducido por estrés osmótico se ha

descrito en células de leiomiocoma de hámster (143) y en varios tipos de células vegetales (149).

7.1.2. Muerte por apoptosis independiente de caspasas. Papel del colapso metabólico

La captación de Ca^{2+} por la mitocondria es parte normal del mecanismo de señalización intracelular del Ca^{2+} , participando activamente en el almacenamiento de este ión (150,151). El Ca^{2+} entra a la mitocondria a través de un “uniporter” de baja afinidad. Sin embargo, aumentos de Ca^{2+} citoplasmático localizados en la vecindad de la mitocondria pueden producir incrementos importantes de su captación generando elevación de la concentración del Ca^{2+} intramitocondrial (152). Este aumento de Ca^{2+} en la mitocondria provoca depolarización mitocondrial, que a su vez induce la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, liberación de citocromo c, activación de caspasas y la reducción en la síntesis de ATP, que finalmente termina en la muerte celular. Existen varios agentes como ionóforos de Ca^{2+} , taspigargina, neurotoxinas, compuestos quimioterápicos y prooxidantes que activan la apoptosis a través de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} (153-155). Nuestros resultados mostraron que en el caso del estrés hiperosmótico, esta cascada de eventos puede ser suprimida por la reducción de los niveles de Ca^{2+} extracelular, ya que el estrés hiperosmótico no indujo depolarización mitocondrial cuando las células se mantuvieron en medio Krebs sin Ca^{2+} .

Se han descrito que los inhibidores de caspasas generalmente no previenen la muerte de las células que sufren apoptosis por permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, seguida de liberación de citocromo c y activación de caspasas (156). Esta muerte celular independiente de caspasas puede ocurrir como consecuencia de una falla mitocondrial y/o liberación de agentes proapoptóticos desde la mitocondria como el AIF (157,158). En nuestro modelo, no se detectó la liberación de AIF desde la mitocondria. Entonces, una alternativa es el colapso en la función mitocondrial. Apoyando esta hipótesis, Collet y cols (156) describieron que el aumento de los niveles de ATP intracelulares a través de la activación de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, y por ende la glicolisis, y un aumento de autofagia cooperan para proteger a las células de la muerte celular independiente de caspasas.

Nuestros resultados muestran que el estrés hiperosmótico redujo en un 25% el contenido de ATP en los cardiomiocitos. Esta reducción puede ser explicada por una

disminución en la síntesis de ATP debido a un colapso en la función mitocondrial, pero también puede explicarse a través de la activación de la vía de los polioles. En cardiomiocitos, el estrés hiperosmótico activa la vía de los polioles e induce la acumulación de sorbitol intracelular, un osmolito biocompatible necesario para restablecer el volumen celular en condiciones de hiperosmolaridad (37). Durante la activación de la vía de los polioles existiría un aumento de la razón lactato/piruvato (una medida del estado redox citoplasmático dado por la razón NADH/NAD^+) (109,159). Hwang y cols propusieron que el aumento de la razón lactato/piruvato podía explicarse a través del flujo de los sustratos a través de la sorbitol deshidrogenasa (que utiliza NAD^+) (109). Sin embargo, debido a la competencia por el NAD^+ , aumentos en el flujo por la vía sorbitol deshidrogenasa puede disminuir el flujo por la vía gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, y así reducir la síntesis de ATP por la glicolisis (109,159). La participación de la vía de los polioles en el mecanismo de muerte inducida por el estrés hiperosmótico está además apoyada por el hecho que la inhibición de AR con zopolrestat protege a los cardiomiocitos de la muerte inducida por estrés hiperosmótico (37). De esta manera, la muerte de los cardiomiocitos inducida por el estrés hiperosmótico puede ser explicada a través de un colapso metabólico debido a una reducción en los niveles intracelulares de ATP.

En la Figura 35 se describe un modelo del mecanismo propuesto para la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico. El estrés hiperosmótico induciría la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L produciendo un aumento del Ca^{2+} citoplasmático, inducción de la depolarización mitocondrial, liberación de citocromo c con activación de caspasa 9 y caspasa 3, pero sin participar en la muerte celular. La depolarización mitocondrial induciría además disminución en la síntesis de ATP, probablemente potenciado por la activación de la vía de los polioles. La disminución de los niveles intracelulares de ATP provocaría un colapso metabólico que sería el responsable de una muerte celular independiente de caspasas.

La baja en los niveles intracelulares de ATP inducida por el estrés hiperosmótico podría explicar el hecho que la sobreexpresión de TonEBP no es capaz de revertir la muerte inducida por sorbitol 600 mOsm. Aunque los cardiomiocitos sometidos a estrés hiperosmótico activan la expresión de AR con acumulación intracelular de sorbitol (34,37), condiciones que debieran producir osmoprotección, el colapso metabólico que se observa en estas células impediría que muchas de las funciones vitales necesarias para la sobrevivencia celular se lleven a cabo correctamente. En este contexto, Castro y cols (160)

trabajando en el mecanismo de muerte de células epiteliales inducida por estrés oxidativo, describieron que la caída de los niveles intracelulares de ATP detiene la actividad de Ca^{2+} -ATPasas ubicadas en la membrana plasmática. La actividad de estos canales de Ca^{2+} son necesarias para la reducción de Ca^{2+} citoplasmático y su inhibición favorecería la sobrecarga de Ca^{2+} y la consecuente muerte celular (160).

7.2. Activación de TonEBP por isquemia y reperfusión

El daño isquémico en el corazón se produce por interrupción de la irrigación sanguínea en las arterias coronarias provocada por trombosis u otra alteración aguda de la placa aterosclerótica coronaria. La patobiología del daño isquémico miocárdico se ha descrito en detalle (161-163). Actualmente se reconoce que existe un amplio espectro de respuestas del miocardio a la perfusión coronaria reducida y que la respuesta del miocardio al daño isquémico puede modularse por varios procesos, particularmente la reperfusión y el preconditionamiento (161-163).

Con la caída del aporte de oxígeno, la fosforilación oxidativa mitocondrial se detiene con la consecuente pérdida de la principal fuente de ATP. Compensatoriamente, se incrementa la glicólisis anaeróbica que conduce a la acumulación de protones y lactato, resultando en la acidosis intracelular y la inhibición de la glicólisis y del metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos (164-166). Se desarrolla una falla en la contracción con actividad eléctrica persistente (desacoplamiento excitación-contracción) en asociación con alteraciones en el sistema de transporte de iones en las membranas del sarcolema y de los organelos (162,167,168). Estas condiciones desarrollan posteriormente una arritmia ventricular (162). En estas condiciones Tranum-Jensen y cols describieron un aumento de la osmolaridad intracardíaca de 60 mOsm en 60 min de isquemia (38).

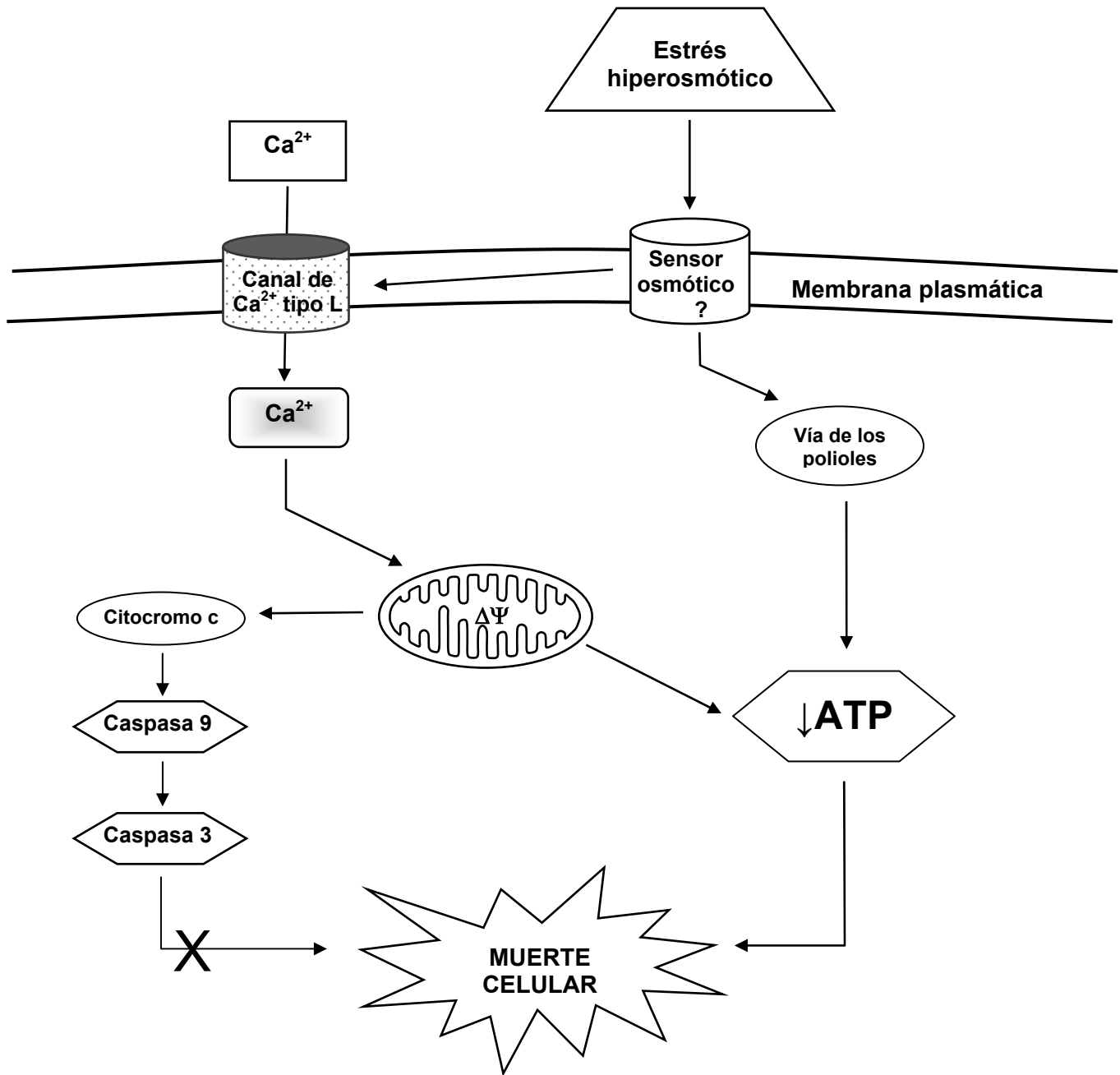


Figura 35. Modelo propuesto para la muerte de los cardiomiocitos inducida por estrés hiperosmótico.

Nuestros resultados mostraron que al realizar infarto al miocardio en un modelo de rata por ligación de la arteria coronaria descendente se detectó un aumento de los niveles de TonEBP en el sitio vecino al infarto. El aumento de la masa de TonEBP se ha correlacionado con la activación de este factor transcripcional (60,73), sugiriendo que en el sitio vecino al infarto existiría una activación de TonEBP. Este aumento en los niveles de TonEBP podría deberse al incremento de la osmolaridad de alrededor de 60 mOsm que se ha descrito que ocurre durante la isquemia (38). Datos previos del Laboratorio demostraron que osmolaridades equivalentes a 400 mOsm producidos por sorbitol en cardiomiocitos *in vitro*, que corresponde aproximadamente unos 100 mOsm por sobre lo normal, eran capaces de activar la expresión de TonEBP, medido por genes reportero (76) y por el aumento de la proteína y actividad de AR (37). Estos datos sugieren que el aumento de la osmolaridad podría efectivamente activar a TonEBP. Sin embargo, no es posible descartar que existan otros mecanismos responsables de esta activación, ya que se ha descrito que el estrés oxidativo activa a TonEBP. En células HEK 293 se demostró que las especies reactivas del oxígeno se originan en las mitocondrias y median la activación de TonEBP inducida por NaCl, incrementando su transactivación, sin participar en su translocación al núcleo (67,68). Por lo tanto, ya que durante el infarto se ha descrito un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (169), es posible que este mecanismo, sólo o en conjunto con el aumento local de la osmolaridad, sea el verdadero responsable de la activación de TonEBP.

Ya se describió previamente que el estrés hiperosmótico por sorbitol estimula la síntesis de AR en forma dependiente de la activación de TonEBP en los cardiomiocitos en cultivo. AR también responde al estrés oxidativo, siendo la vía receptor de EGF-ERK importante en la activación de la expresión génica de AR por H₂O₂ (170). Esta enzima no sólo cataliza la reducción de glucosa a sorbitol sino que además es un eficiente catalizador para la reducción de aldehídos derivados de lipoperoxidación (171). De este modo, la activación de AR en el infarto al miocardio sería importante para la detoxificación de los aldehídos derivados de la lipoperoxidación generados por el estrés oxidativo asociado a la isquemia/reperfusión (97). De lo anterior podemos suponer que la activación de TonEBP en el sitio vecino al infarto por incremento local de la osmolaridad y de los niveles de especies reactivas de oxígeno podría incrementar la masa y actividad de AR, cuya función podría estar asociada a la compensación del volumen del cardiomiocito y a la detoxificación de aldehídos citotóxicos.

7.3. Sobreexpresión de TonEBP

Para evaluar la activación de TonEBP, se cuantificó la masa de AR, un blanco transcripcional de TonEBP (52). Demostramos que la sobreexpresión adenoviral de wtTonEBP en cardiomiocitos producía un aumento en la masa de AR en una manera dependiente de la cantidad de virus utilizado en la transducción. Este resultado muestra que solamente se requiere la sobreexpresión de TonEBP para incrementar su actividad transcripcional. Este resultado fue inesperado en vista de los antecedentes previos que señalaban que este factor transcripcional está finamente regulado en su actividad por fosforilación y translocación nuclear (52,60). Entonces, esperábamos que su sobreexpresión no aumentara por sí sola la actividad transcripcional de TonEBP si no que se requiriera de un estímulo extra, por ejemplo estrés hiperosmótico, para activarla. Por otra parte, un resultado similar al encontrado por nosotros se describió en células HEK293, que demostraron que la sólo sobreexpresión de TonEBP activaba a expresión de genes reporteros controlados por promotores sensibles a TonEBP (78,81). Este hallazgo podría estar de acuerdo con el concepto de que la actividad de TonEBP también se regula a través del incremento de la masa de esta proteína (52,60). El estrés hiperosmótico induce un aumento importante en la masa de TonEBP (56,71,76) lo que se traduciría en un aumento de su actividad transcripcional. La magnitud de este aumento sugiere que este mecanismo de activación de TonEBP podría jugar un papel importante en la regulación de su actividad.

La sobreexpresión de dnTonEBP en cardiomiocitos no redujo los niveles proteicos basales de AR. Este hallazgo puede ser explicado de dos maneras. Primero, la vida media de AR es muy larga. Se ha descrito en células epiteliales de riñón de conejo que, en forma independiente de la osmolaridad del medio, la masa de AR se reduce en sólo un 25% en 3 días (172), con una vida media estimada de 6 a 7 días (173). Debido a que los experimentos de sobreexpresión de dnTonEBP se realizaron a las 24 y 48 h, la inhibición de la expresión de AR no debiera traducirse en una disminución detectable de la masa de esta enzima. Segundo, la regulación de la expresión basal del gen que codifica para AR podría no estar controlada por TonEBP. La región promotora del gen que codifica para AR contiene una región de respuesta a stress múltiple (MSRR) compuesto por dos probables elementos de respuestas a antioxidantes (ARE1 y ARE2), un sitio AP1 y un elemento de respuesta a tonicidad (TonE) (174). Se ha descrito que la expresión de AR puede ser además inducida por TGF- β 1 a través de la activación del factor transcripcional AP1

(175), por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato a través de NFκB (176) y la transcripción basal estaría regulada por el factor transcripcional Nrf2 (174). Sin embargo, cuando las células transducidas con Ad dnTonEBP se expusieron a hiperosmolaridad, la sobreexpresión de dnTonEBP logró inhibir la activación de la expresión de AR inducida por estrés hiperosmótico. Esto indicaría que la sobreexpresión de dnTonEBP logra efectivamente inhibir la actividad transcripcional de TonEBP.

7.4. TonEBP y citoesqueleto

Al utilizar los adenovirus wtTonEBP y dnTonEBP se observó que la sobreexpresión de estas dos proteínas en cardiomiocitos controlaban los niveles proteicos de β-actina, una proteína que se utilizaba como control de carga. Se observó que la sobreexpresión de wtTonEBP indujo la masa de β-actina, mientras que la sobreexpresión de dnTonEBP la inhibía. Este fenómeno no se detectó con la proteína β-tubulina, indicando que este efecto no era general a todas las proteínas del citoesqueleto. Además, se determinó que la sobreexpresión de wtTonEBP y dnTonEBP disminuían y aumentaban los niveles proteicos de β-MHC, una proteína de la maquinaria contráctil utilizada como marcador de hipertrofia cardíaca.

Al analizar el promotor de β-actina en búsqueda de un sitio de unión para TonEBP se determinó que no existe un sitio TonE idéntico al consenso. Sin embargo, existen 4 sitios probables ubicados en las bases -1008/-1019, -2702/-2691, -2778/-2767 y -3222/-3211. Estos 4 sitios fallan en ser sitio TonE de consenso principalmente porque la base ubicada en la posición 11 de la secuencia no corresponde a C (Tabla 1).

Al realizar una inmunocitoquímica de cardiomiocitos se determinó que la sobreexpresión de wtTonEBP alteró la estructura de la F-actina formando agrupaciones de esta proteína entorno a la membrana plasmática. Dicho arreglo de actina se ha descrito previamente en células musculares esqueléticas tratadas con insulina (177). En estas células la insulina induce una reorganización rápida y dinámica del citoesqueleto de actina en una malla cortical localizada en rizos de la membrana plasmática. Una comparación de la reorganización de actina inducida por sobreexpresión de wtTonEBP y la inducida por insulina se muestra en la Figura 36. Esta reorganización contribuye a la redistribución de los transportadores de glucosa GLUT4 y de la captación de glucosa (177-179). La relación entre la sobreexpresión de wtTonEBP y GLUT4 podría estar asociado al hecho de que el estrés hiperosmótico incrementa la captación de glucosa en cardiomiocitos, adipocitos y células musculares esqueléticas (37,180,181). En adipocitos y

células musculares esqueléticas el estrés hiperosmótico induce la acumulación de GLUT4 en la superficie celular, aumentando por ende el transporte de glucosa, en una manera muy similar a como lo hace insulina (180,181).

Tabla 1. Sitios probables TonE en el promotor del gen que codifica para β -actina de rata.

	Base inicial													Base final
Secuencia consenso (96)		N	G	G	A	A	A	A/T	T/A/G	C/T/A	A/C	C	N	
β -actina GeneID: 81822	-1008	C	G	G	A	A	A	G	T	T	A	A	G	-1019
	-2702	G	G	G	A	A	A	G	A	T	A	A	A	-2691
	-2778	G	G	G	A	A	A	G	T	T	C	T	C	-2767
	-3222	T	G	G	A	A	A	A	A	T	G	A	T	-3211

Por otra parte, se ha descrito que el estrés hiperosmótico induce una reorganización del citoesqueleto con un aumento neto en el contenido de F-actina celular (182). Esta reorganización es una respuesta ubicua que se ha descrito en varios organismos eucarióticos, incluyendo levadura (183), *Dictyostelium* (184,185) y células de mamífero (186). La hiperosmolaridad produciría la reorganización del citoesqueleto de actina induciendo la fosforilación de cofilina a través de la vía Rho/ROCK/LIMK (182). Interesantemente, se ha asociado esta misma vía con la reorganización de actina inducida por insulina (187).

Queda por evaluar entonces, la posibilidad que la reorganización de actina inducida por la sobreexpresión de wtTonEBP esté asociada con la externalización de GLUT4 y un aumento de la captación de glucosa, todo ello mediado por la fosforilación de cofilina a través de la vía Rho/ROCK/LIMK. Esto supondría una asociación/activación directa o indirecta de la GTPasa pequeña Rho por TonEBP, hecho que hasta la fecha no está descrito en la literatura.

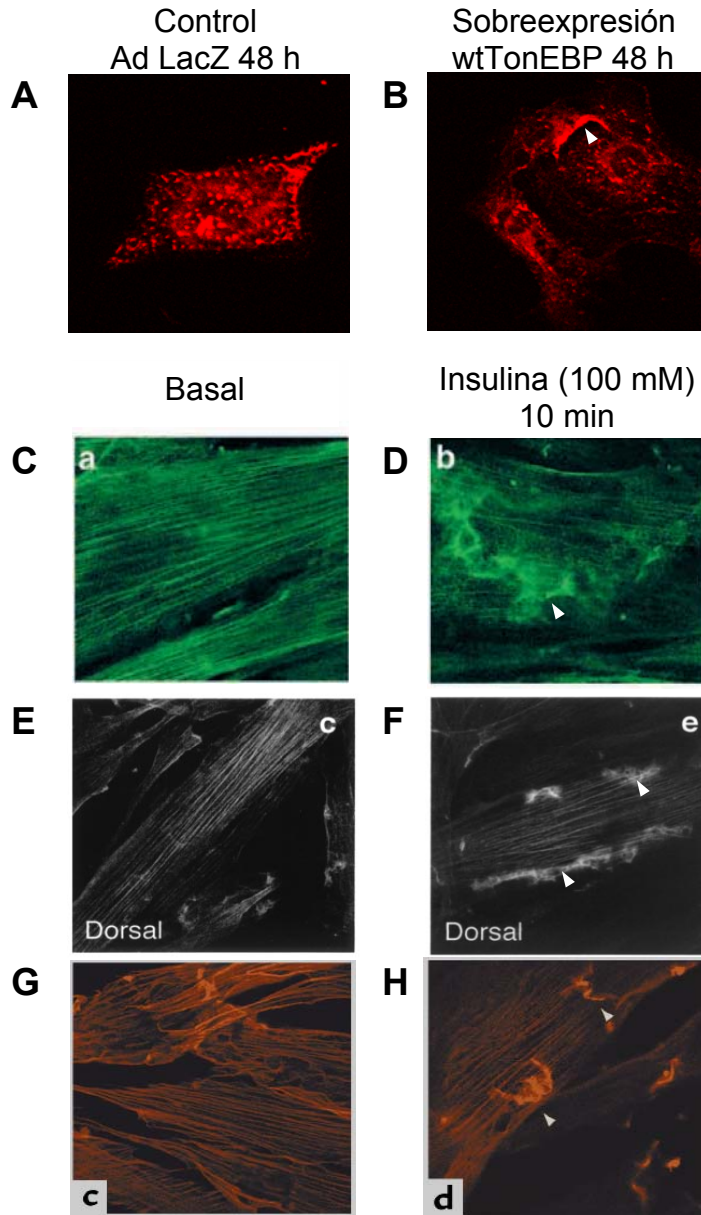


Figura 36. Comparación de la reorganización de actina inducida por sobreexpresión de wtTonEBP con la inducida por insulina.

(A) Cardiomiocitos transducidos con Ad LacZ y (B) transducidos con Ad wtTonEBP por 48 h con MOI 1000 y revelados con faloidina-rodamina. (C), (E) y (G) Células musculares esqueléticas no estimuladas o (D), (F) y (H) estimuladas con 100 nM insulina por 10 min. (C) y (D) se revelaron con anticuerpo anti actina; (E) y (F) con faloidina-Oregon Green; y (G) y (H) con faloidina-rodamina. Las flechas indican zona de reorganización de actina. Los paneles (A) y (B) se extrajeron de la Figura 23 de este trabajo, los paneles (C) y (D) de la referencia (177), (E) y (F) de la referencia (178), y (G) y (H) de la referencia (179).

7.5. Efecto de la sobreexpresión de TonEBP en la viabilidad celular

La sobreexpresión de wtTonEBP pero no de dnTonEBP, indujo muerte de los cardiomiocitos principalmente por necrosis. Este resultado resultó sorprendente ya que todos los trabajos que existen publicados en la literatura indican que TonEBP es importante en la citoprotección en varios modelos celulares (89,113-116). No existe ningún trabajo en la literatura que indique que TonEBP pueda inducir algún tipo de muerte celular. Existirían varias posibilidades que podrían explicar el mecanismo por el cual la sobreexpresión de wtTonEBP induce muerte celular. Estos corresponderían a:

7.5.1. Muerte celular mediada por sobreactivación de aldosa reductasa

La sobreexpresión adenoviral de wtTonEBP indujo la expresión de altos niveles de AR. Aunque la inducción de AR se ha asociado con respuestas compensatorias al estrés hiperosmótico, también se ha vinculado con el desarrollo de complicaciones en la diabetes (188-190), y en el daño inducido por isquemia y reperfusión miocárdica (102,103,107). En células epiteliales y células β -pancreáticas, la activación de AR indujo apoptosis por desbalance redox (191,192). En pericitos retinianos en cultivo, la apoptosis inducida por glucosa estaba mediada por AR e involucró un aumento del estrés oxidativo caracterizado por una reducción en el contenido de glutatión reducido (193). En cardiomiocitos la muerte inducida por estrés hiperosmótico fue mediada por AR, ya que su inhibición con zopolrestat atenuó la muerte celular inducida por sorbitol (37). Sin embargo, la muerte inducida por sobreexpresión de wtTonEBP no estaría mediada por un aumento en la actividad de AR, ya que su inhibición con zopolrestat no previno la muerte de los cardiomiocitos (Figura 37).

7.5.2. Muerte celular inducida por colapso metabólico

Como se describió en este trabajo, el estrés hiperosmótico induce muerte de los cardiomiocitos a través de una apoptosis independiente de caspasas que va vía un mecanismo que involucra el colapso metabólico. Por esta razón se evaluó la posibilidad que la muerte inducida por sobreexpresión de wtTonEBP también cursara a través de un colapso metabólico. Se determinó que los niveles intracelulares de ATP no decaían por la sobreexpresión de wtTonEBP indicando que estas células no mueren a través de este mecanismo (Figura 37).

7.5.3. Muerte celular mediada por el secuestro de proteínas que regulan muerte celular

TonEBP es parte de un gran complejo multiproteico (131,194). Por lo tanto, la sobreexpresión de wtTonEBP podría secuestrar proteínas, activando o inhibiendo alguna vía importante involucrada en el control de la muerte celular.

Algunas de las proteínas que conforman el complejo multiproteico que forma TonEBP se han identificado por coimmunoprecipitación con este factor transcripcional y corresponden a proteína quinasa A (PKA) (82), ataxia telangiectasia mutada (ATM) (81), RNA helicasa A (195), poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) (196) y proteína de estrés térmico 90 (HSP90) (196). PKA y ATM son activadas por alta concentración de NaCl y contribuyen a la activación de TonEBP (81,82). La sobreexpresión de RNA helicasa A inhibe la actividad de TonEBP en forma independiente de su actividad catalítica. Alta concentración de NaCl inhibe la interacción entre TonEBP y RNA helicasa A, el cual contribuye a la activación de TonEBP (195). PARP-1 reduce la actividad transcripcional de TonEBP y la actividad de su dominio de transactivación (196). HSP90 activa la transcripcional de TonEBP y además potencia el incremento de la masa de TonEBP en células expuestas a estrés hiperosmótico (196). Además de estas 5 proteínas se han identificado otras 11 proteínas que coimmunoprecipitan con TonEBP, que se agrupan en 4 clases: 1) proteínas kinasas dependiente de DNA, tanto sus subunidades catalíticas como su subunidad regulatoria, Ku86; 2) Helicasas tales como RNA helicasa nucleolar II/Gu y RNA helicasa p72; 3) ribonucleoproteínas pequeñas o heterogénea nuclear (snRNPs o hnRNPs) tales como proteína U5 snRNP-específica de 116 kDa, proteína U5 snRNP-específica de 200 kDa, hnRNP U, hnRNP M, hnRNP K, y hnRNP F; 4) proteínas de estrés térmico Hsc70 (196).

Dentro de estas proteínas llama la atención PARP-1, enzima que se ha asociado con la apoptosis y la necrosis (197). La proteólisis de PARP-1 por caspasas en forma muy temprana en la apoptosis señala la importancia de la poli ADP ribosilación en la muerte celular (198). De hecho, la fragmentación de PARP-1 se ha usado como una herramienta para la detección de la apoptosis en muchos modelos celulares, incluido cardiomiocitos (33). La proteólisis por las caspasas genera dos fragmentos de 24 y 89 kDa. El fragmento de 24 kDa, que contiene el dominio de unión a DNA, posiblemente facilita el proceso apoptótico impidiendo el acceso de las enzimas reparadoras del DNA hacia la cromatina fragmentada (199). Por otra parte, el fragmento de 89 kDa, que contiene los dominios catalítico y de automodificación, sería incapaz de activarse por el DNA fragmentado,

sugiriendo un posible mecanismo para prevenir la depleción de energía durante la apoptosis (197).

Por otra parte la poli ADP-ribosilación es un proceso energéticamente muy costoso. La síntesis de NAD⁺, el sustrato de la PARP, es dependiente de ATP. Además, se requiere la capacidad oxidoreductiva de esta coenzima en la cadena transportadora de electrones mitocondrial para mantener su gradiente de protones y poder así generar ATP. Debido a que PARP-1 responde al daño del DNA en una manera dosis dependiente, es posible que una sobreactivación de PARP-1 pueda producir la depleción de los depósitos de energía celular, que podría conducir a la pérdida de todas las funciones dependientes de energía, iniciando así la necrosis (198).

Hasta la fecha se desconoce si la unión de PARP-1 a TonEBP involucra la activación o inhibición de PARP-1. Si esto ocurriera, la activación de PARP-1 podría explicar la muerte celular cuando se sobreexpresa wtTonEBP (Figura 37).

7.5.4. Muerte celular mediada por el factor de necrosis tumoral- α

Se ha descrito que el estrés hiperosmótico induce la producción de citocinas, como por ejemplo interleukina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral (TNF) en células mononucleares de sangre periférica (200,201), y TNF- α en macrófagos y líneas celulares de linfocitos B (202). En células Jurkat T estimuladas con éster de forbol y estrés hiperosmótico se ha descrito un aumento en los niveles de mRNA para TNF. Usando ensayos de unión por inmunoprecipitación de cromatina, se ha detectado la unión de TonEBP al promotor de TNF- α , sugiriendo que TonEBP podría jugar un papel en la activación de la transcripción de TNF- α (56). En fibroblastos de ratón se demostró que TonEBP se une al promotor de TNF- α en un patrón distinto a otros miembros de la familia NFAT y es el responsable de la activación de la transcripción del mRNA para TNF- α inducido por estrés hiperosmótico (203)

El TNF tiene una función importante en varios eventos celulares tales como el shock séptico, inducción de otras citocinas, proliferación celular, diferenciación, necrosis y apoptosis (204-206). Originalmente fue identificado como un factor que producía una rápida necrosis hemorrágica de tumores transplantables en ratón (207). Las respuestas celulares inducidas por TNF están mediadas por dos receptores, TNF-R1 y TNF-R2, pertenecientes a la superfamilia de receptores de TNF (208). La unión de TNF a sus receptores trae consigo la activación de la vía de las MAP kinasas, incluyendo ERK, p38-MAPK y JNK, y de NF κ B (204,209,210). En muchos modelos celulares existe además

inducción de apoptosis o necrosis (204,209,210). La inducción de la apoptosis o necrosis es activada principalmente por el TNF-R1, y debido a esto este receptor es conocido también como receptor de muerte (211-213).

Como se mencionó en la introducción, TNF activa la vía extrínseca de la apoptosis con activación de la caspasa 8 (25-27). Sin embargo, se ha descrito que la activación de TNF-R1 por TNF produce estrés oxidativo a través de RIP, TRAF2 y JNK, controlando la muerte de las células a través de un mecanismo de apoptosis independiente de caspasas (214,215). Este hecho hace interesante explorar a futuro si la sobreexpresión de wtTonEBP en los cardiomiocitos induce la activación de la transcripción de TNF- α , que a su vez activaría eventos que conllevaría a la muerte de estas células (Figura 37).

7.6. TonEBP como factor osmoprotector

Como se ha mencionado anteriormente, TonEBP es el único factor transcripcional de eucariontes que se activa frente a cambios osmóticos del medio extracelular (52). Debido a que controla la expresión de genes relacionados con la regulación del volumen celular, este factor transcripcional es considerado el regulador maestro de la osmoprotección (53,60,73,90). Ratones knock out para TonEBP o que expresan *in vivo* dnTonEBP tienen consecuencias renales y extrarenales importantes. Los ratones knock out para los dos alelos de TonEBP mueren mayoritariamente en la etapa embrionaria tardía, entre E14,5 y E17,5 (115,216). Los pocos ratones sobrevivientes mueren perinatalmente antes de los 10 días de edad presentando una gran y progresiva atrofia de la médula renal, acoplada con una falla en la activación de los genes blancos de TonEBP tales como AR, BGT1 y SMIT (115). Esta atrofia de la médula renal se explica por la alta hiperosmolaridad, particularmente por Na⁺ y urea, a que son sometidas estas células durante el proceso de concentración de la orina (52,73,217).

Los ratones heterocigotos exhiben defectos en la inmunidad adaptativa, evidenciado por hipocelularidad linfoide e incapacidad para inducir la síntesis de anticuerpos frente a un estímulo antigénico (216). Además, en cultivo, linfocitos heterocigotos para TonEBP proliferan más lentamente en medio hiperosmótico, efecto que no se manifiesta en medio isosmótico (132,216). Ratones que sobreexpresan una forma dominante negativa de TonEBP en los lentes desarrollan catarata nuclear muy pronto después del nacimiento (114). El desarrollo de las células de las fibras en estos lentes exhibe un estado fisiológico similar a la producida por hiperosmolaridad, incluida la

fragmentación del DNA, activación de p53, e inducción de las kinasas reguladoras del ciclo celular (114).

Sin embargo, TonEBP se encuentra también en forma muy abundante en el cerebro (69). Las células cerebrales, al igual que las células cardíacas, no están normalmente sometidas a cambios osmóticos, y a pesar de ello parecen estar equipadas con mecanismos osmoadaptativos a la hiperosmolaridad (218-221). Es así como el contenido tisular de taurina y mio-inositol en el cerebro aumentó en animales sometidos a hipertonicidad por sobrecarga de sal (222,223) y disminuyó en animales sometidos a hipotonicidad (224). Por otra parte, en tejido cerebral proveniente de animales sometidos a hipertonicidad por sobrecarga de sal también se detectó incremento en los niveles de mRNA que codifican para genes osmoreguladores (225-227). Además se ha descrito que TonEBP se expresa en condiciones basales en el núcleo celular de las neuronas donde es inducido rápidamente por elevación de la hipertonicidad sistémica (57), mientras en células no neuronales, tales como astrocitos, oligodendrocitos, ependimocitos, microglia y células endoteliales, no presentan expresión significativa de TonEBP en condiciones basales ni en condiciones prolongadas de hipertonicidad (228). A pesar de que es claro que el tejido cerebral, y en particular las neuronas, responden al estrés hiperosmótico, hasta la fecha no existen trabajos que describan fehacientemente que la activación de los genes osmoreguladores en el cerebro, confiere protección a este órgano frente al estrés hiperosmótico.

Las únicas dos funciones atribuidas a TonEBP no relacionadas con el control transcripcional de genes osmoregulatorios corresponden a la regulación de la proliferación de mioblastos y al control de la replicación del VIH (88,92).

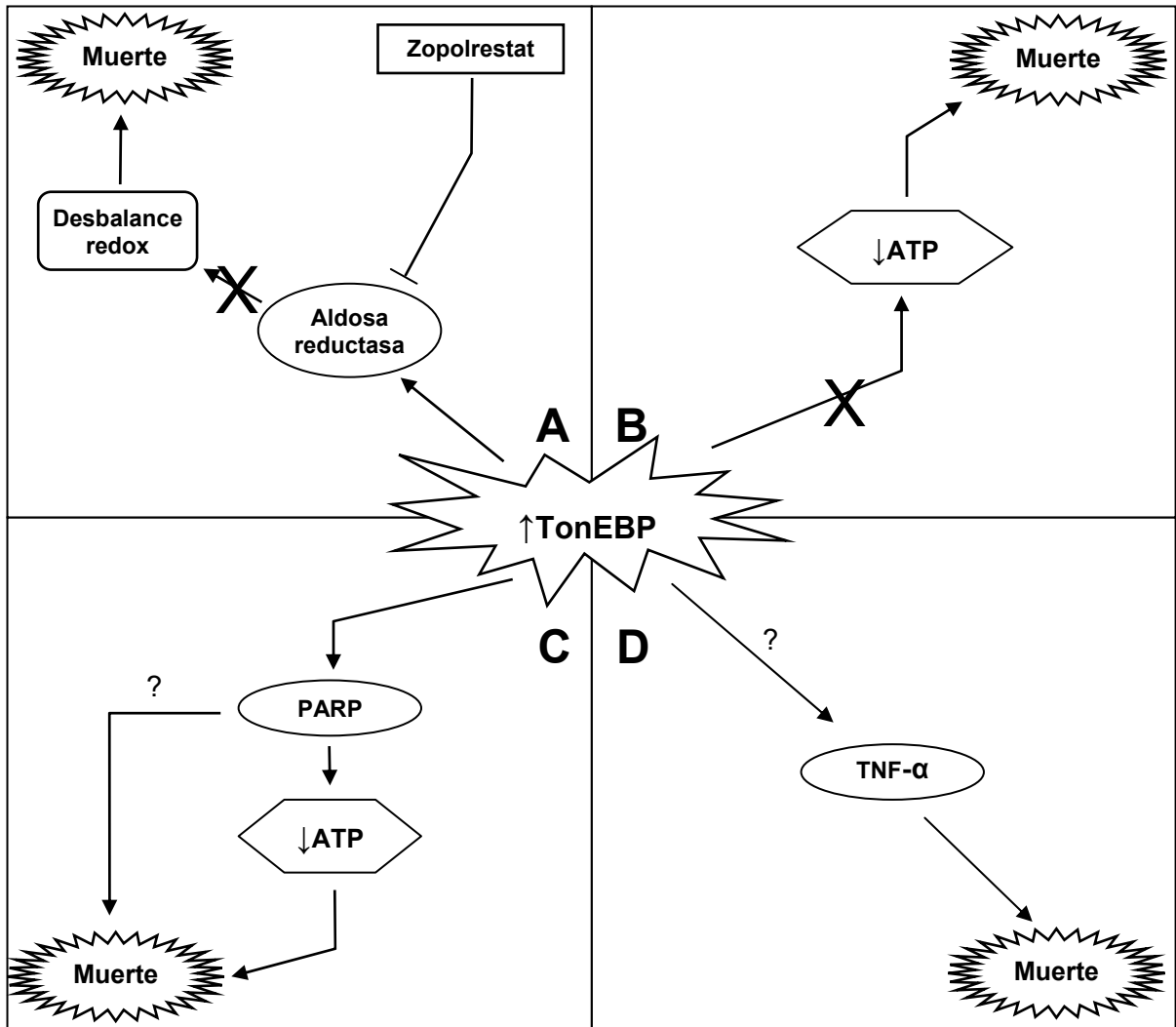


Figura 37. Mecanismos propuestos para explicar la muerte inducida en los cardiomiocitos por sobreexpresión de TonEBP.

(A) La sobreexpresión de TonEBP incrementa los niveles de aldosa reductasa (AR) que puede provocar un desbalance redox y muerte. Sin embargo, zopolrestat, un inhibidor de AR, no rescata a los cardiomiocitos de la muerte, sugiriendo que este mecanismo no ocurre. (B) La sobreexpresión de TonEBP provocaría un colapso metabólico similar al encontrado en el estrés hiperosmótico. Sin embargo, no se detectó disminución de los niveles de ATP por sobreexpresión de TonEBP. (C) Se ha descrito que la poli ADP ribosa polimerasa-1 (PARP) forma parte del complejo multiproteico de TonEBP. La sobreactivación de PARP provoca muerte por depleción de ATP. Se desconoce si la sobreexpresión de TonEBP puede alterar la actividad de PARP induciendo muerte, ya sea en forma dependiente o independiente de los niveles de ATP. (D) Se ha descrito que TonEBP controla la expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Se desconoce si la sobreexpresión de TonEBP incrementa la expresión de TNF- α , lo que a su vez induciría muerte de los cardiomiocitos.

7.7. Función del TonEBP en el corazón

La presencia de TonEBP en el corazón se describió por primera vez usando inmunohistoquímica de embriones de ratón de 17,5 días de gestación (69). En dicho estudio se describió que TonEBP tenía una expresión moderada en las glándulas salivales, pulmón, páncreas, vejiga y estómago, mientras que poseía una alta expresión en el cerebro, hígado y corazón (69). A pesar de esta alta expresión, los autores no le atribuyeron ninguna función fisiológica al TonEBP cardíaco. Recientemente, Ito y cols describieron que la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina estaba asociada con la degradación de TonEBP sugiriendo un papel cardioprotector para este factor transcripcional (113).

Zhang y cols, utilizando un modelo de “escape de vasopresina” para inducir una reducción de la osmolaridad plasmática desde 294 a 241 mOsm, describieron que existía una reducción en los niveles de mRNA de TonEBP en el hígado pero no en el corazón (83). Además ellos no detectaron la presencia de la proteína TonEBP en el tejido cardíaco. Estos autores sugieren que en el hígado los cambios osmóticos controlarían bidireccionalmente la actividad de TonEBP, pero que en otros tejidos, debido a que TonEBP no respondería a hiposmolaridad, este factor transcripcional tendría otra función (83). Sin embargo, resultados obtenidos en nuestro Laboratorio indicarían un resultado contradictorio, ya que nosotros hemos detectado la presencia de la proteína TonEBP en tejido cardíaco de origen fetal, neonatal y adulto. Además, el estrés hiperosmótico induce el mRNA y la proteína de TonEBP, mientras que el estrés hiposmótico los disminuye (76). Estos resultados sugerirían que los cardiomiocitos podrían controlar bidireccionalmente la activación de TonEBP.

Sin embargo, debido a que el tejido cardíaco no está normalmente sometido a cambios osmóticos (35), es razonable suponer que TonEBP cumple alguna otra función en el miocardio. Algunas de estas probables funciones podrían estar relacionados con la hipertrofia cardíaca, la miogénesis o con la regulación de la osmolaridad funcional asociada con el metabolismo cardíaco (Figura 38).

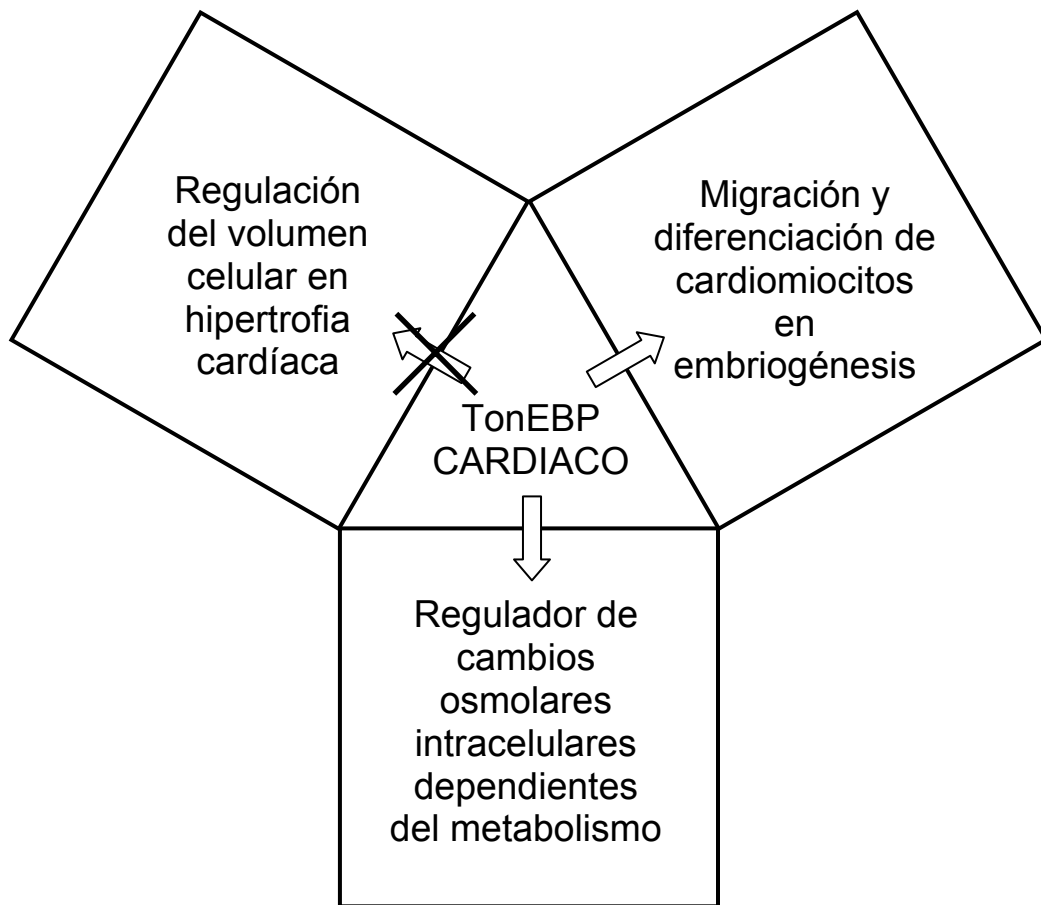


Figura 38. Potenciales funciones del factor transcripcional TonEBP en el tejido cardíaco no asociadas a la respuestas a cambios osmolares externos.

7.7.1. TonEBP y su relación con la hipertrofia cardíaca

Los cardiomiocitos, protagonistas centrales en el proceso de contracción cardíaca, son células terminalmente diferenciadas que cesan de dividirse casi inmediatamente después del nacimiento (6,7). A fin de responder a crecientes requerimientos de trabajo que impone una sobrecarga volumen o de presión provocada por ejemplo por hipertensión arterial, infarto al miocardio, desórdenes endocrinos y enfermedades valvulares, los cardiomiocitos experimentan un aumento importante del número de sarcómeros por célula y de su volumen celular, proceso conocido como hipertrofia (229).

Debido a que TonEBP está involucrado con la regulación del volumen celular, es posible especular que TonEBP participa en el aumento del volumen de los cardiomiocitos asociados con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Al transducir corazones *in vivo* con Ad wtTonEBP se observó un aumento del tamaño relativo del corazón comparado con ratas transducidas con adenovirus control (Ad LacZ). Sin embargo, este hallazgo no es indicativo de hipertrofia, ya que este aumento de masa relativa cardíaca se debería más a una disminución del peso corporal de las ratas transducidas con Ad wtTonEBP más que a un aumento del peso del corazón.

Durante la hipertrofia cardíaca se induce la síntesis de proteínas asociadas con la maquinaria contráctil, tales como β -MHC y α -actina (230). En experimentos *in vitro*, se determinó que la sobreexpresión de wtTonEBP inhibió la expresión de β -MHC. Estos datos permiten sugerir que TonEBP no estaría involucrado en el desarrollo de la hipertrofia de los cardiomiocitos, y que más bien, se comportaría como un inhibidor de este proceso.

7.7.2. Función de TonEBP en la migración y diferenciación de mioblastos durante la miogénesis

Se ha descrito que, además del tejido cardíaco, TonEBP está presente y es transcripcionalmente activo en cultivos primarios de células musculares y tejido muscular esquelético (88). En estas células, se demostró que TonEBP tendría una función muy importante durante la regeneración muscular. Mioblastos que expresan dnTonEBP tienen defectos en la migración y en la diferenciación *in vitro* (88). Estos autores describieron que el blanco transcripcional de TonEBP responsable de la regulación de la migración sería la proteína de matriz Cyr61, un factor de crecimiento de tejido conectivo rico en cisteínas (88).

Sin embargo, a diferencia del músculo esquelético, el tejido cardíaco tiene una muy limitada o casi nula capacidad de regeneración después de un daño tisular (231). Además no existen trabajos en la literatura que describan a presencia de Cyr61 en cardiomiocitos. A pesar de ello, se ha descrito que ratones knock out para Cyr61 muestran deformaciones cardiovasculares severas (232). Con estos datos uno podría especular que es probable que TonEBP tenga alguna función relevante durante la embriogénesis del músculo cardíaco, pero no en el tejido adulto.

7.7.3. TonEBP como regulador de la osmolaridad funcional asociado al metabolismo cardíaco

Debido a que la osmolaridad plasmática y probablemente la de todos los fluidos intersticiales se mantiene muy regulada y prácticamente no cambia, la función de TonEBP asociada con su capacidad para responder al estrés osmótico en prácticamente todos los tejidos que se ha estudiado no está dilucidada. Una posible explicación se ha originado a partir de los estudios de la función de TonEBP en el sistema inmune (86,89).

La pérdida parcial de la función de TonEBP por expresión transgénica de un dnTonEBP en el sistema inmune, produce una disminución en el número de células linfoides con alteración en el crecimiento y la supervivencia de los linfocitos T bajo condiciones de estrés hiperosmótico (86,216). Los animales homocigotos knock out para TonEBP mueren perinatalmente (115), pero los animales heterocigotos son viables y exhiben un fenotipo inmunológico muy similar a los animales que expresan el dnTonEBP, incluido la falla en inducir la síntesis de anticuerpos en forma dependiente de célula T después de una inmunización (216). Además, mediciones directas demostraron que la osmolaridad del tejido linfóide normal era más alta que la de la sangre (216), demostrando que la hiperosmolaridad podía existir en tejidos diferentes a la médula renal.

Ho (90,217) postula que la existencia de estrés hipertónico en condiciones fisiológicas en tejidos no renales parece representar una forma distinta de estrés celular. Este tipo de estrés osmótico estaría asociado con la rápida proliferación celular de los timocitos inmaduros y linfocitos activados que ocurre después de una inmunización, el cual estaría asociado a su vez con una alta tasa metabólica (233,234). De esta manera Ho postula que los cambios que ocurren dentro de la célula como resultado de un metabolismo/división celular muy activo puede dar origen a alteraciones en la homeostasis intracelular del agua, muy similar a la que se obtiene al exponer a las células a un medio hiperosmótico (90,217). Como resultado de la inducción de la biosíntesis de

macromoléculas, la activación del metabolismo y proliferación celular produciría una disminución en el volumen intracelular disponible. Además, la biosíntesis involucraría el consumo de precursores, tales como aminoácidos e inositol, que funcionan como osmolitos intracelulares. Estos cambios producirían una disminución en la concentración de agua intracelular y así produciría un estrés osmótico que sería funcionalmente idéntico a la exposición de una célula a hipertonicidad extracelular. Consistente con esta hipótesis cultivos de fibroblastos humanos crecidos en condiciones isotónicas pero en ausencia de aminoácidos libres inducen una reducción en la concentración intracelular de aminoácidos y una concomitante reducción en el volumen celular, resultando en la activación de TonEBP, un incremento en la proteína TonEBP y un aumento de su translocación nuclear (235). De esta manera, la respuesta al estrés osmótico definido por la activación de TonEBP mediaría la adaptación celular no sólo a un incremento de la osmolaridad extracelular, sino que también frente a cualquier otro proceso que afecte la homeostasis intracelular del agua (Figura 39). Otra observación que apoya a esta hipótesis es la realizada por Rorgaard y cols (236). Trabajando en fibroblastos NIH3T3 estos investigadores describieron que el aumento de las concentraciones de iones intracelulares y no la reducción del volumen celular era el responsable de la activación de TonEBP (236).

El corazón es un órgano que tiene una alta demanda de energía ya que late normalmente unas 100.000 veces por día. Para mantener su función contráctil, el corazón necesita un suministro continuo y abundante de energía, transformando la energía química almacenada en la glucosa, cuerpos cetónicos y ácidos grasos libres (AGLs) en energía mecánica empleada en la interacción actina/miosina a nivel de las miofibrillas (237). Diariamente, el corazón sintetiza 70 veces su peso en ATP (238), unos 30 Kg. Aproximadamente 60-70% de la hidrólisis de ATP está destinado al acortamiento de las fibras musculares y el restante 30-40% es usado principalmente por las Ca^{2+} -ATPasas del retículo sarcoplasmático y otras bombas (239,240). El corazón tiene un contenido de ATP relativamente bajo (5 $\mu\text{mol/g}$ peso húmedo) y una alta velocidad de hidrólisis de ATP ($\sim 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}$ peso húmedo $^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ en reposo), de esta manera existe en condiciones normales un recambio completo el pool de ATP miocárdico en aproximadamente cada 10 s (237).

Una de las principales características de la energética cardíaca es que existe un aumento lineal del consumo de oxígeno con respecto al trabajo en ausencia de cambios apreciables del contenido intracelular de ATP y fosfocreatina (PCr) (241). Por otra parte,

trabajando en corazones aislados se ha podido establecer que la tasa de respiración cardíaca puede cambiar entre 15–20 veces, desde valores de alrededor de $8\text{-}12 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{g peso seco})^{-1}$ en reposo a valores máximos de $170 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{g peso seco})^{-1}$ en ejercicio (242).

Para poder cumplir los requerimientos metabólicos del corazón, y suponiendo que la tasa de respiración es un indicador del metabolismo cardíaco (242,243), la tasa de síntesis de ATP debería incrementarse entre 15–20 veces. Sin embargo, se ha establecido que la velocidad de síntesis de ATP por la mitocondria siempre procede, aún en reposo, con una velocidad de $\geq 80\%$ de V_{max} (entre 120 y $130 \mu\text{mol de O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{g peso seco})^{-1}$ (242,244). Debido a esto, se ha propuesto que la mayor fuente de ATP durante condiciones de ejercicio provendría por síntesis a partir de la PCr catalizada por la creatina kinasa (CK) (244) a través de la siguiente reacción:



Las concentraciones intracelulares del pool de creatina son del orden de $24,7 \text{ mM}$, la de PCr de alrededor de 15 mM , fosfato libre de $2,6 \text{ mM}$ y el ADP oscilaría entre $30 - 40 \mu\text{M}$ (244,245). Sin embargo, mediante modelamiento matemático se ha estimado que durante el ejercicio las concentraciones intracelulares de ADP, y por ende de ATP, fosfato, creatina y PCr, mostrarían variaciones dentro del ciclo cardíaco, y en la fase sistólica sus niveles subirían en más de un orden de magnitud (244,246). Estas variaciones se incrementarían en forma directamente proporcional al trabajo cardíaco (Figura 40) (244,246). Esto permite suponer que el número de moléculas dentro de las células cardíacas varían oscilatoriamente de acuerdo al ciclo cardíaco.

De acuerdo con la hipótesis planteada por Ho (90,217) esto indicaría que en forma paralela a la variación del número de moléculas intracelulares existiría también una variación oscilatoria y dependiente del trabajo de la tonicidad intracelular. Este particular hecho, existente exclusivamente en el músculo cardíaco, permitiría hipotetizar que el papel de TonEBP podría estar relacionado con el control de la tonicidad intracelular durante el trabajo cardíaco. Un antecedente que podría apoyar esta hipótesis vendría del hecho que la transducción de Ad dnTonEBP en el corazón produce una mortalidad en los animales que no se detectó en los animales transducidos con Ad LacZ y Ad wtTonEBP. Esta mortalidad podría estar asociada a una falla de la osmoregulación durante el ciclo cardíaco.

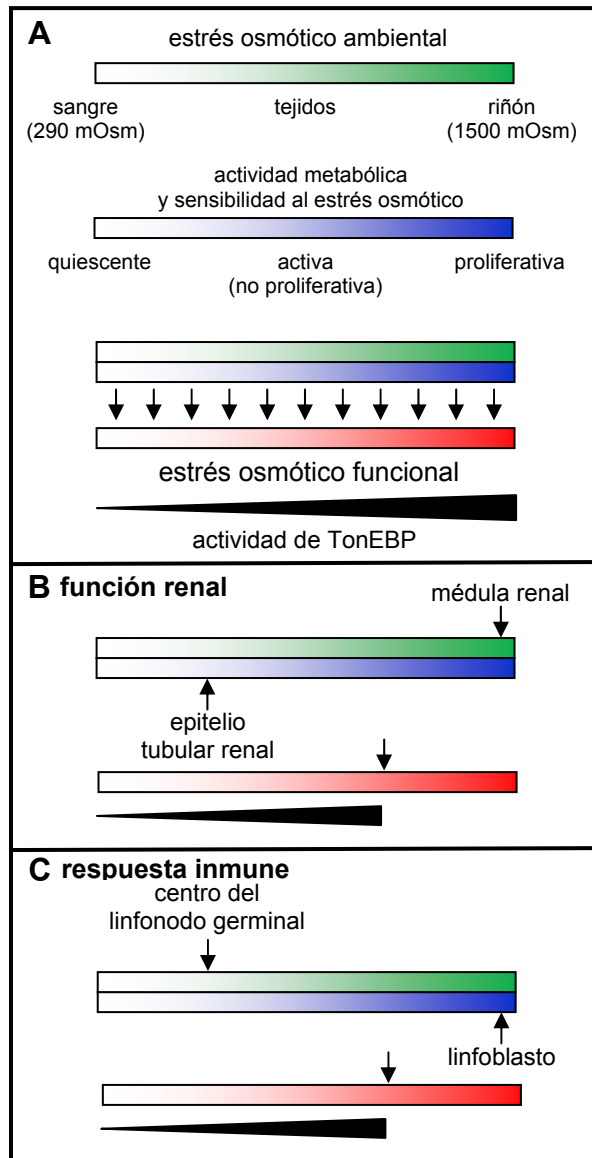


Figura 39. Contribuciones de las osmolaridades extracelulares e intracelulares a estrés hipertónico funcional.

(A) En el organismo la osmolaridad varía desde 290 mOsm, que corresponde a la sangre, hasta 1.500 mOsm, que representa a la osmolaridad en la médula renal. En tejidos no renales la osmolaridad puede aumentar hasta unos 350 mOsm. En células no proliferativas la actividad metabólica celular puede variar desde baja, por ejemplo en células quiescentes, regular o activa, por ejemplo en células hepática. En células proliferativas el metabolismo celular puede ser muy alto, como por ejemplo en linfocitos activados. Una actividad metabólica baja o intermedia dentro de un tejido sometido a una osmolaridad extracelular alta, tales como las células de la médula renal (B) puede estar sometida un estrés osmótico funcionalmente equivalente a células con una actividad metabólica muy alta ubicadas en un entorno con una osmolaridad baja o intermedia, como por ejemplo en el centro germinal de un nodo linfático durante la respuesta inmune (C). Figura extraída de la referencia (217).

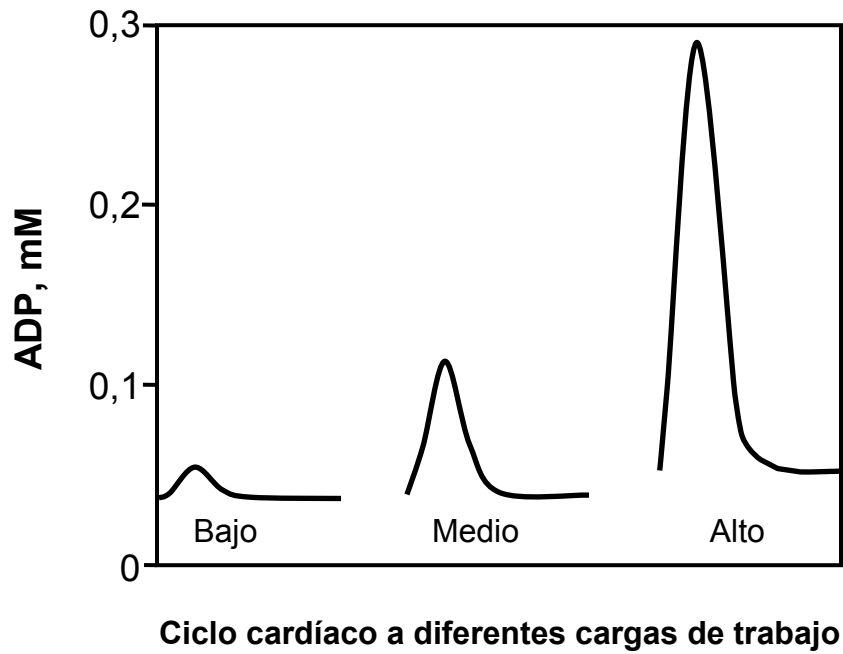


Figura 40. Cambio en la concentración intracelular de ADP durante el ciclo cardíaco y a diferentes cargas de trabajo. Las condiciones corresponden a consumo de oxígeno de 25 (Bajo), 50 (Medio) y 100 (Alto) $\mu\text{mol}\cdot\text{g peso seco}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Figura reproducida de la referencia (246).

8. CONCLUSIONES

- 1) El estrés hiperosmótico indujo muerte de los cardiomiocitos por un mecanismo independiente de caspasas, que involucra entrada de Ca^{2+} desde el extracelular a través de un canal de Ca^{2+} tipo L, aumento del Ca^{2+} citoplasmático, aumento del Ca^{2+} mitocondrial, depolarización mitocondrial, y caída en los niveles intracelulares del ATP causando un colapso metabólico.
- 2) La isquemia activó a TonEBP ya que en un modelo *in vivo* de infarto cardiaco, los niveles proteicos de TonEBP aumentaron en el sitio vecino al infarto; y en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos en cultivo, la isquemia y reperfusión simulada incrementó los niveles de TonEBP y de uno de sus genes blancos, aldosa reductasa.
- 3) La sobreexpresión de wtTonEBP, pero no dnTonEBP, indujo muerte de los cardiomiocitos principalmente por necrosis en una manera MOI dependiente. Esta muerte no fue mediada por aldosa reductasa ni por colapso metabólico.
- 4) La expresión intracardíaca de dnTonEBP, pero no de wtTonEBP, indujo muerte de las ratas inoculadas con los adenovirus.
- 5) TonEBP no participa en la protección de los cardiomiocitos frente a la muerte inducida por estrés hiperosmótico, ya que la sobreexpresión de wtTonEBP o de dnTonEBP no protegieron de la muerte de los cardiomiocitos inducida por sorbitol 600 mOsm.

9. REFERENCIAS

1. Kannel WB. Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol* 2000; **53**:229-235.
2. Prieto JC, Corbalan R, Chavez E, Lanas F, Cumsille F, Nazzari C. [Acute myocardial infarction in Chilean hospitals. Final results of the GEMI study]. *Rev Med Chil* 1999; **127**:763-774.
3. Gottdiener JS, Arnold AM, Aurigemma GP, Polak JF, Tracy RP, Kitzman DW, Gardin JM, Rutledge JE, Boineau RC. Predictors of congestive heart failure in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2000; **35**:1628-1637.
4. Kauffmann R. [Acute myocardial infarction: the evolving knowledge about the disease]. *Rev Med Chil* 1999; **127**:759-762.
5. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; **83**:1849-1865.
6. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 1991; **5**:3037-3046.
7. von Harsdorf R, Hauck L, Mehrhof F, Wegenka U, Cardoso MC, Dietz R. E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1999; **85**:128-136.
8. Anversa P, Li P, Zhang X, Olivetti G, Capasso JM. Ischaemic myocardial injury and ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 1993; **27**:145-157.
9. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**:291-305.
10. Bing OH. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 1994; **26**:943-948.
11. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; **94**:1621-1628.
12. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; **74**:86-107.

13. Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 1995; **73**:771-787.
14. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; **148**:141-149.
15. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 2003; **92**:715-724.
16. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**:239-257.
17. Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 2001; **202**:159-242.
18. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; **146**:3-15.
19. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 1997; **100**:1813-1821.
20. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 1995; **96**:2247-2259.
21. Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000; **485**:7-12.
22. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; **95**:320-323.
23. Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; **75**:426-433.
24. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; **97**:2891-2897.

25. Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol* 2001; **1**:141-150.
26. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**:770-776.
27. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenameele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**:356-370.
28. Bratton SB, Cohen GM. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22**:306-315.
29. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**:1322-1326.
30. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res* 1999; **85**:940-949.
31. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**:1132-1136.
32. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; **45**:528-537.
33. Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Diaz-Araya G, Lavandero S. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* 2001; **304**:279-285.
34. Galvez AS. Mecanismos de regulación de la apoptosis del cardiomiocito por estrés hiperosmótico y factores de crecimiento. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Universidad de Chile, 2002.
35. Wright AR, Rees SA. Cardiac cell volume: crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types. *Pharmacol Ther* 1998; **80**:89-121.
36. Diaz-Elizondo J, Chiong M, Rojas-Rivera D, Olea-Azar C, Kwon HM, Lavandero S. Reactive oxygen species inhibit hyposmotic stress-dependent volume regulation in cultured rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **350**:1076-1081.
37. Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis - Differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem* 2003; **278**:38484-38494.

38. Trantum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res* 1981; **49**:364-381.
39. Wright AR, Rees SA. Targeting ischaemia--cell swelling and drug efficacy. *Trends Pharmacol Sci* 1997; **18**:224-228.
40. Vandenberg JI, Rees SA, Wright AR, Powell T. Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 1996; **32**:85-97.
41. Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA, Jr., Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol* 1974; **74**:399-422.
42. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res* 1987; **60**:478-486.
43. Garcia-Dorado D, Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993; **27**:1555-1563.
44. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 1985; **57**:864-875.
45. Bernier M, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms of protection by glucose and mannitol. *Am J Physiol* 1988; **254**:H862-H870.
46. Powers ER, DiBona DR, Powell WJ, Jr. Myocardial cell volume and coronary resistance during diminished coronary perfusion. *Am J Physiol* 1984; **247**:H467-H477.
47. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 1995; **268**:F983-F996.
48. Bortner CD, Cidlowski JA. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol* 1996; **271**:C950-C961.
49. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 2001; **532**:3-16.
50. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982; **217**:1214-1222.

51. Burg MB, Kwon ED, Kultz D. Osmotic regulation of gene expression. *FASEB J* 1996; **10**:1598-1606.
52. Burg MB, Kwon ED, Kultz D. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 1997; **59**:437-455.
53. Kwon HM, Handler JS. Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**:465-471.
54. Lam AK, Ko BC, Tam S, Morris R, Yang JY, Chung SK, Chung SS. Osmotic response element-binding protein (OREBP) is an essential regulator of the urine concentrating mechanism. *J Biol Chem* 2004; **279**:48048-48054.
55. Ko BC, Lam AK, Kapus A, Fan L, Chung SK, Chung SS. Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the osmotic response element-binding protein/tonicity-responsive enhancer-binding protein (OREBP/TonEBP). *J Biol Chem* 2002; **277**:46085-46092.
56. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF- κ B families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 2001; **15**:47-58.
57. Loyher ML, Mutin M, Woo SK, Kwon HM, Tappaz ML. Transcription factor tonicity-responsive enhancer-binding protein (TonEBP) which transactivates osmoprotective genes is expressed and upregulated following acute systemic hypertonicity in neurons in brain. *Neuroscience* 2004; **124**:89-104.
58. Woo SK, Nahm O, Kwon HM. How salt regulates genes: function of a Rel-like transcription factor TonEBP. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **278**:269-271.
59. Woo SK, Lee SD, Kwon HM. TonEBP transcriptional activator in the cellular response to increased osmolality. *Pflugers Arch* 2002; **444**:579-585.
60. Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillon J, Morancho B, Santiago V, Lopez-Rodriguez C. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Pharmacol* 2006; **72**:1597-1604.
61. Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med* 2002; **30**:S18-S26.
62. Lee SD, Woo SK, Kwon HM. Dimerization is required for phosphorylation and DNA binding of TonEBP/NFAT5. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **294**:968-975.

63. Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 1998; **392**:42-48.
64. Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L. Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol* 2002; **9**:90-94.
65. Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* 2002; **22**:5753-5760.
66. Ito T, Fujio Y, Schaffer SW, Azuma J. Involvement of transcriptional factor TonEBP in the regulation of the taurine transporter in the cardiomyocyte. *Adv Exp Med Biol* 2009; **643**:523-532.
67. Zhou X, Ferraris JD, Burg MB. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol* 2005.
68. Zhou X, Ferraris JD, Cai Q, Agarwal A, Burg MB. Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol* 2005; **289**:F377-F385.
69. Maouyo D, Kim JY, Lee SD, Wu Y, Woo SK, Kwon HM. Mouse TonEBP-NFAT5: expression in early development and alternative splicing. *Am J Physiol* 2002; **282**:F802-F809.
70. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:7214-7219.
71. Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol* 2001; **280**:C248-C253.
72. Cha JH, Woo SK, Han KH, Kim YH, Handler JS, Kim J, Kwon HM. Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor tonicity responsive enhancer binding protein in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**:2221-2230.
73. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 2007; **87**:1441-1474.
74. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Copeland NG, Gilbert DJ, Thomas S, Disteché C, Jenkins NA, Rao A. NF-AT5: the NF-AT family of transcription

- factors expands in a new direction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; **64**:517-526.
75. Tong EH, Guo JJ, Huang AL, Liu H, Hu CD, Chung SS, Ko BC. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *J Biol Chem* 2006.
 76. Navarro P, Chiong M, Volkwein K, Moraga F, Ocaranza MP, Jalil JE, Lim SW, Kim JA, Kwon HM, Lavandero S. Osmotically-induced genes are controlled by the transcription factor TonEBP in cultured cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **372**:326-330.
 77. Navarro P. TonEBP en la regulación frente al estrés hiperosmótico en cardiomiocitos. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Universidad de Chile, 2006.
 78. Lee SD, Colla E, Sheen MR, Na KY, Kwon HM. Multiple domains of TonEBP cooperate to stimulate transcription in response to hypertonicity. *J Biol Chem* 2003; **278**:47571-47577.
 79. Ferraris JD, Williams CK, Persaud P, Zhang Z, Chen Y, Burg MB. Activity of the TonEBP/OREBP transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:739-744.
 80. Nahm O, Woo SK, Handler JS, Kwon HM. Involvement of multiple kinase pathways in stimulation of gene transcription by hypertonicity. *Am J Physiol* 2002; **282**:C49-C58.
 81. Irarrazabal CE, Liu JC, Burg MB, Ferraris JD. ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:8809-8814.
 82. Ferraris JD, Persaud P, Williams CK, Chen Y, Burg MB. cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/ osmotic response element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:16800-16805.
 83. Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, Brisc I, Burg MB. Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hyposmotic rats. *Am J Physiol* 2003; **285**:F688-F693.
 84. Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM. The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem* 2000; **275**:38275-38280.

85. Hasler U, Jeon US, Kim JA, Mordasini D, Kwon HM, Feraille E, Martin PY. Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**:1521-1531.
86. Trama J, Go WY, Ho SN. The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. *J Immunol* 2002; **169**:5477-5488.
87. Ju J, Zou K, Xie H. Downregulation of NFAT5 by RNA interference reduces monoclonal antibody productivity of hybridoma cells. *Cell Res* 2007; **17**:264-270.
88. O'Connor RS, Mills ST, Jones KA, Ho SN, Pavlath GK. A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. *J Cell Sci* 2007; **120**:149-159.
89. Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol* 2000; **165**:4884-4894.
90. Ho SN. The role of NFAT5/TonEBP in establishing an optimal intracellular environment. *Arch Biochem Biophys* 2003; **413**:151-157.
91. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 2002; **4**:540-544.
92. Ranjbar S, Tsytsykova AV, Lee SK, Rajsbaum R, Falvo JV, Lieberman J, Shankar P, Goldfeld AE. NFAT5 regulates HIV-1 in primary monocytes via a highly conserved long terminal repeat site. *PLoS Pathog* 2006; **2**:e130.
93. Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB, Garcia-Perez A. Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**:10742-10746.
94. Cai Q, Ferraris JD, Burg MB. High NaCl increases TonEBP/OREBP mRNA and protein by stabilizing its mRNA. *Am J Physiol* 2005; **289**:F803-F807.
95. Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB, Garcia-Perez A. ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 1996; **271**:18318-18321.
96. Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, Garcia-Perez A. Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am J Physiol* 1999; **276**:C667-C673.

97. Srivastava S, Chandrasekar B, Bhatnagar A, Prabhu SD. Lipid peroxidation-derived aldehydes and oxidative stress in the failing heart: role of aldose reductase. *Am J Physiol* 2002; **283**:H2612-H2619.
98. Lee AY, Chung SK, Chung SS. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:2780-2784.
99. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**:S233-S236.
100. li S, Ohta M, Kudo E, Yamaoka T, Tachikawa T, Moritani M, Itakura M, Yoshimoto K. Redox state-dependent and sorbitol accumulation-independent diabetic albuminuria in mice with transgene-derived human aldose reductase and sorbitol dehydrogenase deficiency. *Diabetologia* 2004; **47**:541-548.
101. Bhatnagar A, Ruef J, Liu S, Srivastava S, Srivastava SK. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by aldose reductase. *Chem Biol Interact* 2001; **130-132**:627-636.
102. Ruef J, Liu SQ, Bode C, Tocchi M, Srivastava S, Runge MS, Bhatnagar A. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**:1745-1752.
103. Ramasamy R, Oates PJ, Schaefer S. Aldose reductase inhibition protects diabetic and nondiabetic rat hearts from ischemic injury. *Diabetes* 1997; **46**:292-300.
104. Ramasamy R, Liu H, Oates PJ, Schaefer S. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor zopolrestat. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:130-139.
105. Hwang YC, Sato S, Tsai JY, Yan S, Bakr S, Zhang H, Oates PJ, Ramasamy R. Aldose reductase activation is a key component of myocardial response to ischemia. *FASEB J* 2002; **16**:243-245.
106. Hwang YC, Bakr S, Ellery CA, Oates PJ, Ramasamy R. Sorbitol dehydrogenase: a novel target for adjunctive protection of ischemic myocardium. *FASEB J* 2003; **17**:2331-2333.
107. Ramasamy R, Trueblood N, Schaefer S. Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1998; **275**:H195-H203.

108. Tracey WR, Magee WP, Ellery CA, MacAndrew JT, Smith AH, Knight DR, Oates PJ. Aldose reductase inhibition alone or combined with an adenosine A(3) agonist reduces ischemic myocardial injury. *Am J Physiol* 2000; **279**:H1447-H1452.
109. Hwang YC, Kaneko M, Bakr S, Liao H, Lu Y, Lewis ER, Yan S, li S, Itakura M, Rui L, Skopicki H, Homma S, Schmidt AM, Oates PJ, Szabolcs M, Ramasamy R. Central role for aldose reductase pathway in myocardial ischemic injury. *FASEB J* 2004; **18**:1192-1199.
110. Shinmura K, Bolli R, Liu SQ, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Srivastava S, Bhatnagar A. Aldose reductase is an obligatory mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 2002; **91**:240-246.
111. Eaton P, Li JM, Hearse DJ, Shattock MJ. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am J Physiol* 1999; **276**:H935-H943.
112. Lucas DT, Szweda LI. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:510-514.
113. Ito T, Fujio Y, Takahashi K, Azuma J. Degradation of NFAT5, a transcriptional regulator of osmotic stress-related genes, is a critical event for doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2007; **282**:1152-1160.
114. Wang Y, Ko BC, Yang JY, Lam TT, Jiang Z, Zhang J, Chung SK, Chung SS. Transgenic mice expressing dominant-negative osmotic-response element-binding protein (OREBP) in lens exhibit fiber cell elongation defect associated with increased DNA breaks. *J Biol Chem* 2005; **280**:19986-19991.
115. Lopez-Rodriguez C, Antos CL, Shelton JM, Richardson JA, Lin F, Novobrantseva TI, Bronson RT, Igarashi P, Rao A, Olson EN. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:2392-2397.
116. Kwon MS, Na KY, Moeckel G, Lee SD, Kwon HM. Urea promotes TonEBP expression and cellular adaptation in extreme hypertonicity. *Pflugers Arch* 2009.
117. Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandro S. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**:19115-19124.
118. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; **83**:346-356.

119. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
120. Morales MP, Galvez A, Eltit JM, Ocaranza P, Diaz-Araya G, Lavandero S. IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **270**:1029-1035.
121. Hetz C, Bono MR, Barros LF, Lagos R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:2696-2701.
122. Villena J, Henriquez M, Torres V, Moraga F, Diaz-Elizondo J, Arredondo C, Chiong M, Olea-Azar C, Stutzin A, Lavandero S, Quest AF. Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**:1146-1160.
123. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, Roman M, Ramirez C, Copaja M, Diaz-Araya G, Castro P, Lavandero S. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension* 2006; **48**:572-578.
124. Dale JW, Greenaway PJ: Small-scale plasmid DNA purification; In "Walker JM, (ed): *Methods in Molecular Biology*". Clifton NJ., The Humana Press Inc., 1984, vol 2, pp 191-196.
125. Hajjar RJ, Schmidt U, Matsui T, Guerrero JL, Lee KH, Gwathmey JK, Dec GW, Semigran MJ, Rosenzweig A. Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:5251-5256.
126. Maldonado C, Eisner V, Galvez A, Ulloa JA, Criollo A, Ocaranza P, Eltit JM, Morales MP, Quiroga C, Campos X, Chiong M, Sapag-Hagar M, Lavandero S. Mecanismos moleculares en la apoptosis del cardiomiocito y sus proyecciones patológicas y terapéuticas. *Rev Chil Cardiol* 2001; **20**:351-364.
127. Duchon MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* 1999; **516**:1-17.
128. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Biol* 2007; **120**:838-848.

129. Ko BC, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SSÁM. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* 1997; **272**:16431-16437.
130. Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 1997; **71**:1842-1849.
131. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:2538-2542.
132. Drews-Elger K, Ortells MC, Rao A, Lopez-Rodriguez C, Aramburu J. The transcription factor NFAT5 is required for cyclin expression and cell cycle progression in cells exposed to hypertonic stress. *PLoS One* 2009; **4**:e5245.
133. Juretic N, Urzua U, Munroe DJ, Jaimovich E, Riveros N. Differential gene expression in skeletal muscle cells after membrane depolarization. *J Cell Physiol* 2007; **210**:819-830.
134. Matsumoto TK, Ellsmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM. An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002; **277**:33075-33080.
135. Apostol S, Ursu D, Lehmann-Horn F, Melzer W. Local calcium signals induced by hyper-osmotic stress in mammalian skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 2009.
136. Chawla S, Skepper JN, Hockaday AR, Huang CL. Calcium waves induced by hypertonic solutions in intact frog skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2001; **536**:351-359.
137. Pickering JD, White E, Duke AM, Steele DS. DHPR activation underlies SR Ca²⁺ release induced by osmotic stress in isolated rat skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 2009; **133**:511-524.
138. Koh YH, Che W, Higashiyama S, Takahashi M, Miyamoto Y, Suzuki K, Taniguchi N. Osmotic stress induces HB-EGF gene expression via Ca²⁺/Pyk2/JNK signal cascades in rat aortic smooth muscle cells. *J Biochem* 2001; **130**:351-358.
139. Marchenko SM, Sage SO. Hyperosmotic but not hyposmotic stress evokes a rise in cytosolic Ca²⁺ concentration in endothelium of intact rat aorta. *Exp Physiol* 2000; **85**:151-157.

140. Malek AM, Goss GG, Jiang L, Izumo S, Alper SL, Hsu CY. Mannitol at clinical concentrations activates multiple signaling pathways and induces apoptosis in endothelial cells. *Stroke* 1998; **29**:2631-2640.
141. Dascalu A, Matithyou A, Oron Y, Korenstein R. A hyperosmotic stimulus elevates intracellular calcium and inhibits proliferation of a human keratinocyte cell line. *J Invest Dermatol* 2000; **115**:714-718.
142. Kloskowska E, Bruton JD, Winblad B, Benedikz E. The APP670/671 mutation alters calcium signaling and response to hyperosmotic stress in rat primary hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 2008; **444**:275-279.
143. Pesesse X, Leyman A, Luyten T, Missiaen L, Erneux C. Hyperosmotic stress stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate formation independently of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate modulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **336**:157-162.
144. Xie H, Zhu PH. Effect of osmotic stress on spontaneous calcium sparks in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2006; **27**:877-887.
145. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**:11-21.
146. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**:517-529.
147. Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H. Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature* 2001; **410**:592-596.
148. Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 1992; **258**:292-295.
149. Dr°bak BrK, Watkins PAC. Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Letters* 2000; **481**:240-244.
150. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:1115-1122.
151. Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 1993; **262**:744-747.
152. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 2006; **86**:369-408.

153. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* 2008; **77**:334-343.
154. Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 2007; **20**:1-22.
155. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**:552-565.
156. Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM, Green DR. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 2007; **129**:983-997.
157. Criollo A, Galluzzi L, Chiara MM, Tasdemir E, Lavandro S, Kroemer G. Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis* 2007; **12**:3-18.
158. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; **305**:626-629.
159. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 2005; **26**:380-392.
160. Castro J, Ruminot I, Porras OH, Flores CM, Hermosilla T, Verdugo E, Venegas F, Hartel S, Michea L, Barros LF. ATP steal between cation pumps: a mechanism linking Na⁺ influx to the onset of necrotic Ca²⁺ overload. *Cell Death Differ* 2006; **13**:1675-1685.
161. Buja LM, Entman ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* 1998; **98**:1355-1357.
162. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005; **14**:170-175.
163. Reimer KA, Ideker RE. Myocardial ischemia and infarction: anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias. *Hum Pathol* 1987; **18**:462-475.
164. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 1997; **33**:243-257.

165. Vanoverschelde JL, Janier MF, Bergmann SR. The relative importance of myocardial energy metabolism compared with ischemic contracture in the determination of ischemic injury in isolated perfused rabbit hearts. *Circ Res* 1994; **74**:817-828.
166. Vanoverschelde JL, Janier MF, Bakke JE, Marshall DR, Bergmann SR. Rate of glycolysis during ischemia determines extent of ischemic injury and functional recovery after reperfusion. *Am J Physiol* 1994; **267**:H1785-H1794.
167. Buja LM, Hagler HK, Willerson JT. Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium* 1988; **9**:205-217.
168. Thandroyen FT, Bellotto D, Katayama A, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM. Subcellular electrolyte alterations during progressive hypoxia and following reoxygenation in isolated neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1992; **71**:106-119.
169. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009; **81**:457-464.
170. Nishinaka T, Yabe-Nishimura C. EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**:205-216.
171. Srivastava S, Dixit BL, Cai J, Sharma S, Hurst HE, Bhatnagar A, Srivastava SK. Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal (HNE) in rat erythrocytes: role of aldose reductase. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**:642-651.
172. Moriyama T, Garcia-Perez A, Burg MB. Osmotic regulation of aldose reductase protein synthesis in renal medullary cells. *J Biol Chem* 1989; **264**:16810-16814.
173. Bagnasco SM, Murphy HR, Bedford JJ, Burg MB. Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. *Am J Physiol* 1988; **254**:C788-C792.
174. Nishinaka T, Yabe-Nishimura C. Transcription factor Nrf2 regulates promoter activity of mouse aldose reductase (AKR1B3) gene. *J Pharmacol Sci* 2005; **97**:43-51.
175. Jiang T, Qu JJ, Nishinaka T, Zhang N. Transcription factor AP-1 regulates TGF- β_1 -induced expression of aldose reductase in cultured human mesangial cells. *Nephrology* 2008; **13**:212-217.

176. Lee YS, Paek KS, Kang ES, Jang HS, Kim HJ, Kang YJ, Kim JH, Lee HT, Lee JH, Chang KC, Nishinaka T, Seo HG. Involvement of nuclear factor kappaB in up-regulation of aldose reductase gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**:2297-2309.
177. Khayat ZA, Tong P, Yaworsky K, Bloch RJ, Klip A. Insulin-induced actin filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes. *J Cell Sci* 2000; **113**:279-290.
178. Patel N, Rudich A, Khayat ZA, Garg R, Klip A. Intracellular segregation of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate by insulin-dependent actin remodeling in L6 skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol* 2003; **23**:4611-4626.
179. Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, Klip A. Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J Clin Invest* 2001; **108**:371-381.
180. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Diabetes Metab* 2003; **29**:566-575.
181. Gual P, Gonzalez T, Gremeaux T, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Osmotic regulation of cellular glucose uptake. *Methods Enzymol* 2007; **428**:343-354.
182. Thirone ACP, Speight P, Zulys M, Rotstein OD, Szaszi K, Pedersen SF, Kapus A. Hyperosmotic stress induces Rho/Rho kinase/LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation in tubular cells: key role in the osmotically triggered F-actin response. *Am J Physiol* 2009; **296**:C463-C475.
183. Chowdhury S, Smith KW, Gustin MC. Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* 1992; **118**:561-571.
184. Aizawa H, Katadae M, Maruya M, Sameshima M, Murakami-Murofushi K, Yahara I. Hyperosmotic stress-induced reorganization of actin bundles in *Dictyostelium* cells over-expressing cofilin. *Genes Cells* 1999; **4**:311-324.
185. Zischka H, Oehme F, Pintsch T, Ott A, Keller H, Kellermann J, Schuster SC. Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in *Dictyostelium*. *EMBO J* 1999; **18**:4241-4249.
186. Di Ciano-Oliveira C, Thirone AC, Szaszi K, Kapus A. Osmotic stress and the cytoskeleton: the R(h)ole of Rho GTPases. *Acta Physiol* 2006; **187**:257-272.

187. Ishikura S, Koshkina A, Klip A. Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. *Acta Physiol* 2008; **192**:61-74.
188. Cohen MP. Aldose reductase, glomerular metabolism, and diabetic nephropathy. *Metabolism* 1986; **35**:55-59.
189. Gabbay KH. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med* 1973; **288**:831-836.
190. Kador PF, Kinoshita JH. Role of aldose reductase in the development of diabetes-associated complications. *Am J Med* 1985; **79**:8-12.
191. Hamaoka R, Fujii J, Miyagawa J, Takahashi M, Kishimoto M, Moriwaki M, Yamamoto K, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Overexpression of the aldose reductase gene induces apoptosis in pancreatic β -cells by causing a redox imbalance. *J Biochem* 1999; **126**:41-47.
192. Murata M, Ohta N, Sakurai S, Alam S, Tsai J, Kador PF, Sato S. The role of aldose reductase in sugar cataract formation: aldose reductase plays a key role in lens epithelial cell death (apoptosis). *Chem Biol Interact* 2001; **130-132**:617-625.
193. Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, Nakashima E, Kato K, Kasuya Y, Yasuda Y, Kamiya H, Hotta N. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; **60**:1-9.
194. Ko BCB, Turck CW, Lee K WY, Yang Y, Chung SSM. Purification, identification, and characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **270**:52-61.
195. Colla E, Lee SD, Sheen MR, Woo SK, Kwon HM. TonEBP is inhibited by RNA helicase A via interaction involving the E'F loop. *Biochem J* 2005.
196. Chen Y, Schnetz MP, Irrazabal CE, Shen RF, Williams CK, Burg MB, Ferraris JD. Proteomic identification of proteins associated with the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP: functional effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol* 2007; **292**:F981-F992.
197. Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 2005; **52**:5-14.
198. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 1985; **101**:4-15.

199. D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 2001; **114**:3771-3778.
200. Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:12230-12234.
201. Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Hypertonic saline enhances cellular immune function. *Circ Shock* 1994; **42**:190-196.
202. Lang KS, Fillon S, Schneider D, Rammensee HG, Lang F. Stimulation of TNF α expression by hyperosmotic stress. *Pflugers Arch* 2002; **443**:798-803.
203. Esensten JH, Tsytsykova AV, Lopez-Rodriguez C, Ligeiro FA, Rao A, Goldfeld AE. NFAT5 binds to the TNF promoter distinctly from NFATp, c, 3 and 4, and activates TNF transcription during hypertonic stress alone. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**:3845-3854.
204. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 2005; **15**:24-27.
205. Rothe J, Gehr G, Loetscher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors-structure and function. *Immunol Res* 1992; **11**:81-90.
206. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993; **9**:317-343.
207. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72**:3666-3670.
208. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; **13**:151-153.
209. Liu ZG, Han J. Cellular responses to tumor necrosis factor. *Curr Issues Mol Biol* 2001; **3**:79-90.
210. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; **76**:959-962.
211. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009; **23**:1625-1637.
212. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003; **88**:212-218.
213. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004; **16**:139-144.
214. Lin Y, Choksi S, Shen HM, Yang QF, Hur GM, Kim YS, Tran JH, Nedospasov SA, Liu ZG. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-

- interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 2004; **279**:10822-10828.
215. Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, Karin M, Zhang J, Liu ZG. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2004; **24**:5914-5922.
216. Go WY, Liu X, Roti MA, Liu F, Ho SN. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:10673-10678.
217. Ho SN. Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response. *J Cell Physiol* 2006; **206**:9-15.
218. Strange K, Emma F, Paredes A, Morrison R. Osmoregulatory changes in myo-inositol content and Na⁺/myo-inositol cotransport in rat cortical astrocytes. *Glia* 1994; **12**:35-43.
219. Gullans SR, Verbalis JG. Control of brain volume during hyperosmolar and hypoosmolar conditions. *Annu Rev Med* 1993; **44**:289-301.
220. Law RO. Regulation of mammalian brain cell volume. *J Exp Zool* 1994; **268**:90-96.
221. McManus ML, Churchwell KB, Strange K. Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med* 1995; **333**:1260-1266.
222. Heilig CW, Stromski ME, Blumenfeld JD, Lee JP, Gullans SR. Characterization of the major brain osmolytes that accumulate in salt-loaded rats. *Am J Physiol* 1989; **257**:F1108-F1116.
223. Lien YH, Shapiro JI, Chan L. Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. *J Clin Invest* 1990; **85**:1427-1435.
224. Verbalis JG, Gullans SR. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res* 1991; **567**:274-282.
225. Ibsen L, Strange K. In situ localization and osmotic regulation of the Na⁺-myo-inositol cotransporter in rat brain. *Am J Physiol* 1996; **271**:F877-F885.
226. Minami Y, Shimada S, Inoue K, Morimura H, Miyai A, Yamauchi A, Matsunaga T, Tohyama M. Expression of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in the inner ear of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **35**:319-324.
227. Bitoun M, Tappaz M. Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in brain of rats with acute or chronic hyperosmotic plasma. A comparative study with gene expression of myo-inositol transporter, betaine

- transporter and sorbitol biosynthetic enzyme. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **77**:10-18.
228. Maallem S, Mutin M, Kwon HM, Tappaz ML. Differential cellular distribution of tonicity-induced expression of transcription factor TonEBP in the rat brain following prolonged systemic hypertonicity. *Neuroscience* 2006; **137**:51-71.
229. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quaini F. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2000; **45**:68-75.
230. McDermott PJ, Morgan HE. Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture. *Circ Res* 1989; **64**:542-553.
231. Buja LM, Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol* 2008; **17**:349-374.
232. Katsube K, Sakamoto K, Tamamura Y, Yamaguchi A. Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development. *Dev Growth Differ* 2009; **51**:55-67.
233. Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 2004; **172**:4661-4665.
234. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 1990; **2**:3-12.
235. Franchi-Gazzola R, Visigalli R, Dall'Asta V, Sala R, Woo SK, Kwon HM, Gazzola GC, Bussolati O. Amino acid depletion activates TonEBP and sodium-coupled inositol transport. *Am J Physiol* 2001; **280**:C1465-C1474.
236. Rodgaard T, Schou K, Friis MB, Hoffmann EK. Does the intracellular ionic concentration or the cell water content (cell volume) determine the activity of TonEBP in NIH3T3 cells. *Am J Physiol* 2008; 00081.
237. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; **85**:1093-1129.
238. Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 1994; **19**:59-113.
239. Gibbs CL. Cardiac energetics. *Physiol Rev* 1978; **58**:174-254.
240. Suga H. Ventricular energetics. *Physiol Rev* 1990; **70**:247-277.
241. Neely JR, Denton RM, England PJ, Randle PJ. The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. *Biochem J* 1972; **128**:147-159.

242. Williamson JR, Ford C, Illingworth J, Safer B. Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. *Circ Res* 1976; **38**:I39-I51.
243. Balaban RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; **34**:1259-1271.
244. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* 2006; **571**:253-273.
245. Gard JK, Kichura GM, Ackerman JJ, Eisenberg JD, Billadello JJ, Sobel BE, Gross RW. Quantitative ^{31}P nuclear magnetic resonance analysis of metabolite concentrations in Langendorff-perfused rabbit hearts. *Biophys J* 1985; **48**:803-813.
246. Vendelin M, Kongas O, Saks V. Regulation of mitochondrial respiration in heart cells analyzed by reaction-diffusion model of energy transfer. *Am J Physiol* 2000; **278**:C747-C764.