

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**LABORATORIO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MOLECULARES**



**REGULACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL  
TonEBP POR ESTRÉS OSMOTICO Y OXIDATIVO  
EN CARDIOMIOCITOS DE RATA**

**Directores de Tesis**

Dr. Sergio Lavandero G.  
BQ. Paola Navarro C.  
QF. Francisco Moraga G.  
Centro FONDAP CEMC  
Facultad Ciencias Químicas  
y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Profesor Patrocinante**

Dr. Sergio Lavandero G.  
Centro FONDAP CEMC  
Facultad Ciencias Químicas  
y Farmaceútics  
Universidad de Chile

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

**KAREN DENISSE VOLKWEIN OLIVARES**

2005

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1. Regulación del volumen celular.....	9
1.2. Estrés osmótico.....	11
1.3. Estrés oxidativo.....	12
1.4. Factor transcripcional TonEBP/NFAT5.....	13
1.5. Aldosa reductasa.....	15
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>17</b>
3.1. Objetivos específicos.....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1. Materiales.....	18
4.2. Material biológico.....	18
4.3. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas.....	18
4.4. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas adultas.....	19
4.5. Inducción de estrés hiperosmótico.....	20
4.6. Inducción de estrés hiposmótico.....	20
4.7. Inducción de estrés oxidativo.....	20
4.8. Determinación de la actividad de aldosa reductasa... ..	21
4.9. Determinación de la distribución subcelular de TonEBP.....	21
4.10. Evaluación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán.....	24

4.11.	Determinación de los niveles de proteínas TonEBP y aldosa reductasa.....	24
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
5.1.	Efecto del estrés osmótico sobre la distribución subcelular y niveles de proteína de TonEBP en cultivos primarios de cardiomiocitos.....	26
5.2.	Regulación de TonEBP en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos.....	31
5.2.1.	Por calcio.....	31
5.2.2.	Por estrés oxidativo.....	34
5.3.	Efecto del estrés osmótico sobre la aldosa reductasa en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos.....	38
5.4.	Efecto del estrés oxidativo sobre la aldosa reductasa en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos.....	42
5.5.	Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP en cultivos primarios de cardiomiocitos adultos.....	44
5.6.	Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de aldosa reductasa en cultivos primarios de cardiomiocitos adultos.....	47
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
6.1.	Regulación de TonEBP por estrés osmótico en cardiomiocitos neonatos.....	49
6.2.	Regulación de aldosa reductasa por estrés osmótico en cardiomiocitos neonatos.....	51
6.3.	Regulación de TonEBP por estrés oxidativo en cardiomiocitos neonatos.....	51
6.4.	Papel del calcio en la distribución subcelular de TonEBP en cardiomiocitos neonatos.....	53
6.5.	Regulación de TonEBP por estrés hiperosmótico en cardiomiocitos adultos....	53
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Mecanismos iónicos para generación de RVD y RVI bajo condiciones fisiológicas.....	<b>10</b>
<b>Figura 2:</b> Comparación esquemática de las secuencias primarias de TonEBP y la familia NFAT.....	<b>15</b>
<b>Figura 3:</b> Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP.....	<b>27</b>
<b>Figura 4:</b> Efecto del estrés hiposmótico en la distribución subcelular de TonEBP.....	<b>28</b>
<b>Figura 5:</b> Determinación de los niveles de proteína de TonEBP.....	<b>29</b>
<b>Figura 6:</b> Efecto del calcio en la distribución subcelular de TonEBP.....	<b>32</b>
<b>Figura 7:</b> Efecto del estrés oxidativo en la viabilidad del cardiomiocito.....	<b>35</b>
<b>Figura 8:</b> Efecto del estrés oxidativo en la distribución subcelular de TonEBP.....	<b>36</b>
<b>Figura 9:</b> Efecto del estrés oxidativo en la cantidad de TonEBP en cardiomiocitos de ratas neonatas.....	<b>37</b>
<b>Figura 10:</b> Efecto del estrés osmótico en la cantidad de proteína de AR en cardiomiocitos de ratas neonatas.....	<b>39</b>
<b>Figura 11:</b> Determinación de la actividad de AR.....	<b>41</b>
<b>Figura 12:</b> Efecto del estrés oxidativo en la cantidad de AR en cardiomiocitos de ratas neonatas.....	<b>43</b>
<b>Figura 13:</b> Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP en cardiomiocitos de ratas adultas.....	<b>45</b>
<b>Figura 14:</b> Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de AR en cardiomiocitos de ratas adultas.....	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

AP-1	: Proteína Activadora 1
AR	: Aldosa Reductasa
BAPTA-AM	: BAPTA-acetometil éster
BDM	: Butanodiona
BGT1	: Transportador de betaína
BSA	: Albúmina de suero de bovino
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoxiuridina
°C	: Grado Celsius
Ca <sup>2+</sup>	: Calcio
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	: Calcio intracelular
cAMP	: Adenosina monofosfato cíclico
DB	: Dominio de unión al DNA
DME	: Medio Eagle's modificado Dulbecco
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DNA	: Acido desoxirribonucleico
EDTA	: Ácido etilen diaminotetraacético
EGTA	: Ácido etilén glicol-bis( $\gamma$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
ERK	: Proteína quinasa regulada extracelularmente
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero fetal de ternero
FITC	: Iso-tiocianato de fluoresceína
FT	: Factor transcripcional
g	: Gravedad
Glc	: Glicina
Gln	: Glutamina
GSH	: Glutati3n reducido
h	: Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Per3xido de Hidr3geno
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulf3nico
HSF-1	: Factor de shock t3rmico 1
HSP	: Prote3nas de shock t3rmico
KCl	: Cloruro de potasio
KDa	: Kilo dalton
LiSO <sub>4</sub>	: Sulfato de litio
MAPK	: Prote3na quinasa activada por mit3genos
min	: Minuto
mg	: Miligramo
$\mu$ g	: Microgramo
mL	: Mililitro
$\mu$ L	: Microlitro
mM	: Milimolar
$\mu$ mol	: Micromol
mm	: Mil3metro

mOsm	: Miliosmolar
NAC	: N-acetil cisteína
NaCl	: Cloruro de sodio
NADPH	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NFAT	: Factores nucleares de células T activadas
NFD	: Nifedipino
NHR	: Región de homología NFAT
NF- $\kappa$ B	: Factor nuclear Kappa B
NOS	: Oxido nítrico sintasa
nM	: nanomolar
nm	: nanómetro
NP-40	: Nodidet P-40
ORE	: Elemento de respuesta osmótica
P	: Fosfato
PBS	: Tampón fosfato salino
PI	: Yoduro de propidio
PIPES	: Ácido 1,4-piperazinedietanosulfónico
PMSF	: Fenilmetilsulfonifluoruro
PKA	: Proteína quinasa A
PKB	: Proteína quinasa B
rpm	: Revoluciones por minuto
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
RVD	: Disminución regulado del volumen
RVI	: Aumento regulado del volumen
s	: Segundos
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SEM	: Error estándar de la media
SOR	: Sorbitol
TAD	: Dominio de transactivación
TauT	: Transportador de taurina
TBE	: Tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	: Tampón Tris salino
TTBS	: Tween-TBS
TCA	: Acido tricloro acético
TE	: Tampón Tris-EDTA
TES	: Tampón Tris-EDTA-NaCl
TFIIB	: Factor de transcripción de tipo II B
Thr	: Treonina
TonE	: Tonicity responsive enhancer
TonEBP	: Tonicity responsive enhancer binding protein
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
V	: Volt
vs	: Versus
WB	: Western blot

## RESUMEN

TonEBP es el factor transcripcional de eucariontes responsable de regular la transcripción de genes involucrados en la respuesta al estrés osmótico. Las proteínas codificadas por estos genes permiten la acumulación de osmolitos orgánicos compatibles, tales como sorbitol. Este se genera a partir de glucosa por la acción de aldosa reductasa (AR). Se desconoce si TonEBP está presente en el cardiomiocito neonato como en el adulto y si se regula por cambios en la osmolaridad externa como también por estrés oxidativo. Los resultados inmunocitoquímicos y de Western blot mostraron que basalmente TonEBP y AR están en el citosol y núcleo de manera homogénea en cardiomiocito de rata neonata, sin embargo en cardiomiocitos adultos TonEBP y AR basalmente se encuentran sólo en la periferia celular. Cultivos primarios de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico (Sorbitol 600 mOSm) por 8, 16 y 24 h, mostraron un aumento de TonEBP y de su translocación al núcleo. Los niveles de AR y su actividad también aumentaron significativamente a las 8, 16 y 24 h post-estímulo. En cambio, los cultivos expuestos a estrés hiposmótico (30% de dilución del medio de cultivo, 202 mOsm), la cantidad de proteína de TonEBP y AR disminuyeron respecto al control y no se detectó actividad de AR. Dado que nuestro laboratorio previamente demostró que el estrés hiperosmótico inducido por sorbitol genera ROS y aumenta los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , también se estudió sus efectos en la regulación de TonEBP. Los resultados mostraron que la translocación de TonEBP al núcleo es independiente del calcio y que las ROS son necesarias pero no suficiente para su completa activación. Bajo estas últimas condiciones, TonEBP migró al núcleo pero no se activó dado que no aumentaron sus niveles de proteína ni los de su gen blanco AR.

En su conjunto, estos resultados sugieren que TonEBP está presente en el cardiomiocito y tanto este factor transcripcional como AR modifican sus niveles y actividad en respuesta a cambios en la osmolaridad externa en forma independiente del calcio. El estrés oxidativo estimuló su translocación al núcleo pero no su activación.

## SUMMARY

The transcription factor TonEBP has been implicated in regulation of gene transcription involved in the response to osmotic stress. These genes allow the accumulation of intracellular organic osmolytes and protect to the cell against hypertonicity, normalizing both cell volume and inorganic ion concentration. Sorbitol, one of these compatible organic osmolytes, is generated from glucose by action of Aldose Reductase (AR).

It remains unknown whether TonEBP is present in the neonate and adult cardiac myocytes and if it is regulated by changes in the external osmolality and also by oxidative stress. Both immunofluorescence and Western blot results showed that in basal conditions, TonEBP and AR were localized in the cytosol and nucleus in equal amount of cultured neonatal cardiac myocytes. But in adult rats in basal conditions, TonEBP and AR were localized only in the external membrane cellular. When these cells were exposed to hyperosmotic stress (Sorbitol 600 mOSm) by 8, 16 and 24 h, TonEBP levels increased and it is translocated to the nucleus. Levels of AR and their activity also increased significantly after 8, 16 and 24 h post-stimulus. However, cells exposed to hyposmotic stress (30% dilution in culture medium, 202 mOsm), the amounts of TonEBP and AR decreased respect to controls and AR activity was not detected.

On the other hand, our laboratory has previously shown that hyperosmotic stress induced by Sorbitol generates ROS and induces increase in intracellular calcium levels. We tested whether these variables regulates TonEBP. The results showed that nuclear translocation of TonEBP was independent of calcium but ROS were necessary but not sufficient for a complete TonEBP activation. Under these conditions, TonEBP is translocated to the nucleus but that was not induced and neither increased AR levels. Collectively, these results suggest TonEBP is present in cultured cardiac myocytes and response to changes in the external osmolality independent of calcium. Nevertheless oxidative stress was not sufficient for a complete activation of TonEBP.



## 1. Introducción

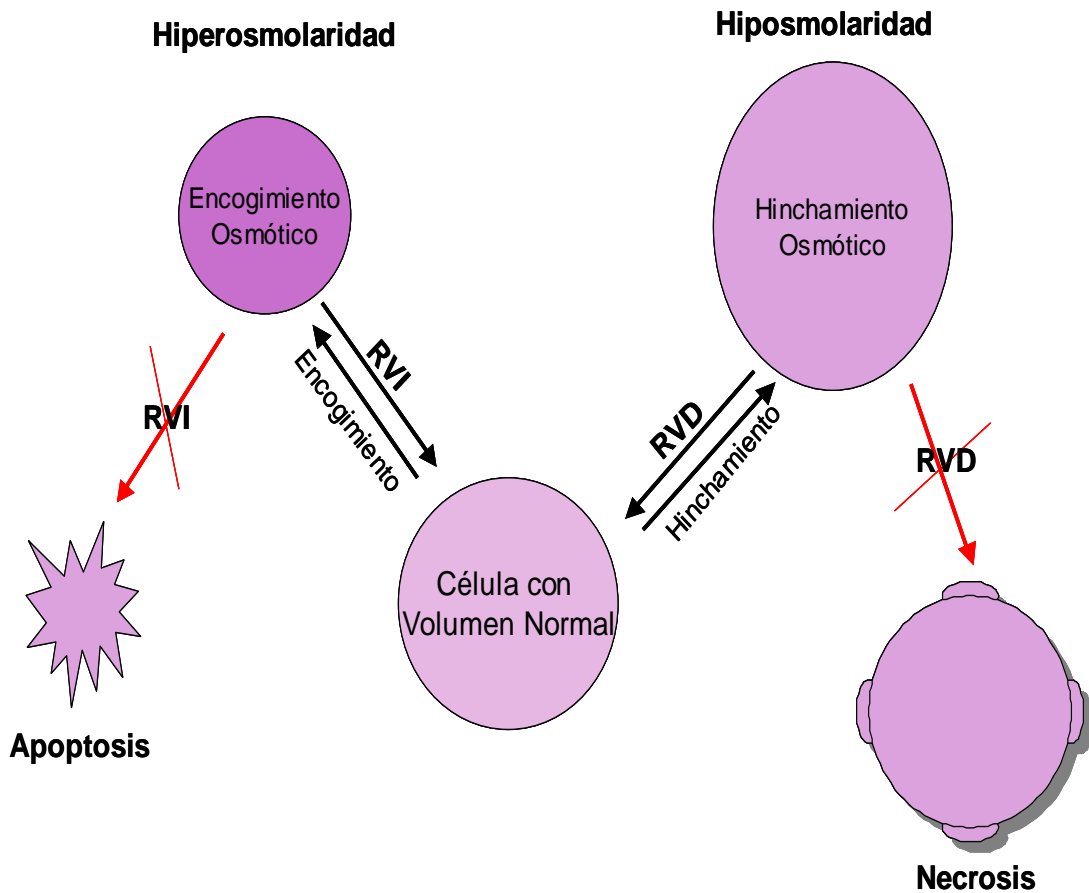
El corazón es el órgano encargado de mantener un flujo sanguíneo acorde a las necesidades de las diferentes partes del cuerpo. Este tejido está compuesto por diversos tipos celulares, siendo los más importantes los cardiomiocitos y fibroblastos (35). Los cardiomiocitos constituyen la unidad funcional de este tejido, ya que son responsables del proceso de contracción, mientras que los fibroblastos, son las más abundantes y responsables de mantener la arquitectura cardiaca. Los cardiomiocitos son células altamente diferenciadas que dejan de dividirse después del nacimiento, permaneciendo por el resto de su existencia con su ciclo celular detenido (5). A consecuencia de lo anterior, cualquier efecto nocivo, como el producido en el infarto al miocardio u otros procesos de isquemia-reperfusión que disminuyan su número tendrán consecuencias directas en las propiedades contráctiles del corazón.

La apoptosis, o muerte celular programada, juega un papel central en la progresión de estas patologías a insuficiencia cardiaca (20) y en la muerte de las células cardíacas. Una de las distintas causas de la apoptosis en el cardiomiocito es su exposición al estrés hiperosmótico (28).

### 1.1. Regulación del volumen celular

En todos los tipos celulares, la mantención del volumen celular es una función homeostática esencial (30). Así, las células en condiciones isotónicas regulan transitoriamente su volumen a través del flujo de agua, dependiente de la entrada de NaCl y salida de KCl. Cuando aumenta la osmolaridad del medio, se produce un encogimiento celular, entrada de NaCl y se activa el mecanismo de aumento regulado de volumen ("Regulatory Volume Increase", RVI), donde participan los transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y los co-transportadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+2\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . En cambio, cuando ocurre hinchamiento celular debido a una disminución de la osmolaridad del medio, se activa el mecanismo disminución regulada de volumen ("Regulatory Volume Decrease", RVD), el cual es mediado por la salida de

KCl dependiente de la activación de los canales de  $K^+$  y  $Cl^-$ , del co-transportador  $K^+/Cl^-$  y de los anti-transportadores  $K^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$  (30). Sin embargo, cuando las células son expuestas a estrés osmótico en forma más permanente se activan también otros mecanismos de adaptación, entre los que se encuentran cambios en la expresión de genes específicos. Cuando estos mecanismos de regulación del volumen celular son sobrepasados, las células mueren por apoptosis y/o necrosis (19) (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismos iónicos para generación de RVD y RVI bajo condiciones fisiológicas.** La condición homeostática se muestra al centro de la figura. Dos mecanismos diferentes para RVI y RVD se muestran en esta figura, respectivamente. La muerte por apoptosis y necrosis se podría gatillar por un encogimiento o hinchamiento celular persistente como se describe a la izquierda y derecha de las células respectivamente (30).

## 1.2. Estrés osmótico

El estrés osmótico es una alteración crítica de la fuerza iónica del medio extracelular que puede ser hiperosmótico o hiposmótico. Las células eucariontes responden frente al estrés hiperosmótico regulando tres conjuntos funcionalmente distintos de proteínas. El primer grupo está formado por chaperonas moleculares y proteínas de “shock” térmico (HSP), que una vez activadas contrarrestan la desestabilización y desplegamiento de proteínas causado por la hiperosmolaridad (2,33). El segundo grupo, corresponde a transportadores de membrana que regulan los niveles de osmolitos compatibles, estas proteínas se activan o desactivan bajo condiciones de hiper e hiposmolaridad, respectivamente (40). Por último, el tercer grupo corresponde a ciertos factores transcripcionales y proteínas osmorreguladoras que mantienen la homeostasis de los fluidos extracelulares (22).

El estrés hiperosmótico disminuye el volumen celular y genera en las células distintas respuestas compensatorias, como el reemplazo gradual de electrolitos por osmolitos compatibles tales como sorbitol, betaína, mio-inositol y taurina, que evitan los efectos nocivos del aumento de la fuerza iónica intracelular, manteniendo de esta manera la homeostasis celular (1,40). Dicha acumulación de osmolitos ocurre por aumentos en las expresiones de los genes para aldosa reductasa (AR), enzima clave en la síntesis del sorbitol intracelular, y de aquellos que codifican para transportadores específicos de betaína y mio-inositol, betaína/ácido  $\gamma$ -aminobutírico (BGT-1) y mio-inositol dependiente de  $\text{Na}^+$  (SMIT) (40). La inducción hipertónica de estos genes se controla a nivel transcripcional, participando en algunos casos TonEBP, único factor transcripcional de eucariontes conocido hasta ahora, que se activa por hiperosmolaridad (21). Cuando las células no pueden compensar su volumen después de un mantenido estrés hiperosmótico mueren por apoptosis (19).

Por otra parte, las células expuestas a estrés hiposmótico responden rápidamente a esta condición con hinchamiento celular debido a la entrada osmótica de agua, seguido de la activación del mecanismo de RVD, debido a la salida de iones inorgánicos celulares y de osmolitos orgánicos, tales como aminoácidos libres,

polioles y metilaminas. En estas condiciones se ha descrito la activación de las vías ERKs y p38-MAPK y el factor transcripcional HSF-1 (19). También se ha indicado que la hiposmolaridad reduce la expresión de genes involucrados con la acumulación de osmolitos orgánicos y del factor transcripcional TonEBP, pero se ha visto que los niveles de mRNA de HSP-70 aumentan producto de la hiposmolaridad (41). Recientemente se ha postulado que fibroblastos humanos expuestos a estrés hiposmótico por 4 h mueren por apoptosis (19).

### **1.3. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo, otro tipo de estrés celular, está asociado con la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales participan como segundos mensajeros en las células, regulando las vías de transducción de señales que finalmente controlan la expresión génica y las modificaciones post-transcripcionales de proteínas (23). Los ROS incluyen a superóxidos, radicales hidroxilos y peróxido de hidrógeno y sus metabolitos. En la mayoría de los casos, los primeros ROS que se producen son los superóxidos. Los radicales libres son producidos por el normal metabolismo de la mitocondria, por la cadena transportadora de electrones, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa y NADPH oxidasa, esta última es un complejo enzimático asociado a membrana, que podría estar relacionado con los cambios de volumen celular inducidos por estrés osmótico en cardiomiocitos (39,42).

Se ha postulado que el anión superóxido y peróxido de hidrógeno regulan la actividad de factores transcripcionales, incluyendo AP-1 y NF- $\kappa$ B. En este contexto, se ha informado que el estrés hiperosmótico con NaCl induce un aumento de ROS, evidenciado por la medición de anión superóxido. A su vez, se demostró que ROS es una condición necesaria pero no suficiente para la completa activación de TonEBP inducida por hiperosmolaridad (42).

#### 1.4. Factor transcripcional TonEBP/NFAT 5

TonEBP es el más reciente integrante de la familia Rel/NF- $\kappa$ B/NFAT de factores transcripcionales basados en su similitud estructural y de secuencia de unión al DNA (15,38). TonEBP también es conocido como factor nuclear de células T activadas (NFAT 5), el cual difiere de los otros NFATs en su estructura, unión al DNA y regulación (26). El dominio de unión al DNA de TonEBP tiene un 45% de identidad con el dominio de unión al DNA de los NFATs, pero no posee la región de interacción con el factor transcripcional AP-1 y, a diferencia de los otros NFATs, estimula la transcripción independiente de AP-1. TonEBP tampoco posee la secuencia de homología a proteínas NFAT (NHR), localizada en el extremo amino terminal al lado del dominio de unión al DNA. NHR es sitio de unión para la fosfatasa calcineurina, donde se desfosforila a NFAT cuando calcineurina se activa por calcio. La desfosforilación de NFAT permite su translocación al núcleo. Por lo tanto, la migración de TonEBP al núcleo es independiente de calcineurina, puesto que no posee el sitio de unión NHR (Figura 2) (14).

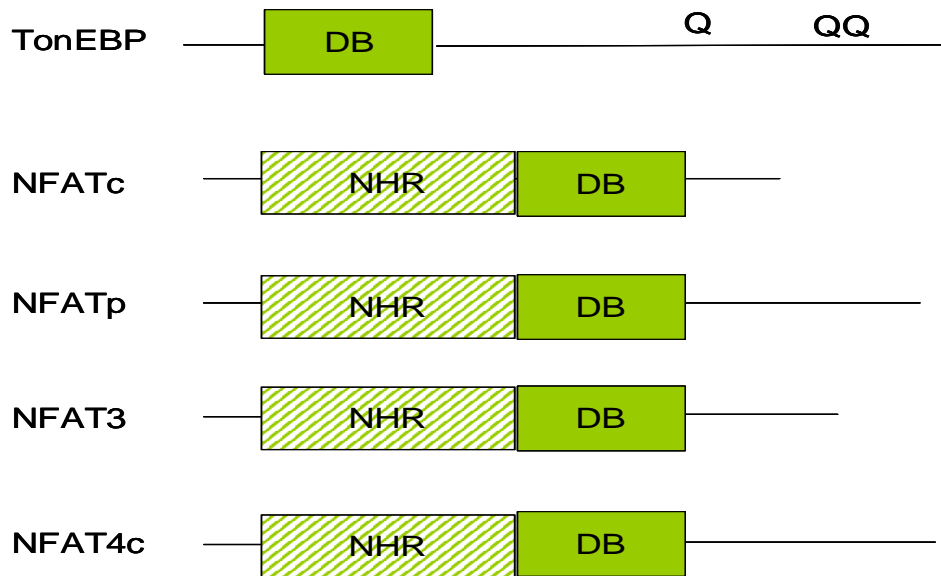
Los NFATs son monómeros en solución y frecuentemente se unen al DNA en cooperación con Fos y Jun, lo cual es otro aspecto que diferencia de TonEBP con los otros integrantes de la familia NFAT (4). TonEBP se encuentra como dímero y se une a sitios TonE asimétricos del DNA (24). En esta unión TonEBP rodea completamente su DNA blanco, aumentando la estabilidad del complejo TonEBP-DNA. (4,24).

TonEBP, es el único factor transcripcional de eucariontes conocido hasta ahora activado por hiperosmolaridad (7,21). Una vez activado, experimenta distintos cambios, fosforilándose primariamente en residuos de serina y tirosina. Se ha sugerido que esta fosforilación jugaría un rol en su translocación al núcleo (14). En células expuestas a isotonicidad, la distribución de TonEBP es aproximadamente similar en el citoplasma y núcleo. Esta distribución cambia luego de exponer las células a hiperosmolaridad por 1h, disminuyendo TonEBP en el citosol y aumentando en el núcleo. Después de 8 a 12h de exposición, TonEBP se

encuentra predominantemente en el núcleo. Una vez en el núcleo, TonEBP se une a un elemento regulador común de respuesta osmótica ORE (Osmotic Response Element) o TonE (Tonicity-responsive Enhancer) (21), donde media la transcripción de genes involucrados en la acumulación de osmolitos orgánicos compatibles, como el gen para AR y genes para transportadores específicos de betaína y mio-inositol, BGT-1, SMIT y TauT en respuesta de adaptación a la hiperosmolaridad (40).

Hay otras vías de regulación de TonEBP, donde se ha descrito que la hiperosmolaridad induce una rápida fosforilación de su dominio de transactivación (TAD) (8), translocación al núcleo y aumento de sus niveles de mRNA y proteína (3). La activación de TonEBP se bloquea por inhibidores de proteína tirosina kinasa y de proteína kinasa CK2 (21). Las vías transduccionales p38-MAPK y Fyn son las principales involucradas en la regulación de TonEBP por hiperosmolaridad, aunque también PKA juega un importante papel en la activación de TonEBP, en forma independiente de AMP cíclico (8). Por otra parte, se ha sugerido la existencia de un sensor que regularía la activación de TonEBP, al detectar la actividad iónica intracelular (14).

TonEBP también se expresa ampliamente durante el desarrollo temprano y en la etapa adulta se encuentra abundantemente en el corazón, cerebro, hígado y otros órganos (27), pero las evidencias indican que es más abundante en tejidos embrionarios que en tejidos adultos, sugiriendo que TonEBP tendría un importante papel en el desarrollo (14).



**Figura 2. Comparación esquemática de las secuencias primarias de TonEBP y la familia NFAT.** TonEBP y NFAT presentan el mismo sitio de unión al DNA (DB), pero TonEBP no posee la secuencia NHR (NFAT Homology Region) que es sitio de unión para calcineurina. Q corresponden a sitios ricos en glutamina.

### 1.5. Aldosa reductasa

Aldosa reductasa es una oxidoreductasa monomérica dependiente de NADPH que posee una sola subunidad de masa molecular 36 kDa (31). AR es la primera enzima de la vía de los polioles, la cual ayuda a promover resistencia a la célula a perturbaciones anisotónicas. AR cataliza la formación de sorbitol a partir de glucosa usando como cofactor NADPH. La acumulación de sorbitol se considera una respuesta adaptativa a la hiperosmolaridad observada en distintos tipos celulares. Aunque la inducción de AR se ha asociado con respuesta compensatoria al estrés hiperosmótico, también tiene un papel importante en el desarrollo de la diabetes y daño al miocardio por isquemia/reperfusión (11). Se ha sugerido una relación entre la AR y la apoptosis, puesto que la inducción de AR produce apoptosis en células pancreáticas, debido a un desbalance en el estado redox celular (13).

Nuestro Laboratorio también ha establecido que AR tiene un papel importante en la apoptosis del cardiomiocito puesto que se demostró que el estrés hiperosmótico inducido con sorbitol, y no así con manitol, activó la vía de los polioles y apoptosis (10,11). Esta apoptosis se atenuó por inhibición de la AR con zopolrestat y también con la reposición de GSH con N-acetilcisteína. Estos datos sugieren que el encogimiento hipertónico del cardiomiocito *per se* no es suficiente para inducir su muerte por apoptosis. La muerte celular inducida por estrés hiperosmótico requiere de la inducción de AR y disminución de los niveles de GSH, tales efectos dependen del osmolito que generó el estrés hiperosmótico (11).



## **2. Hipótesis**

“Los estrés osmótico y oxidativo regulan al factor transcripcional TonEBP en cardiomiocitos de rata”

## **3. Objetivo general**

Estudiar *in vitro* la regulación de TonEBP en condiciones de estrés hiperosmótico, hiposmótico y oxidativo en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

### **3.1. Objetivos específicos**

1. Determinar si TonEBP está presente en cardiomiocitos de rata neonata.
2. Estudiar la distribución subcelular de TonEBP frente al estrés osmótico y oxidativo en cardiomiocitos de rata neonata.
3. Investigar si el estrés osmótico y el oxidativo modulan las cantidades de proteína de TonEBP en cardiomiocitos de rata neonata.
4. Evaluar si el estrés osmótico y el oxidativo modulan las cantidades de proteína y actividad de AR en cardiomiocitos de rata neonata.
5. Determinar si TonEBP está presente en cardiomiocitos de rata adulta.
6. Estudiar la distribución subcelular de TonEBP y AR en cardiomiocitos de rata adulta.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Materiales**

Los medios de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DME), Hank's y M199, pancreatina, bromodeoxiuridina, azul de tripán, EDTA, EGTA, sorbitol, manitol, Nifedipino, NADPH, NAC y el anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -actina , además de otros reactivos bioquímicos se adquirieron a Sigma Chemical Co (St Louis, USA). Colagenasa y tripsina-EDTA y el estándar para masas moleculares de proteínas pre teñido se adquirieron a Invitrogen. Suero fetal bovino (FBS) y de ternero (FCS) se obtuvieron de Hyclone. BAPTA-acetometilester (BAPTA-AM), los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se adquirieron por Calbiochem (La Jolla, USA). Las placas de cultivo fueron de Falcon. La nitrocelulosa fue de BioRad. El anticuerpo policlonal anti-aldosa reductasa fue donado por el Dr. N. Taniguchi (Osaka University Medical School, Osaka, Japan). El anticuerpo anti-TonEBP fue donado por el Dr. H. Moo Kwon (Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA). El reactivo Western Lightning se adquirió en Perkin Elmer Life Sciences, Inc (Boston, MA). El medio de montaje para fluorescencia se obtuvo en DAKO Corporation (CA, USA).

### **4.2. Material biológico**

Se utilizaron ratas neonatas Sprage-Dawley (2-3 días de edad) y ratas machos de 250 g provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

### **4.3. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas**

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols en 1997 (9). Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos se cortaron en pequeños

pedazos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa. La población de cardiomiocitos se enriqueció por preplaqueo en frascos para cultivo de plástico por 2h a 37°C, lo cual permitió la remoción de los fibroblastos contaminantes. Finalmente los cardiomiocitos se resuspendieron en medio de mantención (DME-M199 4:1) que contenía bromodeoxiuridina (BrdU, 1 mM), FBS 5% y FCS 10%, penicilina y estreptomicina (100 U/mL). Las placas plásticas de Petri utilizadas se recubrieron previamente con una película de gelatina al 2%.

#### **4.4. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas adultas**

El abdomen y tórax del animal anestesiado profundamente se roció con etanol al 70%. Luego de la incisión abdominal para desprender la piel de la rata, se cortó la musculatura abdominal para iniciar la apertura torácica con un corte bilateral (en las costillas) y se reflejó la tapa del tórax hacia su cabeza. Con el corazón expuesto, se ubicó la aorta y se mantuvo obturada con una pinza, antes de comenzar a cortar el tejido y el resto de las venas y arterias próximas. El corazón se escindió y se lavó externamente con tampón Gerard/EGTA frío. Los tejidos anexos como restos de pulmón y timo se removieron y la aorta se canuló y ligó firmemente al sistema de perfusión con bomba peristáltica. Se procedió a la perfusión del corazón (4 ml/min) con tampón Gerard, suplementado con calcio (1 mM), ubicado en un baño termostático a 37°C. La perfusión con Gerard/calcio se extendió por 3 a 4 min. Luego se perfundió por 1 min con tampón Gerard/EGTA (2 mM) para quelar el calcio remanente del tejido. Luego se perfundió con solución de digestión por 30 min., suficiente para poder percibir un cambio en la forma anatómica normal del corazón (aspecto irregular en forma de gota). El corazón digerido se desmontó y se cortó longitudinalmente, se disgregó mecánicamente con ayuda de un par de pinzas romas bajo una campana de flujo laminar. El tejido digerido y disgregado se trasladó a un frasco de 50 ml que contenía 10 ml de solución de digestión y luego a un baño termostático a 37°C con agitación permanente por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 445xg por 30 seg. La

pella celular se resuspendió suavemente en tampón Gerard suplementado con 7 mM DBM (Butano 2,4 dionamonoxima, desacoplador del sistema de contracción celular). Esta suspensión celular se sembró en placas de cultivo pretratadas por 1h con laminina (1 mg/ml). Luego de 15 a 20 min de anclaje e inhibición del sistema contráctil, el sobrenadante se eliminó y cambió por M199/HEPES/Ca<sup>2+</sup> 2 mM, suplementado con BDM. Finalmente luego de 15 min, el medio se reemplazó por M199/HEPES/ 2 mM Ca<sup>2+</sup> sin BDM.

#### **4.5. Inducción de estrés hiperosmótico**

Para inducir estrés hiperosmótico, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/placa. Luego las células se privaron de suero por 24 h, para posteriormente incubarlas con Sorbitol (600 mOsm) disuelto en el medio de mantención por 4, 8 16 y 24 h, para posteriormente determinar los niveles y actividad de TonEBP y AR.

#### **4.6. Inducción de estrés hiposmótico**

Para inducir estrés hiposmótico, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/placa. Luego las células se privaron de suero por 24 h para posteriormente incubarlas en medio de mantención diluido con agua destilada en un 30%, para generar las condiciones de hiposmolaridad. Finalmente se obtuvieron los extractos proteicos para determinar niveles de TonEBP y AR.

#### **4.7. Inducción de estrés oxidativo**

Para inducir estrés oxidativo, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/placa. Luego las células se privaron de suero por 24 h, para posteriormente incubarlas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [75μM] y determinar niveles de TonEBP y AR.

#### **4.8. Determinación de la actividad de aldosa reductasa**

Para determinar la actividad de AR, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/placa. Una vez estimuladas las células se lavaron 3 veces con PBS frío 1X y se lisaron con 200  $\mu$ l de tampón de lisis (10 mM fosfato de potasio, pH 7,0 conteniendo 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Los extractos celulares se centrifugaron a 10000xg por 1h a 4°C y el sobrenadante se dializó en 2 L de buffer de lisis por toda la noche. Al día siguiente, las muestras dializadas se incubaron con 1 ml DEAE-celulosa (Sigma), pre-equilibrada con tampón de lisis durante 2 h. Una vez transcurrido este tiempo, la columna se trató con golpes de fuerza iónica de NaCl (0, 25, 50 mM) por 1 h. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 37°C, con una mezcla de reacción que contenía  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  [400 mM],  $\beta$ -mercaptoetanol [5 mM], Glc [5 mM] y fosfato de potasio [50 mM], pH 6,0. La reacción se inició al agregar [0,1 mM] NADPH, determinándose su desaparición a 340 nm por 3 min. Finalmente, la concentración de proteínas se determinó por el micrométodo de Bradford, para expresar los resultados como actividad específica. Una unidad enzimática se definió como 1  $\mu$ mol de NADPH utilizado por min y por mL de enzima (Gálvez et al., 2003).

#### **4.9. Determinación de la distribución subcelular de TonEBP**

Para determinar la distribución subcelular de TonEBP se utilizaron dos aproximaciones experimentales: Western blot (WB) de fracciones citosólicas y nucleares e inmunofluorescencia para TonEBP. La determinación de los niveles de distribución subcelular se visualizó por WB e inmunocitoquímica para TonEBP en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, hiposmótico y oxidativo.

Para la preparación de fracciones citosólicas y nucleares. Los cardiomiocitos neonatos de rata ( $4 \times 10^6$  células/placa 60 mm) en cultivo se privaron de suero 24 h

antes del comienzo del ensayo y sometidos a los correspondientes estímulos. Las células se lavaron 3 veces con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM; pH 7,4) frío y luego se lisaron con 100 µL tampón de lisis A (HEPES 20 mM, pH 8; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM; DTT 1 mM; NaF 5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM; inhibidor de tripsina 50 µg/mL; leupeptina 1 µg/mL; aprotinina 0,1 µg/mL y PMSF 0,5 mM). Luego, los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf e incubaron en hielo por 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 11500xg por 1 min y se traspasaron los sobrenadantes correspondientes a los extractos citosólicos a tubos Eppendorf nuevos. La pella se lavó con 30 µL de tampón A y luego se centrifugó por 1 min a 11500xg. Se descartó el sobrenadante y la pella se resuspendió en 40 µL de tampón C (HEPES 20 mM, pH 8; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; NaCl 0,4 M; DTT 1 mM; NaF 5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM; leupeptina 1 µg/mL; aprotinina 0,1 µg/mL y PMSF 0,5 mM); luego la solución se sonicó por 1 min a temperatura ambiente y agitó por 30 min a 4°C para luego ser centrifugadas a 11500xg por 5 min. Los sobrenadantes correspondientes a los extractos nucleares se separaron y traspasaron a tubos Eppendorf nuevos. La concentración de proteínas se determinó en los extractos citosólicos y nucleares por Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x y almacenó a -20°C. Las proteínas obtenidas de las fracciones citosólicas y nucleares se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 8% en una cámara Miniprotean (BioRad) y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (BioRad), utilizando un sistema de transferencia húmedo a 0.45 A por 90 min. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron 2 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo de leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 (0,5% v/v) (TBS-T). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario policlonal anti-TonEBP (dil 1:5.000) diluido en el mismo tampón de bloqueo. Luego, se lavaron las membranas e incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (dil 1:5.000) en la solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectaron las distintas proteínas por quimioluminiscencia, utilizando películas

BioMax MR1 (Kodak). A fin de normalizar las variaciones en las cantidades de proteínas en cada fracción, las membranas se trataron con una solución de “stripping” por 1 h. Luego de lavar las membranas, éstas se bloquearon con leche descremada al 3% en TBS-T. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los distintos anticuerpos primarios para las proteínas controles: anticuerpo policlonal anti-TFIIB (dil 1:1.000) y anticuerpo monoclonal anti-β-actina (dil 1:1.000), diluidos en el mismo tampón de bloqueo. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo para TFIIB, y un anticuerpo anti IgG de ratón para β-actina (dil 1:5.000) diluidos en la solución de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron y se detectaron las distintas proteínas por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). Los resultados se mostraron como una foto representativa de cada Western blot.

Para los estudios de inmunofluorescencia, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm con una densidad de  $1 \times 10^5$  células/placa, sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con una monocapa de gelatina 2% p/v. Una vez estimuladas, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% p/v en PBS frío durante 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% (v/v) en PBS frío durante 30 min y se bloquearon con BSA al 3% (p/v) en PBS a temperatura ambiente por 1 h. Entre cada uno de los procedimientos se lavó 3 veces con PBS frío. Posteriormente, las células se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales anti-TonEBP (dilución 1:400). Luego, las preparaciones se lavaron con una solución tampón PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos secundarios anti igG de conejo conjugado a FITC. Para la tinción de los núcleos celulares, las células luego se trataron con PI (1 µg/mL) por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos con cardiomiocitos se lavaron con PBS y montados en portaobjetos utilizando la solución de montaje DAKO, para disminuir el decaimiento de la fluorescencia. La fluorescencia de las distintas proteínas se registró y fotografió bajo un microscopio confocal (Carl Zeiss Axiovert 135, LSM Microsystems) y documentados a través de imágenes computarizadas.

#### **4.10. Evaluación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán**

Al término de cada experimento se removió el medio de cultivo y a cada placa se le agregó 1,6 mL de dilución de tripsina-EDTA en medio Hank's (previamente temperado a 37°C) para soltar las células adheridas. Después de 5 min a 37°C, a las placas se les agregó FBS (dilución 1:12) para detener la acción de la tripsina. Luego las células se traspasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 114xg por 7 min a temperatura ambiente. A continuación la pella celular se resuspendió en 200 µL de dilución 1:10 de FBS en medio Hank's temperado, y se dejó en el incubador hasta el momento de su conteo. Para el recuento celular, primero se realizó una dilución (1:2) de la suspensión de células con medio Hank's y luego se agregó azul de tripán (1:1) a la suspensión celular y se procedió a contar las células viables (blancas) y las células no viables (azules) en una cámara de Neubauer. Los resultados son mostrados como la razón de células viables en cada grupo experimental con respecto al recuento total del control en cada tiempo estudiado.

#### **4.11. Determinación de los niveles de proteína de TonEBP y aldosa reductasa**

Para estudiar los niveles de TonEBP y AR, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 100 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; Tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). El homogeneizado se centrifugó a 8850xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x para ser almacenado a -20°C. Las proteínas obtenidas de los extractos celulares se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 8% para visualizar TonEBP y al 12% para visualizar AR, en una cámara Miniprotean



(BioRad), y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  (BioRad) por 90 min a 0.45 A utilizando un sistema de transferencia húmedo. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo de leche descremada al 5% en solución salina de TBS-Tween-20 (0.01% v/v) (TTBS). Luego las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales anti-TonEBP (dil 1:5.000) y anti-AR (dil 1:20.000), diluidos en el mismo tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS e incubaron por 2h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (dil 1:5.000) en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectaron los niveles de proteína de TonEBP y AR por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). Las intensidades de las bandas resultantes se determinaron por densitometría (USI, Silk Scientific Corporation). Los resultados se expresaron como la razón entre las bandas correspondientes a TonEBP y AR respecto a sus respectivos controles de carga y se comparó cada tiempo con respecto al control (ensayo en ausencia de estímulo).

## **5. Resultados**

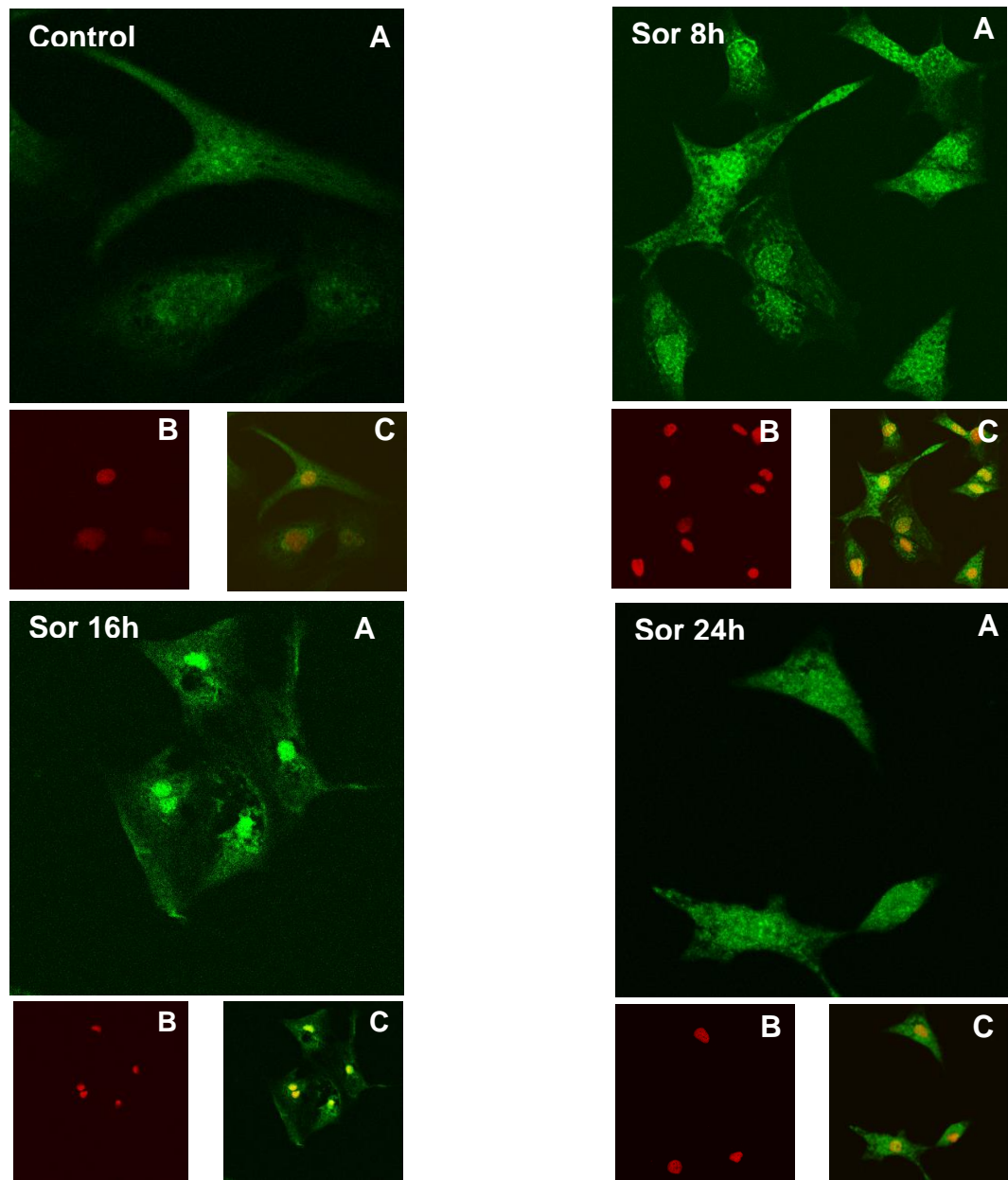
### **5.1 Efecto de estrés osmótico sobre la distribución subcelular y niveles de proteína de TonEBP en cultivos primarios de cardiomiocitos**

El efecto del estrés osmótico en la activación de TonEBP se investigó estudiando los cambios en su distribución subcelular y cantidades de su proteína por inmunofluorescencia y Western blot, respectivamente. Para ello se utilizó un anticuerpo que reconoce el extremo amino terminal de TonEBP. Los cardiomiocitos neonatos se expusieron a estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) o hiposmótico (medio de mantención diluido en un 30% con agua destilada) o controles (ausencia de estímulo) por diferentes tiempos.

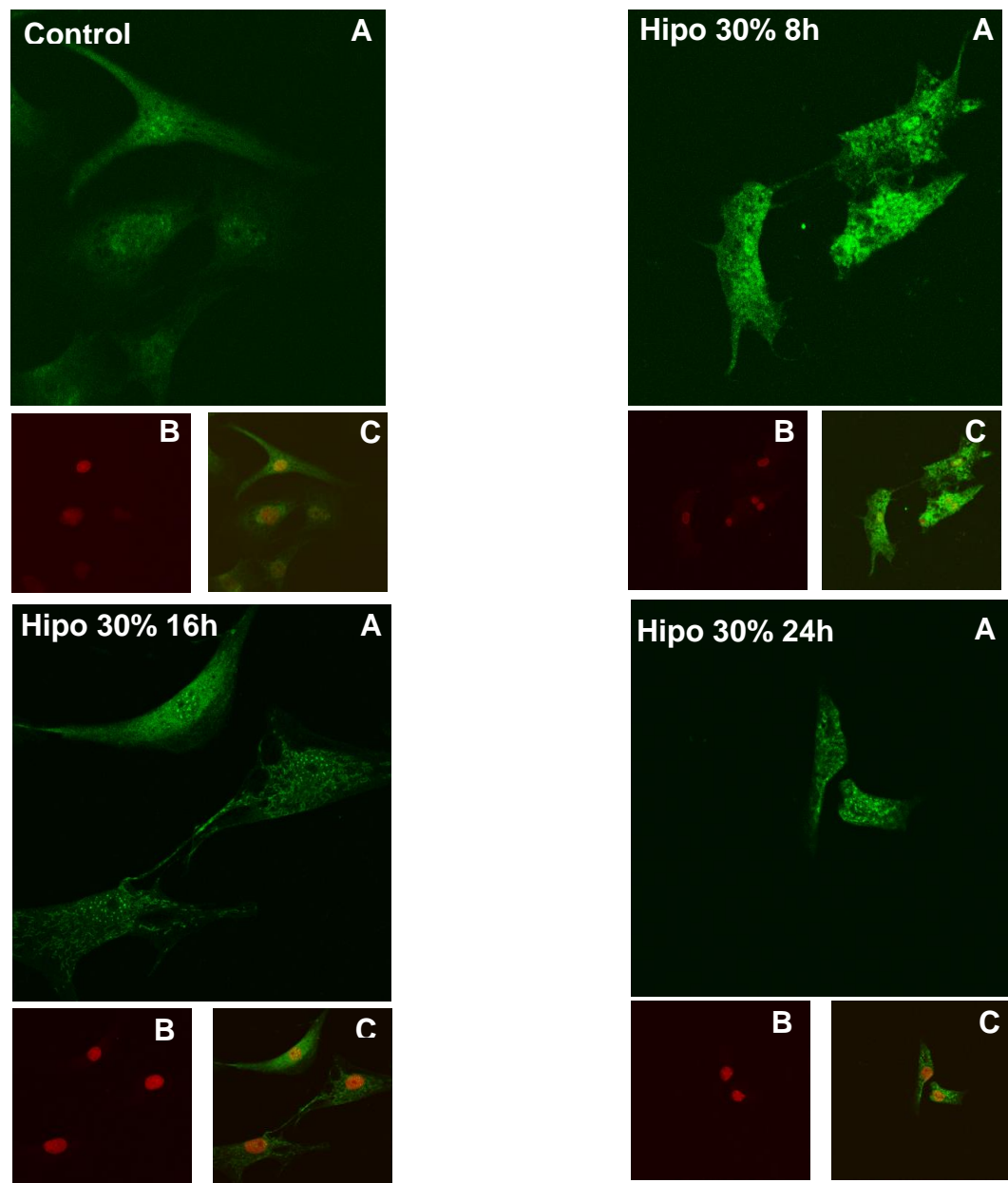
En la Figura 3 se muestran los resultados de inmunofluorescencia obtenidos luego de estimular por 8, 16 y 24 h, donde se observa que el estrés hiperosmótico estimuló la migración de TonEBP desde el citosol al núcleo. En cambio, el estrés hiposmótico no modificó la distribución subcelular de TonEBP (Figura 4).

Los análisis de Western blot para TonEBP se realizaron utilizando extractos proteicos de cardiomiocitos tratados a diferentes tiempos con sorbitol (600 mOsm) o con medio hiposmótico al 30%. La Figura 5a muestra que la cantidad de TonEBP aumenta a partir de las 8 h post-estímulo, tiempo que coincide con un aumento en la fluorescencia nuclear, vista en los resultados de la Figura 3. En cambio, los resultados mostrados en la Figura 5b indican que la cantidad de TonEBP disminuye por el estrés hiposmótico a partir de las 8h respecto al control.

Colectivamente, estos resultados indican que el estrés hiperosmótico promueve la redistribución del factor TonEBP en el cardiomiocito, movilizándose al compartimento nuclear, y que aumenta la cantidad de proteína bajo las mismas condiciones de estrés. Sin embargo, el estrés hiposmótico no cambió la distribución subcelular pero sí disminuyó la cantidad de TonEBP.

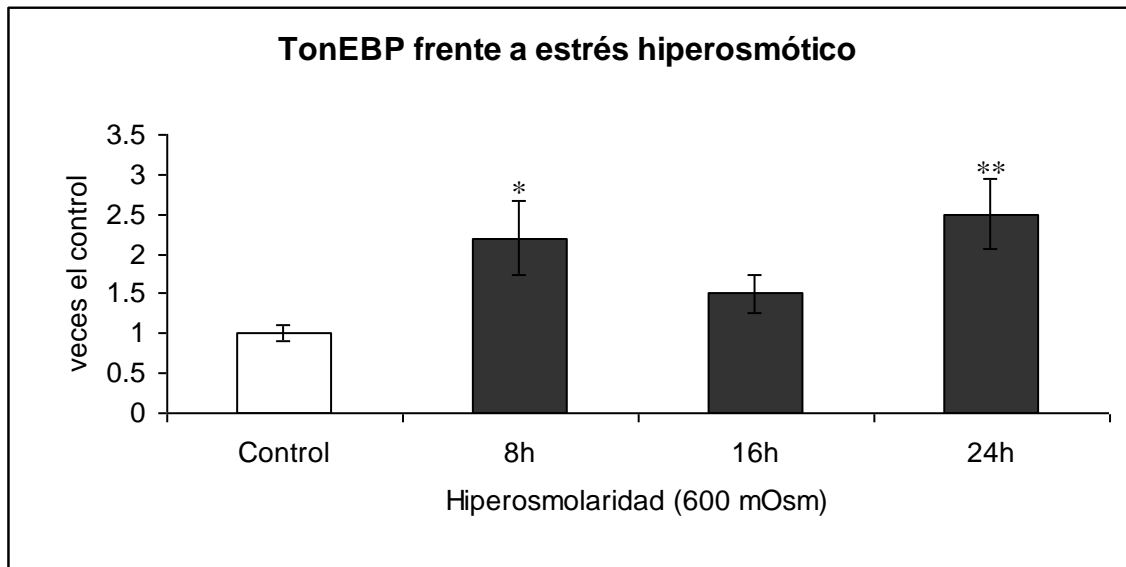
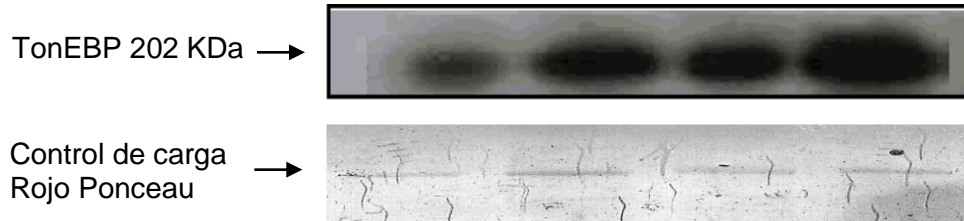


**Figura 3: Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP.** Las imágenes obtenidas por microscopía confocal corresponden a cardiomiocitos expuestos a sorbitol (600 mOsm) por distintos tiempos. Las células se fijaron con formaldehído, permeabilizaron e incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-TonEBP y anti-conejo IgG conjugado a FITC (Paneles A). Adicionalmente, los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (Paneles B) y se visualizaron en el microscopio en superposición con panel A (Paneles C).



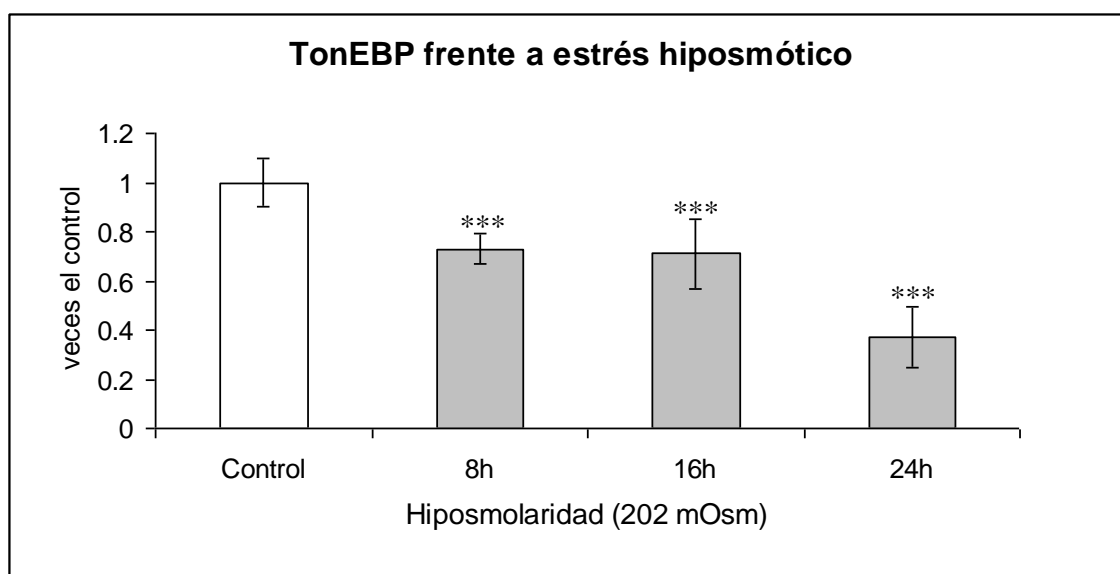
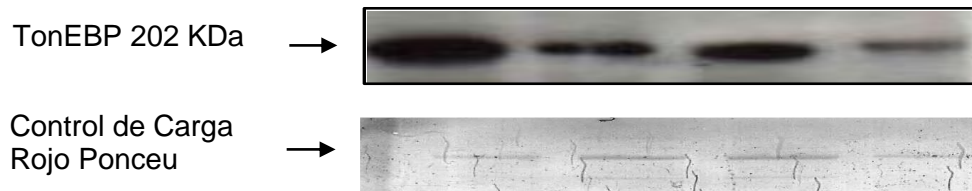
**Figura 4: Efecto del estrés hiposmótico en la distribución subcelular de TonEBP.** Las imágenes obtenidas por microscopía confocal corresponden a un estudio de inmunofluorescencia de cardiomiocitos expuestos en medio hiposmótico (202 mOsm) a distintos tiempos. Las células se fijaron con formaldehído, permeabilizaron e incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-TonEBP y anti-conejo IgG conjugado a FITC (Paneles A). Adicionalmente, los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (Paneles B) y se visualizaron en el microscopio en superposición con panel A (Paneles C).

**A**



**Figura 5a: Determinación de los niveles de TonEBP por Western blot.** Cardiomiocitos de ratas neonatas se incubaron con sorbitol (600mOsm) para inducir estrés hiperosmótico, por 8, 16 y 24h. Finalizado el periodo de incubación, se extrajeron proteínas totales y se separaron 15  $\mu$ g de proteínas en un gel al 8% de acrilamida. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se evaluaron los niveles de TonEBP por Western blot, utilizando un título de 1:5000. \*p<0.05 v/s control, \*\*p<0.01v/s control. (Test ANOVA).

**B**



**Figura 5b: Determinación de los niveles de TonEBP por Western blot.** Cardiomiocitos de ratas neonatas se incubaron con medio de mantención diluído en un 30% (205 mOsm) para inducir estrés hiposmótico, por 8, 16 y 24h. Finalizado el periodo de incubación, se extrajeron proteínas totales y se separaron 15  $\mu$ g de proteínas en un gel al 8% de acrilamida. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se evaluaron los niveles de TonEBP por Western blot, utilizando un título de 1:5000. \*\*\* $p < 0.001$  v/s control. (Test ANOVA).

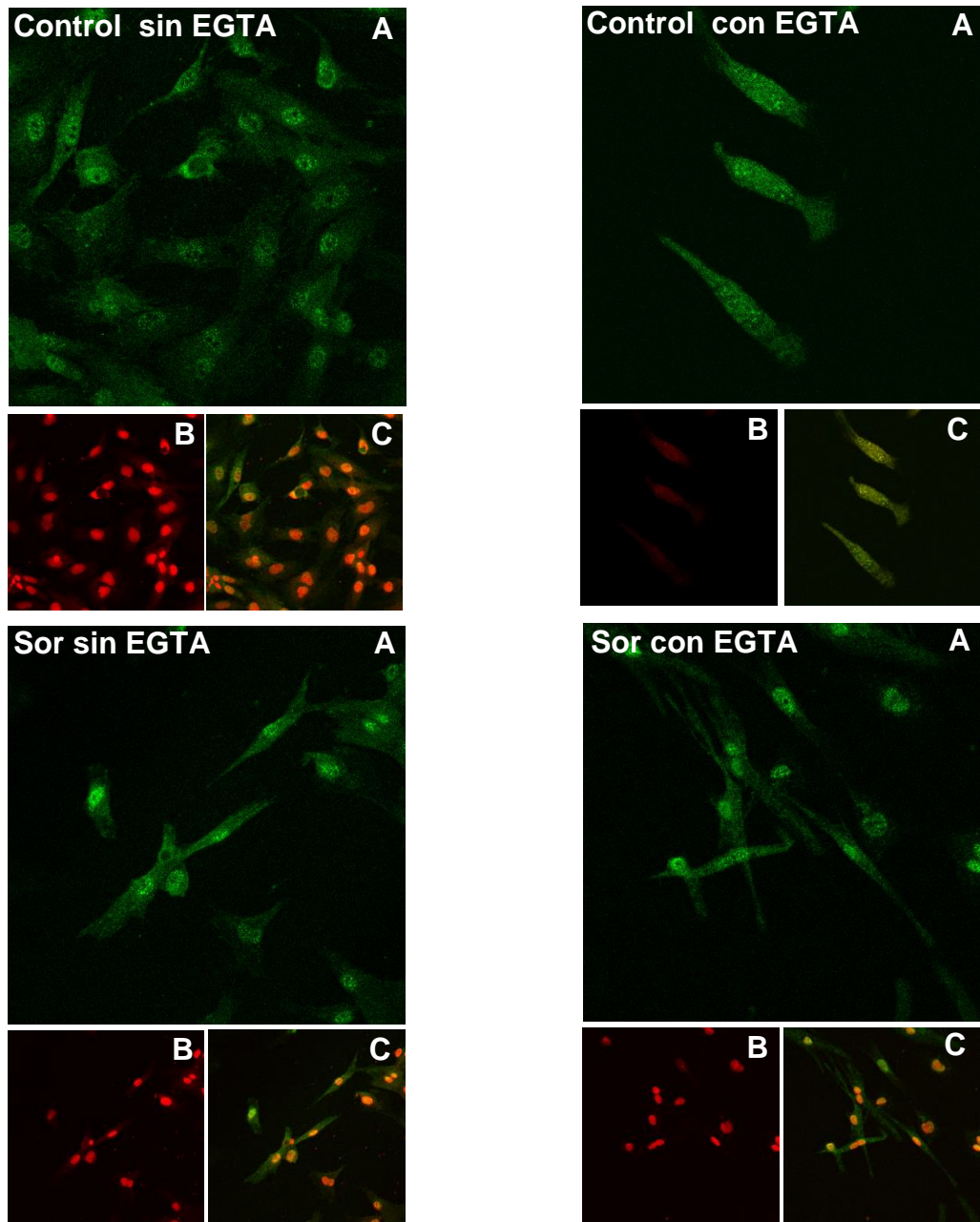
## **5.2. Regulación de TonEBP en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos**

### **5.2.1. Por calcio**

Para determinar la participación del Calcio, como vía de señalización del estrés hiperosmótico por sorbitol sobre TonEBP, se utilizó EGTA (5 mM, quelante del calcio extracelular), BAPTA-AM (100  $\mu$ M, quelante del calcio intracelular) o NFD (10  $\mu$ M, bloqueador del canal tipo L).

Los resultados mostrados en la Figura 6 corresponden a inmunofluorescencias, donde se observa la exposición de las células por 4 h a estrés hiperosmótico por sorbitol más distintos quelantes de calcio. Este experimento se realizó sólo con 4 horas de exposición a Sorbitol más los quelantes de calcio, porque las células mueren más de 4 horas sin calcio y por lo tanto no tendríamos resultados concluyentes.

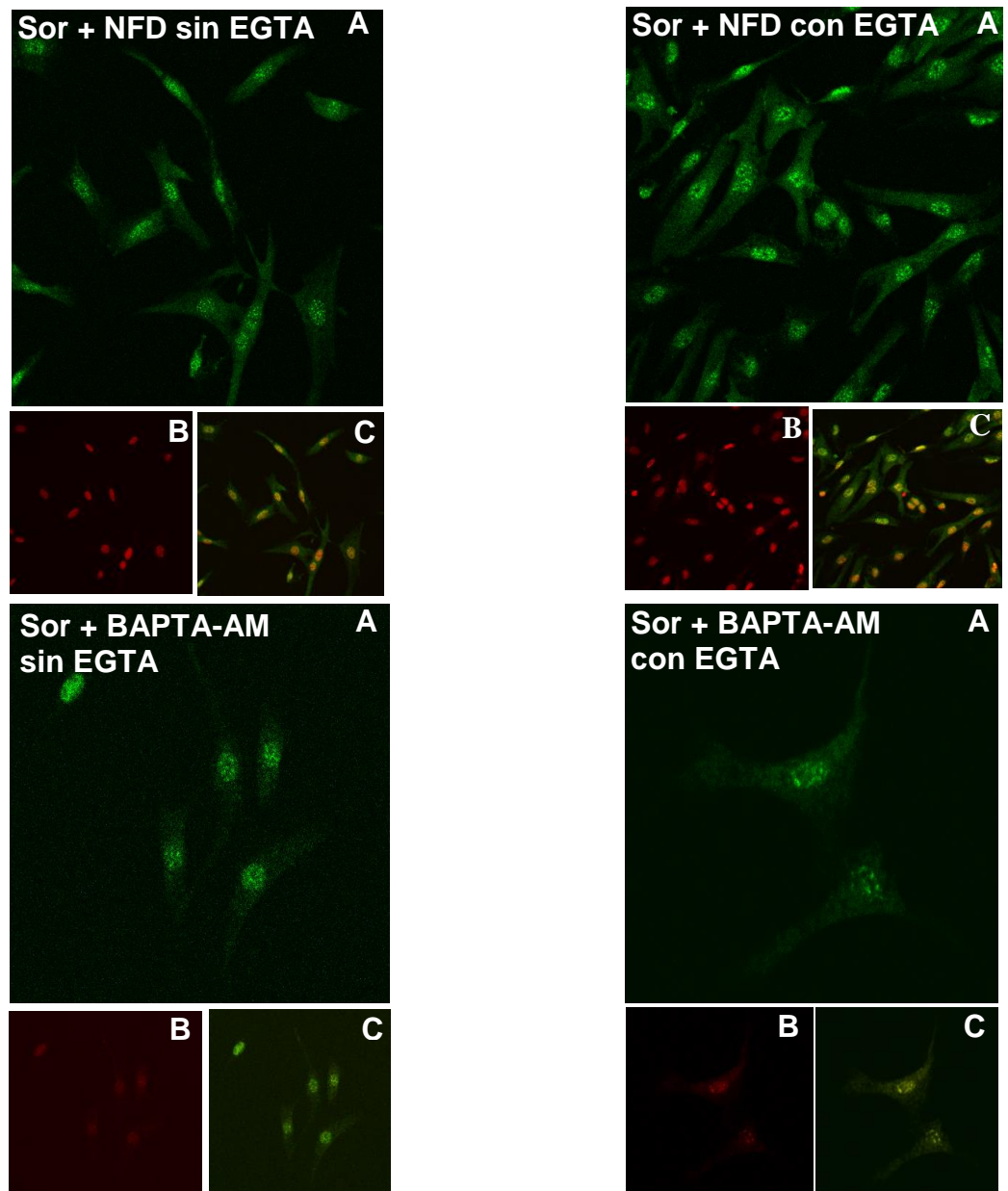
EL estrés hiperosmótico inducido por sorbitol, estimuló la translocación de TonEBP desde el citosol al núcleo. Sin embargo, todos los compuestos ensayados (EGTA, BAPTA-AM y NFD) no bloquearon la translocación de TonEBP al núcleo. Estos resultados sugieren que tanto el calcio externo como interno no son necesarios para la translocación nuclear de TonEBP.



**Figura 6: Efecto del Calcio en la distribución subcelular de TonEBP.**

Imágenes de microscopía confocal correspondiente a un estudio de inmunofluorescencia de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico con Sorbitol (600 mOsm) más inhibidores de calcio por 4 h, estos inhibidores fueron EGTA (5 mM), NFD (10  $\mu$ M) y BAPTA-AM (100  $\mu$ M). Las células se fijaron con formaldehído, permeabilizaron e incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-TonEBP y anti-conejo IgG conjugado a FITC (Paneles A). Adicionalmente, los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio (Paneles B) y se visualizaron en el microscopio en superposición con panel A. (Paneles C).





**Figura 6: Efecto del Calcio en la distribución subcelular de TonEBP.**

Imágenes de microscopia confocal correspondiente a un estudio de inmunofluorescencia de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico con Sorbitol (600 mOsm) más inhibidores de calcio por 4 h, estos inhibidores fueron EGTA (5 mM), NFD (10  $\mu$ M) y BAPTA-AM (100  $\mu$ M). Las células se fijaron con formaldehído, permeabilizaron e incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-TonEBP y anti-conejo IgG conjugado a FITC (Paneles A). Adicionalmente, los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio (Paneles B) y se visualizaron en el microscopio en superposición con panel A. (Paneles C).

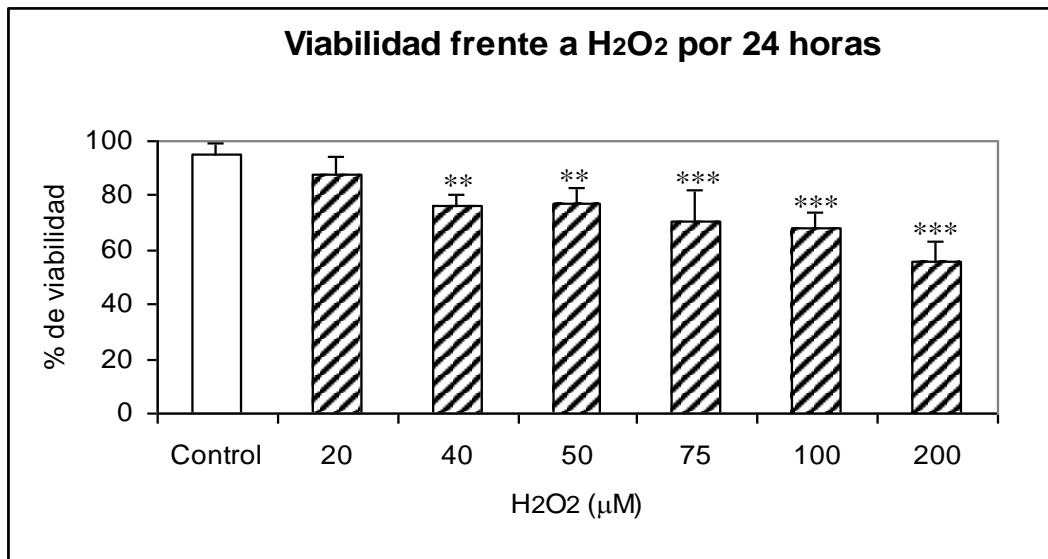
### 5.2.2. Por estrés oxidativo

Para evaluar el efecto del estrés oxidativo en la viabilidad del cardiomiocito, se realizó el ensayo de exclusión con azul de tripán. Para ello, los cardiomiocitos se expusieron a estrés oxidativo con  $H_2O_2$  a distintas concentraciones por 24 h (Figura 7). De este resultado se obtiene que la concentración de  $H_2O_2$  que se usó para generar estrés oxidativo es de  $75\mu M$ .

El efecto del estrés oxidativo en la activación de TonEBP se estudió a nivel de su distribución subcelular y cantidad de proteína. Este estudio se realizó a través de dos aproximaciones experimentales: inmunofluorescencia y Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce a TonEBP (o también conocido como NFAT5). Para esto los cardiomiocitos en cultivo fueron tratados, por diferentes tiempos, con  $H_2O_2$  ( $75\mu M$ ) para generar estrés oxidativo y también con  $H_2O_2$   $75\mu M$  más NAC  $5mM$ . NAC es N-acetilcisteína, antioxidante, el cual se usó en este ensayo para revertir el efecto del estrés oxidativo. Los resultados de la inmunofluorescencia de la Figura 8 sugieren que el estrés oxidativo estimularía una redistribución del factor transcripcional TonEBP desde el citosol al núcleo, tal como ocurre con estrés hiperosmótico inducido por sorbitol  $600mOsm$ , observándose cambios subcelulares más apreciables a las 8 h. En cambio los cardiomiocitos tratados previamente con NAC y luego estimulados con  $H_2O_2$  o con Sorbitol, no tuvieron el mismo efecto, es más se comportaron muy similar al control. Los western blot se realizaron utilizando extractos proteicos de cardiomiocitos tratados a diferentes tiempos con  $H_2O_2$   $75\mu M$  y con NAC  $5mM$  más  $H_2O_2$   $75\mu M$  por 8, 16 y 24 h. Los resultados mostrados (Figura 9), indican que no hay cambios en la cantidad de proteína de TonEBP a ninguna de las horas ensayadas.

Estos resultados en su conjunto indican que el estrés oxidativo promueve la redistribución del factor TonEBP en el cardiomiocito, el cual se moviliza al

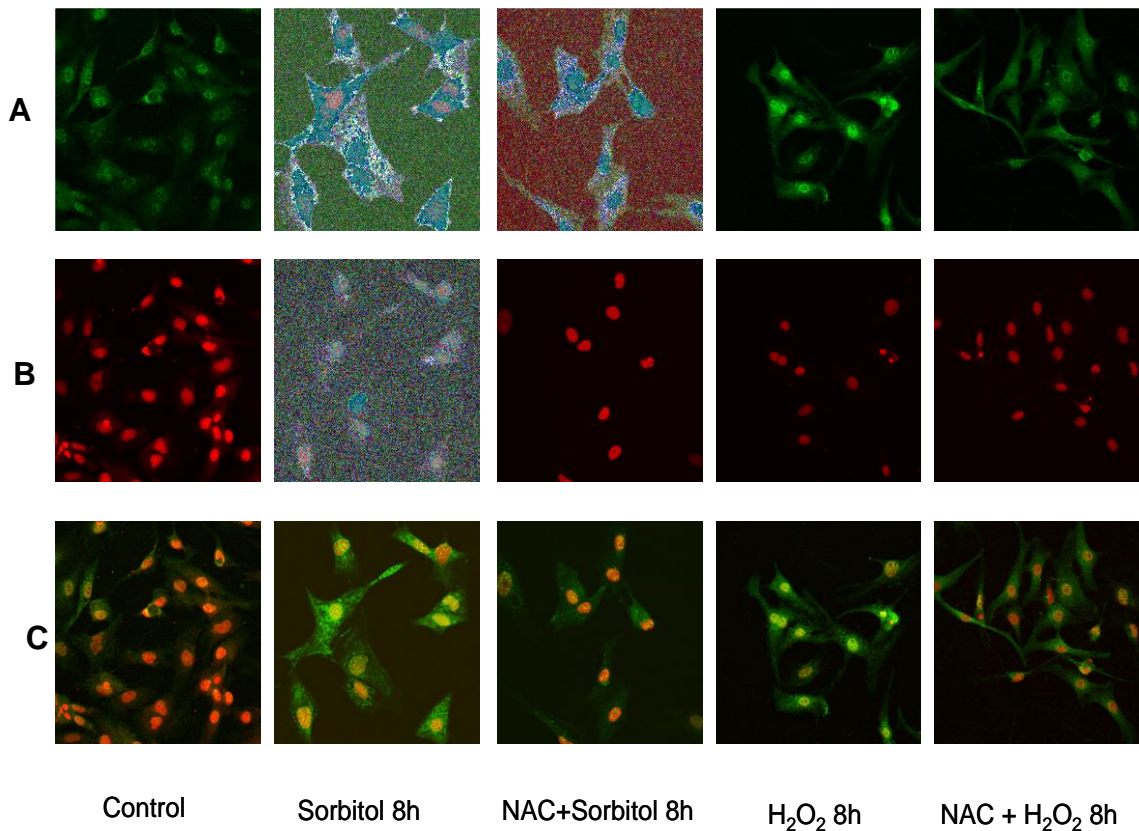
compartimento nuclear, sin embargo no permite que este aumente su cantidad de proteína bajo las mismas condiciones de estrés.



**Figura 7: Efecto del estrés oxidativo en la viabilidad del cardiomiocito.**

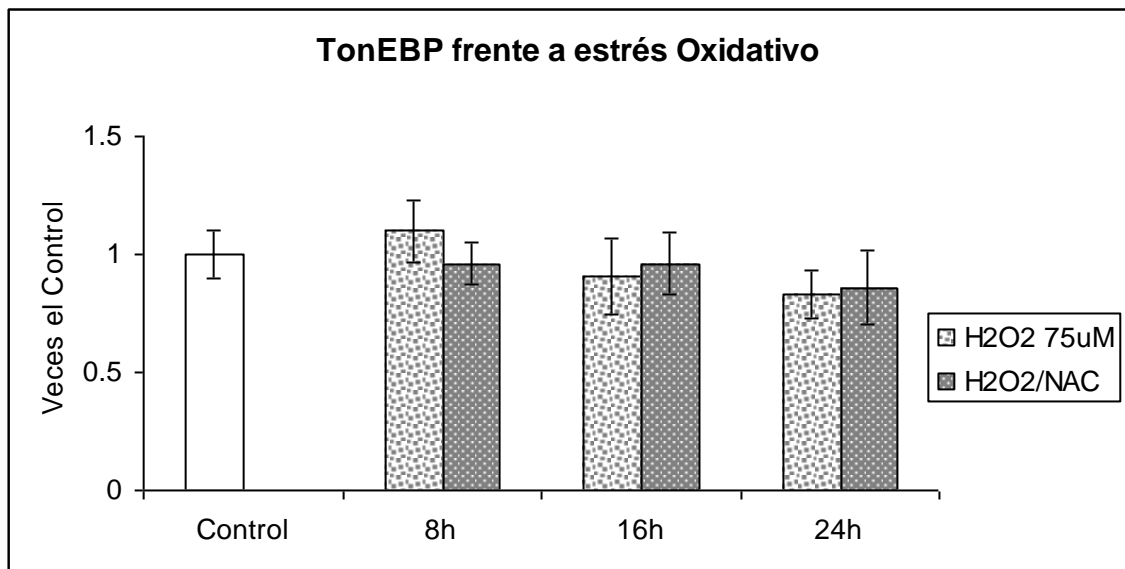
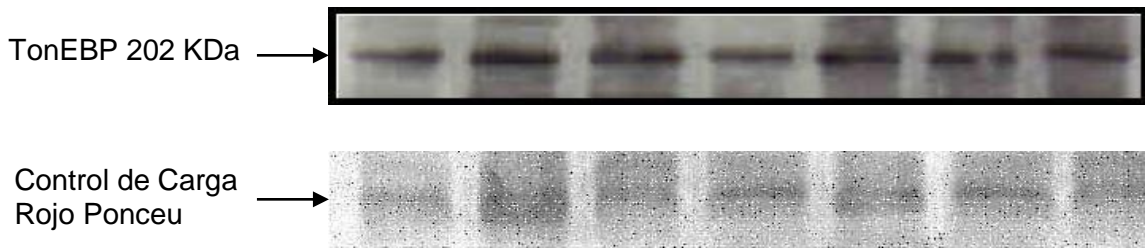
Los cardiomiocitos fueron expuestos a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones por 24 h. Luego a las células obtenidas en las placas se les agrega tripsina-EDTA para soltarlas y luego se les agrega FBS para parar detener la reacción de la tripsina, luego se centrifugan para obtener la pella de células que se contarán al agregar azul de tripán. Finalmente las células se cuentan en una cámara de Neubauer, donde las células blancas son las vivas y las células azules corresponden a células muertas. Los resultados son mostrados como la razón de las células viables en cada grupo experimental con respecto al recuento total del control en cada punto estudiado.

\*\*p<0.001 v/s control, \*\*\*p<v/s control. (Test ANOVA).



**Figura 8: Efecto del estrés oxidativo en la distribución subcelular de TonEBP.**

Imágenes obtenidas por microscopia confocal, correspondiente a un estudio de inmunofluorescencia de cardiomiocitos expuestos a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 75  $\mu$ M, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75  $\mu$ M) + NAC (5 mM) y a Sorbitol (600 mOsm) + NAC 5 mM por 8 h. Las células se fijaron con formaldehído, permeabilizaron e incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-TonEBP y anti-conejo IgG conjugado a FITC (Paneles A). Adicionalmente los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio (Paneles B) y se visualizaron en el microscopio en superposición con panel A. (Paneles C).



**Figura 9: Efecto del estrés oxidativo en la cantidad de TonEBP en cardiomiocitos de ratas neonatas.** Las células se trataron con  $H_2O_2$  75  $\mu$ M en presencia o ausencia de NAC 5 mM por 30 min antes de estimularlas con  $H_2O_2$  por los tiempos indicados. Finalizado el periodo de incubación, se extrajeron proteínas totales y se cargó un gel al 8% de acrilamida con 15  $\mu$ g de proteínas. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se evaluó la presencia de TonEBP, utilizando un título de Ac de 1:5000. (Test ANOVA).

### **5.3. Efecto del estrés osmótico sobre la aldosa reductasa en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos**

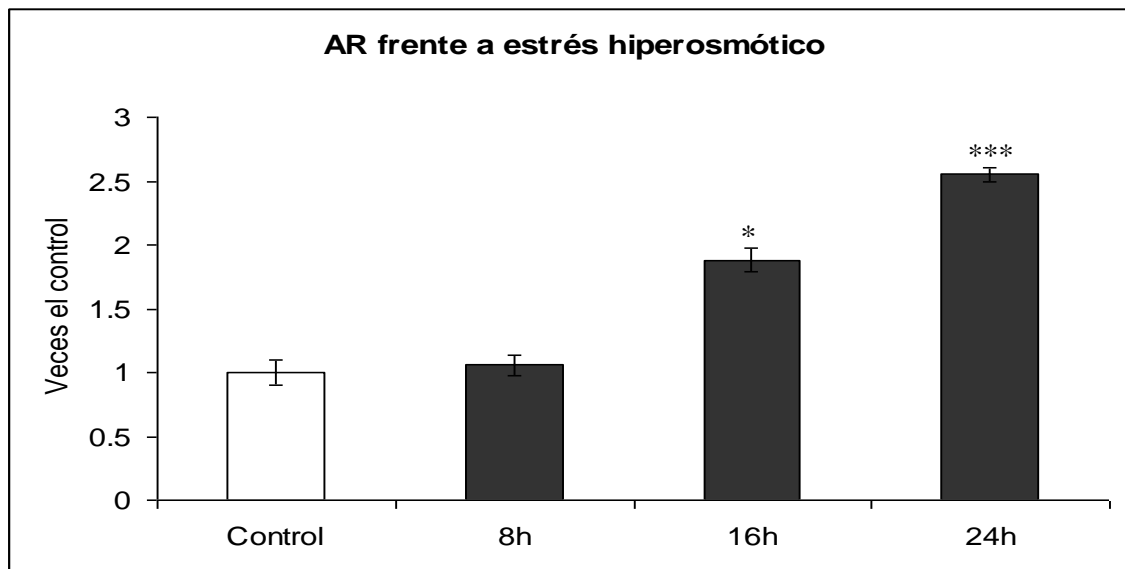
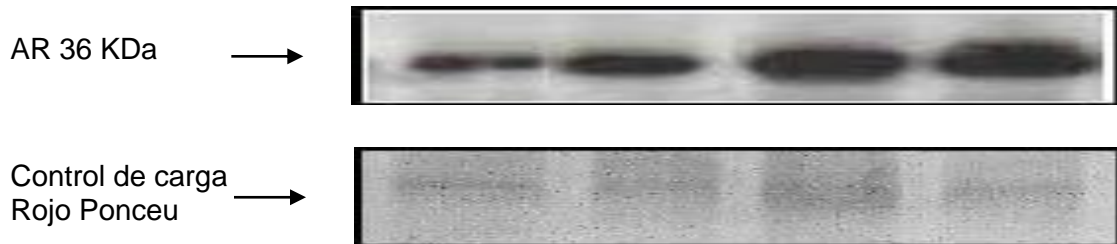
El efecto de estrés osmótico sobre la aldosa reductasa (AR) se estudió a nivel de su actividad enzimática y cantidad de proteína. La actividad de AR se determinó espectrofotométricamente siguiendo la desaparición de NADPH a 340 nm. Los cardiomiocitos en cultivo se expusieron a estrés hiperosmótico con sorbitol (600 mOsm) por distintos tiempos o medio de mantención diluido en un 30% para generar estrés hiposmótico (202 mOsm). En extractos de cardiomiocitos tratados se determinaron los niveles de AR por Western blot y su actividad.

Los resultados mostrados en la Figura 10a indican que la hiperosmolaridad aumentó la cantidad de proteína de AR partir de las 8 h post-estímulo. En cambio, la hiposmolaridad no modificó las cantidades de proteína de AR significativamente respecto al control (Figura 10b).

Los resultados de Figura 11a muestran que el estrés hiperosmótico aumentó significativamente la actividad de AR respecto al control. Sin embargo en condiciones de estrés hiposmótico no hubo cambios en la actividad de AR respecto al control (Figura 11b).

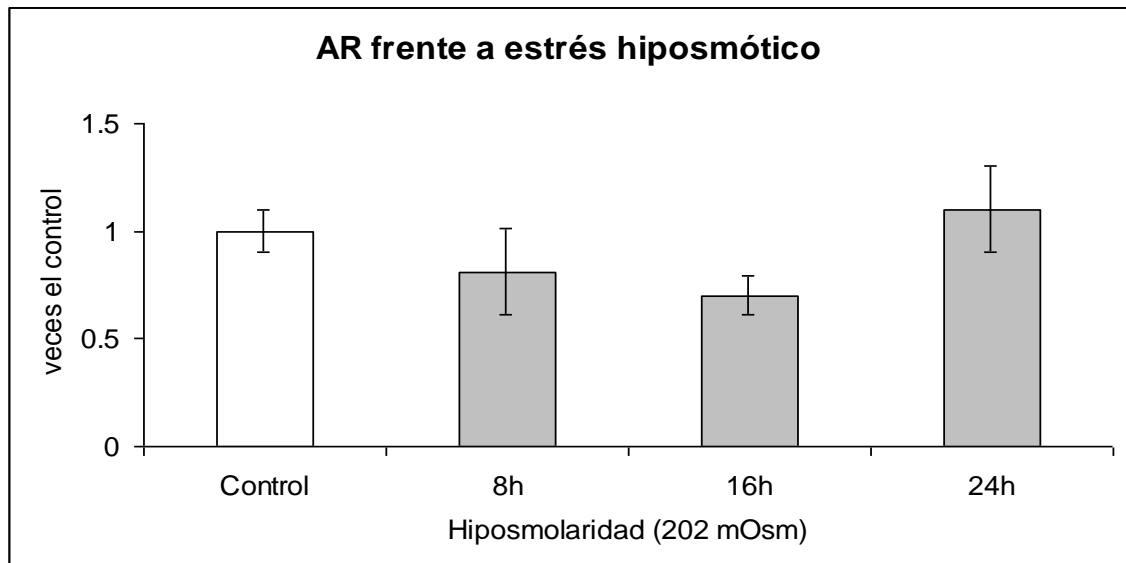
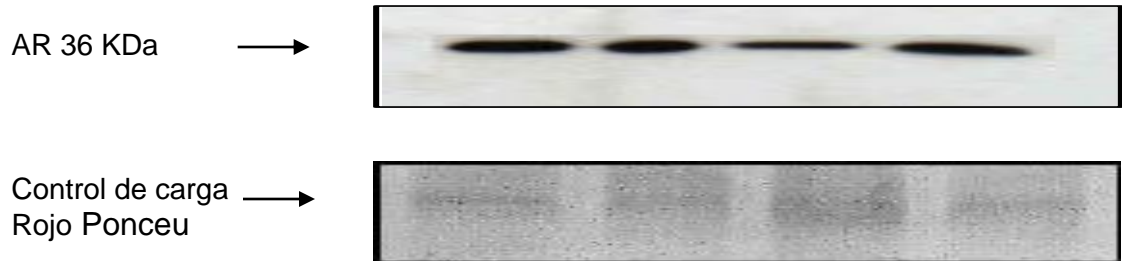
En resumen, estos resultados indican que el estrés hiperosmótico, pero no el hiposmótico, aumentó tanto la cantidad de proteína como la actividad de AR.

**A**



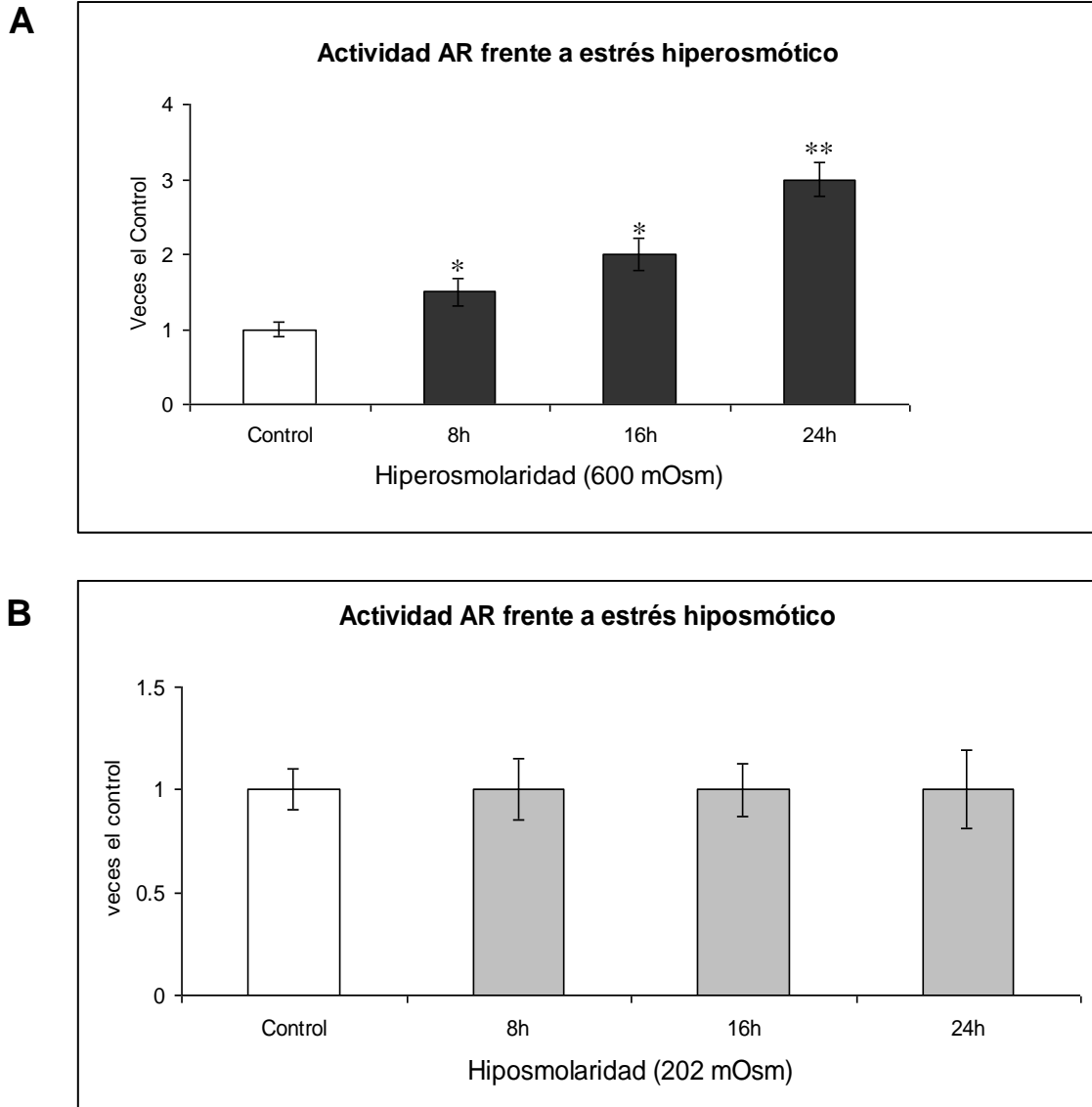
**Figura 10a: Efecto del estrés osmótico en la cantidad de proteína de AR en cardiomiocitos de ratas neonatas.** Las células se expusieron a sorbitol (600 mOsm) para inducir estrés hiperosmótico por 8, 16 y 24 h. Finalizado el periodo de incubación, se extrajeron proteínas totales y 15  $\mu$ g de proteínas se separaron por electroforesis en un gel al 12% de poliacrilamida. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, la cantidad de AR se determinó por Western blot. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , v/s control. (Test ANOVA).

**B**



**Figura 10b: Efecto del estrés osmótico en la cantidad de proteína de AR en cardiomiocitos de ratas neonatas.** Las células se expusieron en medio de mantención diluido en un 30% (205 mOsm) para inducir estrés hiposmótico por 8, 16 y 24 h. Finalizado el periodo de incubación, se extrajeron proteínas totales y 15  $\mu$ g de proteínas se separaron por electroforesis en un gel al 12% de poliacrilamida. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, la cantidad de AR se determinó por Western blot. (Test ANOVA).

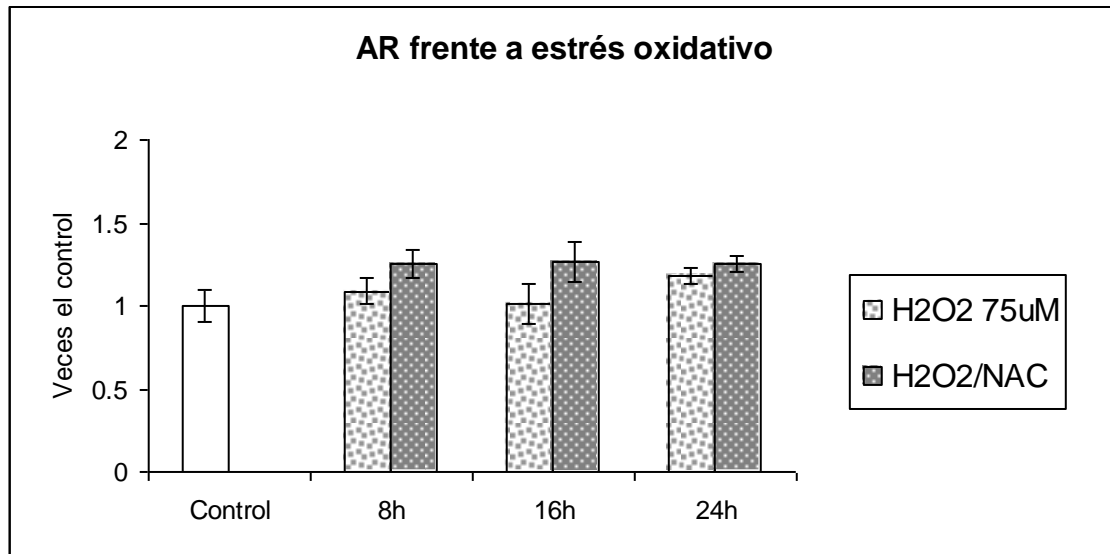
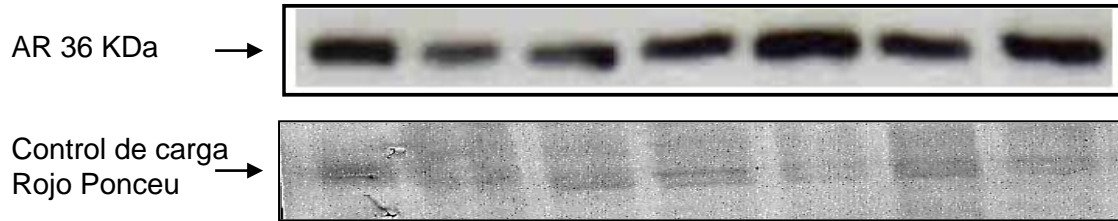




**Figura 11: Determinación de la actividad de AR.** Los cardiomiocitos fueron expuestos a estrés hiperosmótico (600 mOsm) o hiposmótico (205 mOsm) durante 8, 16 y 24 h. Luego, las células se lisan. El extracto celular se centrifuga y el sobrenadante se dializa toda la noche en tampón de lisis. Las muestras dializadas se incuban en una columna pre-equilibrada de DEAE-Celulosa. AR fue eluida con concentraciones crecientes de NaCl. \* $p < 0.05$  v/s control, \*\* $p < 0.01$  v/s control. (Test ANOVA).

#### **5.4. Efecto del estrés oxidativo sobre aldosa reductasa en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos**

El efecto de estrés oxidativo sobre la cantidad de proteína de AR se estudió por Western blot. Para ello los cardiomiocitos se trataron por 8, 16 y 24 h con  $\text{H}_2\text{O}_2$  75  $\mu\text{M}$  para generar estrés oxidativo y también se preincubaron con NAC 5 mM previo estrés oxidativo, para revertir el efecto de dicho estrés. Los western blot se realizaron en extractos proteicos de cardiomiocitos tratados. Los resultados mostrados en la Figura 12, indican que la cantidad de AR a las 8, 16 y 24 h post-estímulo no se modificaron con respecto al control con  $\text{H}_2\text{O}_2$  75  $\mu\text{M}$ , ni cuando fueron tratadas con NAC.

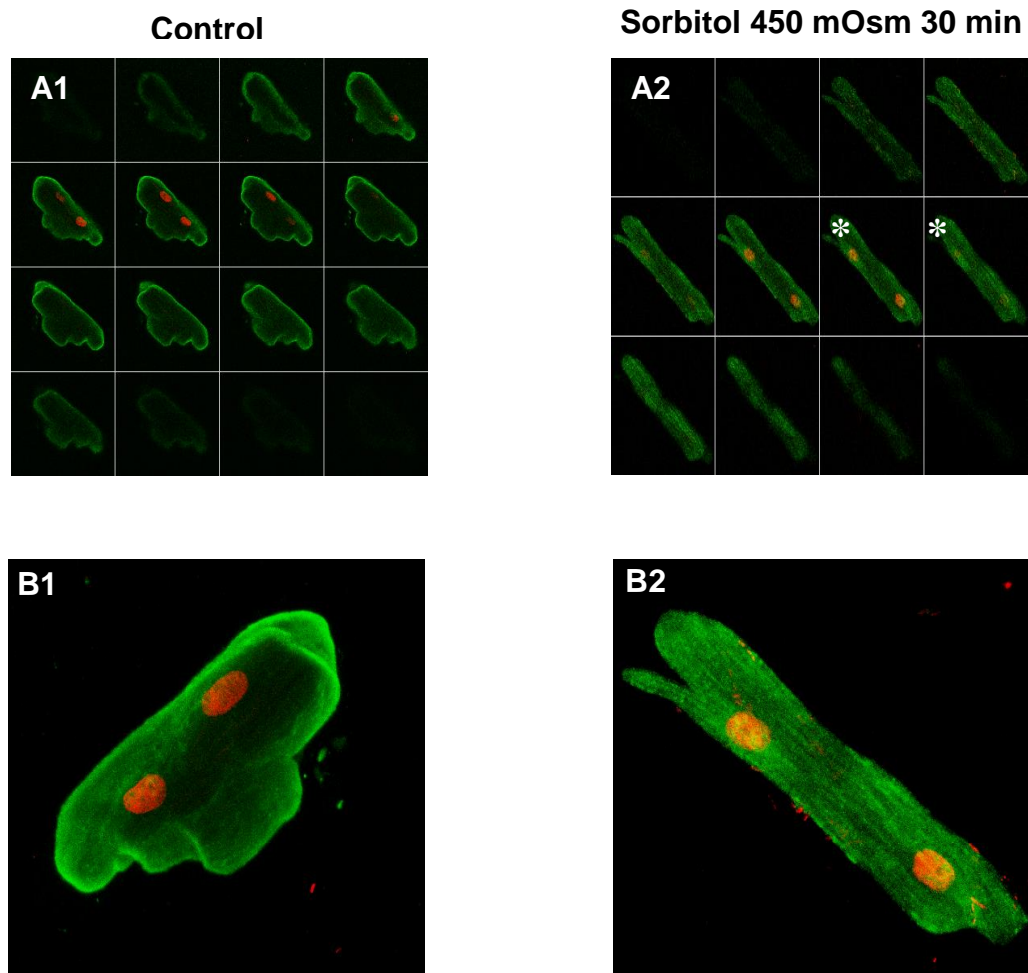


**Figura 12: Efecto del estrés oxidativo en la cantidad de AR en cardiomiocitos de ratas neonatas.** Las células se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 75 μM en presencia o ausencia de NAC 5 mM por 30 min antes de estimularlas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por los tiempos indicados. Finalizado el periodo de incubación, se extrajeron proteínas totales y se cargó un gel al 12% de acrilamida con 15 μg de proteínas. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se evaluó la presencia de AR, utilizando un título de Ac de 1:20000. (Test ANOVA).

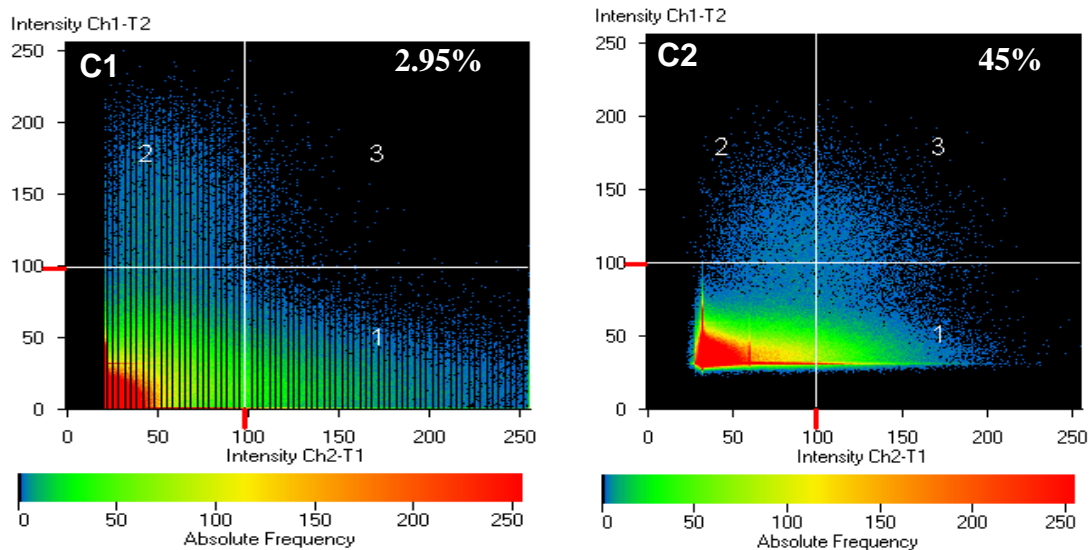
## **5.5. Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP en cultivos primarios de cardiomiocitos adultos**

Cardiomiocitos adultos en cultivo se expusieron por 30 min con sorbitol (450 mOsm) o controles (ausencia de estímulo) para generar estrés hiperosmótico. Los resultados mostraron sorprendentemente que la distribución subcelular de TonEBP en el cardiomiocito adulto es completamente diferente a la del cardiomiocito neonato. En estas condiciones, TonEBP se encuentra en la periferia de la célula. Sin embargo, al estimular con Sorbitol 450 mOsm por 30 min se observó migración de este factor desde la periferia celular al núcleo (Figura 13). La Figura 13 también muestra una reconstitución 3D en el eje zeta de distintos planos obtenidos por microscopía confocal de las células controles y expuestas a Sorbitol 450 mOsm de la figura anterior, indicando que efectivamente en las células controles ninguno de los planos obtenidos muestra marca de TonEBP nuclear, sino que sólo periférica. Sin embargo en las células estimuladas hay marca de TonEBP en el núcleo, lo que se ve en los planos marcados con asterisco, con un porcentaje de colocalización de un 45% lo que fue indicado por el histograma que mide intensidad de la fluorescencia en forma específica.

Estos resultados indican que TonEBP responde a hiperosmolaridad en cardiomiocitos adultos al igual que en cardiomiocitos neonatos, sin embargo la distribución subcelular de este factor es distinta en cardiomiocitos adultos comparada con los demás tipos celulares.



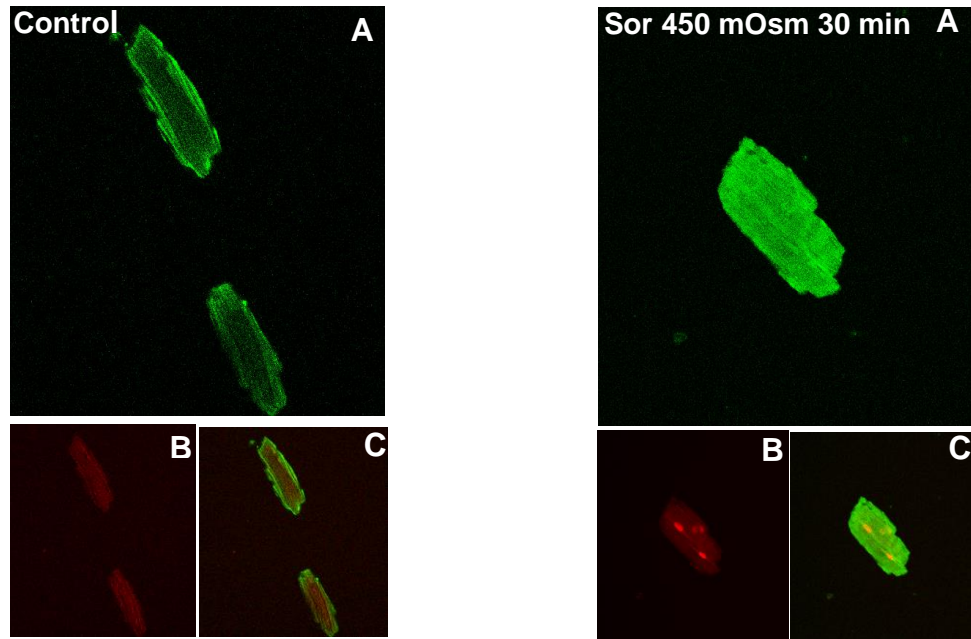
**Figura 13: Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP en cardiomiocitos de ratas adultas.** Imágenes de microscopía confocal, correspondiente a una inmunofluorescencia de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico con Sorbitol (450 mOsm) por 30 min. La figura en A muestra un zeta stack, cortes en distintos planos de la célula visualizada por microscopía confocal. En A1 se muestra la situación control, en A2 se muestran los cortes en células estimuladas. La figura 13 en B muestra la reconstitución 3D de los planos de la figura 13 A en el eje zeta. B1 muestra situación control, B2 muestra células estimuladas con sorbitol.



**Figura 13: Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de TonEBP en cardiomiocitos de ratas adultas.** Imágenes de microscopia confocal, correspondiente a una inmunofluorescencia de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico con Sorbitol (450 mOsm) por 30 min. La figura en C muestran histogramas donde se cuantifica la intensidad de fluorescencia tanto del FITC como PI, el cuadrante 3 indica la superposición de ambos canales de fluorescencia siendo en las células estimuladas con Sorbitol de un 45% de superposición. C1 corresponde a situación control y C2 corresponde al estímulo hiperosmótico con sorbitol.

## **5.6. Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de aldosa reductasa en cultivos primarios de cardiomiocitos adultos**

Se evaluó el efecto del estrés hiperosmótico por Sorbitol en la distribución subcelular de AR por inmunofluorescencia. Los cardiomiocitos adultos se trataron por 30 min con sorbitol (450 mOsm) o controles (ausencia de estímulo). Los resultados mostraron que la distribución subcelular de AR en el cardiomiocito adulto es también periférica, a similitud de TonEBP. Sin embargo, al estimular con Sorbitol 450 mOsm por 30 min se observó una señal homogénea de fluorescencia, es decir que se establece en toda la célula. (Figura 14). Estos resultados indican que la aldosa reductasa también responde a hiperosmolaridad en cardiomiocitos de ratas adultas, aumentando su fluorescencia en el caso de las células estimuladas con Sorbitol. (Figura 14).



**Figura 14: Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de AR en cardiomiocitos de ratas adultas.** Imágenes se obtuvieron microscopia confocal de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico con Sorbitol (450 mOsm) por 30 min. Las células se fijaron con formaldehído, permeabilizaron e incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-AR y anti-conejo IgG conjugado a FITC (Paneles A). Adicionalmente, los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (Paneles B) y se visualizaron en el microscopio en superposición con panel A (Paneles C).



## 6. Discusión

TonEBP/NFAT-5 es el único factor transcripcional de eucariontes, conocido hasta ahora, que responde a hiperosmolaridad (21). En estas condiciones TonEBP se fosforila y se transloca al núcleo donde media la transcripción de varios genes, involucrados en la acumulación de osmolitos orgánicos compatibles, entre los cuales se encuentran los genes para AR, SMIT, BGT-1 y TauT (6).

En nuestro laboratorio, resultados preliminares en cardiomiocitos de ratas neonatas, han indicado que el estrés hiperosmótico inducido por Sorbitol (600 mOsm), produce aumento en la actividad y en la cantidad de proteína de AR, genera especies reactivas del oxígeno (ROS), y disminución del GSH intracelular en un 50% (11). Estos antecedentes sugieren que TonEBP participa en la respuesta a la hiperosmolaridad inducida por Sorbitol en cardiomiocitos de ratas neonatas.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de esta tesis fue el estudio del factor transcripcional TonEBP y su gen blanco AR frente al estrés osmótico en cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas.

### 6.1. Regulación de TonEBP por estrés osmótico en cardiomiocitos neonatos.

Los resultados de inmunofluorescencia mostrados en la Figura 3 indican que TonEBP está presente en cardiomiocitos de ratas neonatas y que, en condiciones isosmóticas, se encuentra homogéneamente distribuido en dichas células. El estímulo hiperosmótico con Sorbitol (600 mOsm) induce en los cardiomiocitos, una rápida redistribución subcelular (Figura 3) y un aumento significativo en la cantidad de la proteína TonEBP (Figura 5a), el cual es proporcional al tiempo de estímulo. Lo anterior indica que en nuestro sistema de estudio, TonEBP responde frente al estrés hiperosmótico translocándose al núcleo y aumentando su cantidad de proteína.

Estos resultados están en concordancia con la literatura, en la que encontramos el mismo comportamiento en células renales, donde TonEBP se transloca completamente hacia el núcleo entre las 8 y las 10 horas post estímulo, produciéndose además un aumento de 4 veces en la expresión de TonEBP (6).

Por otra parte, al someter los cardiomiocitos a estrés hiposmótico, se observa que la distribución subcelular de TonEBP no cambia (Figura 4) y que, al contrario de lo que ocurre con estrés hiperosmótico, las cantidades de proteína disminuyen significativamente (Figura 5b).

Estos resultados sugieren que frente a la hiposmolaridad en estas células existe una regulación negativa del factor transcripcional TonEBP, lo que podría deberse a una degradación de proteínas en estas condiciones. En cuanto a lo observado en las inmunofluorescencia de TonEBP frente a estrés hiposmótico, vemos una menor fluorescencia en comparación a lo observado frente al estrés hiperosmótico, ya que la hiposmolaridad hincha a las células y al tener mayor volumen la fluorescencia se disipa, esto también podría estar influyendo en la menor fluorescencia en estas condiciones.

Un trabajo del grupo del Dr. Woo describe que en células renales la hiperosmolaridad regula en forma positiva a TonEBP, debido a un aumento en la abundancia nuclear y proteica de TonEBP, sin embargo la hiposmolaridad produce una regulación negativa de TonEBP, puesto que en estas condiciones hay una disminución en la abundancia tanto nuclear como citosólica de dicho factor (36).

Todos estos resultados sugieren que, en cardiomiocitos neonatos, TonEBP es regulado por cambios en la osmolaridad o fuerza iónica celular en ambas direcciones, es decir, se regula positivamente frente a hiperosmolaridad y negativamente frente a hiposmolaridad.

## **6.2. Regulación de aldosa reductasa por estrés osmótico en cardiomiocitos neonatos.**

La enzima AR cataliza la síntesis de Sorbitol a partir de glucosa, utilizando como co-factor NADPH (11,12), y participa en la respuesta compensatoria al estrés hiperosmótico; sin embargo, también juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones de la diabetes y en el daño cardiaco por isquemia-reperfusión (32,34). Los resultados muestran que AR responde al estrés hiperosmótico (Figura 10a), aumentando su cantidad de proteína 3 veces respecto al control, al igual que su actividad enzimática (Figura 11a). Sin embargo, el estrés hiposmótico no induce cambios en la masa (Figura 10b) ni en la actividad enzimática de AR (Figura 11b), indicando que dicha enzima no es modulada por estrés hiposmótico en cardiomiocitos de rata neonata. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros sistemas celulares en los que la AR participa en la respuesta compensatoria frente a la hiperosmolaridad. (11,12).

## **6.3. Regulación de TonEBP por estrés oxidativo en cardiomiocitos neonatos**

El estrés oxidativo, se caracteriza por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), los cuales contribuyen a la regulación de factores transcripcionales. En nuestro modelo de estudio, se ha demostrado que el estrés hiperosmótico inducido por Sorbitol produce ROS (11); por lo que resultaba interesante relacionar el estrés oxidativo con la regulación de TonEBP. Con este propósito, cardiomiocitos en cultivo fueron expuestos a estrés oxidativo con Peróxido de Hidrógeno (75  $\mu$ M) y mediante inmunofluorescencia se observó que TonEBP se transloca al núcleo (Figura 8); sin embargo, N-acetilcisteína (NAC) revierte esta situación, impidiendo la translocación de TonEBP al compartimiento nuclear. Por otro lado, al analizar las cantidades de proteína de ToneBP (Figura 9) vemos que estas no cambian frente al estrés oxidativo, sugiriendo que el este tipo de estrés no participa en la inducción de TonEBP. Adicionalmente, de forma indirecta, podemos decir que el estrés oxidativo

no activa a TonEBP, puesto que las cantidades de proteína AR (uno de sus genes blanco) no cambian bajo estas condiciones (Figura 12). Finalmente, todos estos resultados sugieren que el estrés oxidativo es necesario para la translocación de TonEBP al núcleo, pero no suficiente para su activación. Esto se respalda con los resultados encontrados en las células HEK 293, donde se demostró que ROS es necesario para la completa activación de TonEBP inducida por hiperosmolaridad; sin embargo, el aumento de ROS *per se* no activa a TonEBP (42). Otros antecedentes que respaldan estos resultados, indican que el estrés hiperosmótico activa múltiples señales celulares, entre las que se encuentran la activación de las vías transduccionales PKAc, p38-MAPK, Fyn y ATM (18) y la generación de ROS (42). Sin embargo, ninguna de estas señales es suficiente por si sola para activar completamente a TonEBP (18,42).

En el trabajo del Dr. Burg, también mencionan que al preincubar con NAC y luego someter las células renales a hiperosmolaridad, TonEBP no se transloca al núcleo (42), lo que concuerda con los resultados encontrados en esta tesis en la Figura 8.

Es importante mencionar la participación del proteasoma en la regulación de TonEBP, puesto que al inhibir el proteasoma se reduce marcadamente la inducción de genes blancos de TonEBP, como también impide que dicho factor migre hacia el compartimiento nuclear, pero sin afectar su concentración. Además se ha reportado que NAC inhibe al proteosoma (37). Todos estos antecedentes respaldan los resultados encontrados en la Figura 8, puesto que al utilizar NAC TonEBP no se transloca al núcleo, y no afecta su cantidad de proteína, lo que se explicaría con lo expuesto anteriormente, que al usar NAC estaríamos inhibiendo la actividad del proteasoma y esto a su vez impide la translocación de TonEBP. Otra posible explicación podría ser que TonEBP estuviera retenido en el citoplasma por alguna proteína que necesitara ser degradada por el proteasoma para soltar a TonEBP, por lo tanto si el proteasoma esta inhibido, esa proteína sigue reteniendo a TonEBP, ya que no se esta degradando y así TonEBP permanece en el citoplasma y no se transloca al núcleo, debido a la inhibición del proteasoma.

#### **6.4. Papel del calcio en la distribución subcelular de TonEBP en cardiomiocitos neonatos**

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el estrés hiperosmótico inducido por sorbitol (600 mOsm) activa diferentes señales moleculares entre las que se encuentran p38-MAPK y ERK (11), además de incrementar el calcio intracelular (17). Por esto, se procedió a estudiar el efecto del calcio en la distribución subcelular de TonEBP. Los resultados mostrados en la Figura 6 indican que tanto el calcio externo como el interno, no son necesarios para la redistribución subcelular de TonEBP, puesto que al preincubar los cardiomiocitos con quelantes de calcio, se observa de todos modos la translocación de TonEBP al núcleo luego de estimular con Sorbitol 600 mOsm.

La ausencia de participación del calcio en la translocación nuclear de TonEBP, posiblemente se deba a que TonEBP (NFAT-5), a diferencia de los otros miembros de la familia NFAT, no posee la secuencia de homología a proteínas NFAT (NHR), a la cual se une la calcineurina (enzima dependiente de calcio) que al desfosforilar los NFATs permite su translocación al núcleo (14,16).

#### **6.5. Regulación de TonEBP por estrés hiperosmótico en cardiomiocitos adultos**

Diversos trabajos han involucrado al factor transcripcional TonEBP como un importante mediador del desarrollo embrionario temprano (29). En la etapa adulta, se encuentra abundantemente en el corazón, cerebro, hígado, riñón y otros órganos (27). También hay evidencias que indican que su presencia es mucho más abundante en tejidos embrionarios que en tejidos adultos, lo que sugiere que TonEBP tendría un importante papel en el desarrollo (14).

Otra evidencia con respecto a la importancia de TonEBP en el desarrollo, la aporta el grupo del Dr. López-Rodríguez, los cuales generaron un ratón NFAT-5<sup>-/-</sup>, y demostraron que este ratón tuvo un crecimiento mucho menor que el ratón normal,

además de presentar una atrofia y disminución del tamaño renal. En este trabajo también se demostró que los genes blancos de TonEBP, AR, BGT1 SMIT y TauT, pierden su expresión en la células renales derivadas del ratón NFAT5<sup>-/-</sup> (25). Todos estos antecedentes sugieren un papel vital de TonEBP en el desarrollo y crecimiento, por esto se procedió a estudiar la distribución y comportamiento de TonEBP en cardiomiocitos de ratas adultas frente a la hiperosmolaridad.

La Figura 13 muestra que en condiciones isotónicas, TonEBP está presente en cardiomiocitos adultos, pero la distribución subcelular de TonEBP en dichas células es muy distinta a la encontrada en los cardiomiocitos neonatos.

En los cardiomiocitos de rata adulta, TonEBP se encuentra preferentemente en la periferia de la célula, pero al estimularlos con Sorbitol 450 mOsm, TonEBP se transloca al núcleo, lo que indica que dicho factor responde a hiperosmolaridad también en esta etapa del desarrollo. Además se estudió su gen blanco AR en este tipo celular donde se encontró la misma distribución que para TonEBP, es decir, en condiciones isotónicas se encuentra preferentemente en la periferia celular, pero una vez que las células se estimulan con sorbitol 450 mOSm se distribuye en toda la célula (Figura 14).

No hay reportes hasta la fecha que describan una distribución subcelular periférica de TonEBP, como la que se encontró en cardiomiocitos de ratas adultas, por lo que este trabajo abre nuevas ramas de estudio para este factor en este tipo celular. Resulta interesante estudiar la posibilidad que TonEBP forme complejos con otras proteínas que se encuentren en la periferia , o bien como interacciona con AR puesto que esta proteína se encontró de igual forma que TonEBP en la periferia de cardiomiocitos adultos.

## 7. Conclusiones

- TonEBP y aldosa reductasa están presentes en cardiomiocitos de ratas neonatas y adultas.
- La hiperosmolaridad estimula la translocación de TonEBP al núcleo en cardiomiocitos de ratas neonatas y adultas.
- Los aumentos en osmolaridad externa incrementan significativamente las cantidades de proteína de TonEBP en cardiomiocitos neonatos.
- La hiposmolaridad no estimula la translocación de TonEBP al núcleo y disminuye significativamente su cantidad de proteína en cardiomiocitos neonatos.
- La translocación nuclear de TonEBP es independiente de los aumentos de calcio detectados en los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos expuestos a estrés hiperosmótico.
- Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se requieren para la translocación de TonEBP al núcleo pero no para su inducción en cardiomiocitos neonatos.
- La actividad y cantidades de proteína de AR aumentan en respuesta a hiperosmolaridad en los cardiomiocitos neonatos. A diferencia la hiperosmolaridad no modificó ambos parámetros.

## 8. Bibliografía

1. 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. *Mol Brain Res.* **77**:10-18, 2000
2. Burg MB, Kwon ED, Kültz D. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol.* **59**:437-455, 1997
3. 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.* **12**: 2221-2230, 2001
4. Chen L, Glover JNM, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, fos and jun bound specifically to DNA. *Nature.* **392**: 42-48, 1998
5. Chien, KR. Knowlton, KU. Zhu, H. Chien, S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative physiologic response. *FASEB J.* **5**:3037-3046, 1991
6. Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol* **280**: C248-C253, 2001.
7. Dmitrieva NI, Burg M. Hypertonic Stress Response. *Mutation Res* **569**: 65-74, 2005.
8. Ferraris JD, Peresaud 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.* **99**: 16800-16805, 2002
9. Foncea, R. Andersson, M. Ketterman, A. Blakesley, V. Sapag-Hagar, M. Sugden, P. Lee Roith, D. Lavandero, S. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **31**:19115-19124, 1997



10. Gálvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Díaz-Araya G, Lavandero S. A rapid strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* **304**: 279-285, 2001.
11. Gálvez A, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem*. **278**: 38484-38494, 2003
12. García-Perez A, Martín B, Murphy HR, Uchida S, Murer H, Cowley BD, Handler J, Burg MB. Molecular cloning of cDNA coding for kidney aldose reductase. Regulation of specific mRNA accumulation by NaCl-mediated osmotic stress. *J Biol Chem* **264**, 16815-16821, 1989
13. 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 beta-cells by causing a redox imbalance. *J Biochem*. **126**: 41-47, 1999
14. Handler JS, Kwon HM. Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int*. **60**: 408-411, 2001
15. Ho SN. The role of NFAT5/TonEBP in establishing an optimal intracellular environment. *Arch Biochem Biophys*. **413**: 151-157, 2003
16. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Develop* **17**: 2205-2232, 2003.
17. Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Díaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S. Insulin-like growth factor induces an inositol 1,4,5-triphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* **279**:7557-7565,2004.
18. Irrázabal 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 USA* **101**:8809-8814, 2004
19. Jäckle T, Hasel C, Melzner I, Brüderlein S, Jehle P, Möller P. Sustained hyposmotic stress induces cell death: apoptosis by defeat. *Am J Physiol*. **281**: C1716-C1726, 2001

20. Kang, PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: a critical review of the literature. *Circ Res* **86**:1107-1113, 2000.
21. Ko BCB, Lam AKM, Kapus A, Fan L, Chung SK, Chung SSM. 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 Cell*. **277**: 46085-46092, 2002.
22. Kültz D, Madani S, Burg M. Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J Biol Cell*.**273**:13647-13651, 1998
23. Kunsch C, Medford R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*. **85**: 753-766, 1999.
24. Lee SD, Woo SK, Kwon HM. Dimerization is required for phosphorylation and DNA binding of TonEBP/NFAT5. *Biochem Biophys Res Commun*. **294**: 968-975, 2002
25. López Rodríguez C, Antos C, Shelton J, Richardson J, Lin F, Novobrantseva T, Bronson R, Igarashi P, Rao A, Olson E. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2392-2397, 2004.
26. López-Rodríguez 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*. **96**: 7214-7219, 1999.
27. Maouyo D, Kim JY, Lee D, Wu Y, Woo SK, Kwon HM. Mouse TonEBP-NFAT5: Expression in early development and alternative splicing. *Am J Physiol* **282**: F802-F809, 2002
28. Morales MP, Gálvez A, Eltit JM, Ocaranza P, Díaz-Araya G, Lavandero S. IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem Biophys Res Comm* **270**: 1029-1035, 2000.
29. Na KI, Woo SK, DoLee S, Kwon HM. Silencing of ToneBP/NFAT5 transcriptional activator by RNA interference. *J Am Soc Nephrol* **14**: 283-288, 2003.

30. 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* **532**: 3-16, 2001.
31. Petrash JM, Ansari NH, Sadana I, Srivastava SK. Biochemical and genetic interrelationship between aldose reductase, aldose reductase M and aldehyde reductase in human tissues. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* **33**: 52A, 1981
32. Ramasamy R, Trueblood N, Schaefer S. Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* **275**: H195-H203, 1998
33. Rauchman MI, Pullman J, Gullans SR. Induction of molecular chaperones by hyperosmotic stress in mouse inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol.* **273**: F9-F17, 1997
34. Ruef J, Liu SQ, Bode C, Tocchi M, Srivastava S, Runge MS, Bhatnager A. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 1745-1752, 2000.
35. Weber, KT, Brilla, CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation* **83**: 1849-1865, 1991.
36. Woo S, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol* **278**: F1006-F1012, 2000.
37. Woo SK, Maouyo D, Handler J, Kwon H. Nuclear Distribution of Tonicity-responsive enhancer binding protein requires proteasome activity. *Am J Physiol* **278**:C323-C330, 2000.
38. Woo SK, Nahm O, Kwon HM. How Salt Regulates Genes: Function of a rellike transcription factor TonEBP. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 269-271, 2000.
39. Xiao L, Pimental D, Wang J, Singh K, Colussi W, Sawyer D. Role of reactive oxygen species and nad(p)h oxidase in  $\alpha$ 1-adrenoreceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* **282**: C26-C34, 2002.
40. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.***217**:1214-1222, 1982

41. 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* **285**: F688-F639, 2003
42. Zhou X, Ferraris JD, Cai Q, Agarwarl A, Burg M. Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor, TonEBP/OREBP. *Am J Physiol.* **289**: F377-F385, 2005