



ÍNDICE GENERAL
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula



ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA REGULACIÓN DE VOLUMEN Y MUERTE DEL CARDIOMIOCITO ACTIVADA POR ESTRÉS HIPOSMÓTICO

Directores de tesis:

Dr. Sergio Lavandero G.
Mario Chiong L.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, FONDAP CEMC,
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de
Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Sergio Lavandero G.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, FONDAP CEMC,
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de
Chile

Memoria para optar al título de Bioquímico

JESSICA ALEJANDRA DÍAZ ELIZONDO

Santiago, 2005

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
SUMMARY	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Estrés hiposmótico en el cardiomiocito.....	12
1.2. Estrés oxidativo en el cardiomiocito.....	13
1.3. Especies reactivas derivadas del Oxígeno (ROS).....	14
1.4. Mecanismos de regulación del volumen celular.....	16
1.5. Mecanismos de muerte por necrosis.....	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Reactivos.....	21
5.2. Modelo animal.....	21
5.3. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata.....	21
5.4. Modelo experimental de inducción de estrés hiposmótico.....	22
5.5. Determinación del volumen celular.....	22
5.6. Tratamiento adenoviral.....	23
5.7. Tratamiento con antioxidantes e inhibidores específicos.....	24
5.8. Preparación de extractos celulares totales.....	24
5.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	24
5.10. Electrotransferencia de proteínas.....	24
5.11. Western blot.....	25
5.12. Determinación de los niveles totales de GSH.....	26
5.13. Determinación de especies reactivas de oxígeno por espectrofluorometría.....	26
5.14. Determinación de ROS por Resonancia electrónica del espín (ESR).....	27
5.15. Viabilidad celular.....	27

5.16.	Análisis estadístico.....	28
6.	RESULTADOS.....	29
6.1.	Efecto del estrés hiposmótico sobre el volumen del cardiomiocito.....	29
6.1.1.	Determinación del volumen celular por microscopia confocal en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	29
6.1.2.	Determinación de la disminución regulada de volumen (RVD) en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	31
6.1.3.	Determinación del efecto de DMPO sobre el volumen del cardiomiocito.....	33
6.2.	Efecto del estrés hiposmótico en la generación de ROS en cardiomiocitos..	34
6.2.1.	Determinación de ROS por espectrofluorimetría.....	34
6.2.2.	Determinación de ROS por ESR.....	36
6.3.	Efecto del estrés hiposmótico sobre los niveles totales de GSH.....	38
6.4.	Origen de los ROS por acción del estrés hiposmótico en cultivos de cardiomiocitos.....	40
6.4.1.	Determinación por espectrofluorimetría.....	40
6.4.2.	Determinación por ESR.....	42
6.5.	Efecto del estrés hiposmótico sobre la viabilidad del cardiomiocito.....	47
6.5.1.	Determinación de la viabilidad celular.....	47
6.5.2.	Efecto del estrés hiposmótico sobre los niveles de caspasas 9 y 3 en cultivos de cardiomiocitos.....	49
6.5.3.	Efecto del AdCAT sobre la viabilidad en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	50
6.6.	Efecto de ROS sobre la disminución regulada de volumen en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	51
7.	DISCUSIÓN.....	53
7.1.	Estrés hiposmótico y cambios de volumen.....	54
7.2.	Estrés hiposmótico y generación de ROS.....	55
7.3.	Estrés hiposmótico y muerte del cardiomiocito.....	57

7.4.	Radicales libres y muerte del cardiomiocito.....	58
8.	CONCLUSIONES	59
9.	BIBLIOGRAFÍA	61

ANEXO 1. Determinación del volumen celular: curva de calibración de cambio de volumen (V_T/V_0) vs osmolaridades (π_0/π_T).....	67
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Potenciales fuentes y blancos moleculares de ROS.....	14
Figura 2: Mecanismo iónico para RVD y RVI bajo condiciones fisiológicas como también para AVD y NVI bajo condiciones fisiopatológicas.....	18
Figura 3: Determinación del volumen celular en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	30
Figura 4: Cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico no presentan RVD.....	32
Figura 5: Efecto del atrapador DMPO en el volumen de cardiomiocitos.....	33
Figura 6: Niveles de ROS en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico....	35
Figura 7: Determinación de ROS por ESR en cultivos de cardiomiocitos.....	37
Figura 8: Niveles de GSH total en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	39
Figura 9: Efecto de apocinina, rotenona, alopurinol, DPI, NAC y BAPTA En la generación de ROS en cultivos expuestos a estrés hiposmótico.....	41
Figura 10: Efecto de distintos inhibidores de ROS sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico (248 mOsm).....	43
Figura 11: Efecto de distintos inhibidores de ROS sobre los niveles del radical Hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico (202mOsm).....	44
Figura 12: Efecto de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes mediante transducción adenoviral sobre los niveles del radical hidroxilo	

	en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	45
Figura 13:	Efecto de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes mediante transducción adenoviral sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	45
Figura 14:	Efecto del estrés hiposmótico sobre la viabilidad en cultivos de cardiomiocitos.....	48
Figura 15:	Niveles de procaspasas y caspasas 9 y 3 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	49
Figura 16.	Efecto de la inhibición de ROS sobre la viabilidad en cultivos de Cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	50
Figura 17.	Efecto de ROS en el cambio de volumen frente a estrés hiposmótico.....	52
Figura 18:	Resumen de los eventos inducidos por estrés hiposmótico en el cardiomiocito	60
Figura 19:	Curva de calibración en cardiomiocitos.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Página	
Tabla 1:	Efectos de distintos inhibidores sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	43
Tabla 2:	efectos de distintos inhibidores sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	44
Tabla 3:	efecto de distintos adenovirus sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.....	46

ABREVIATURAS

AdCAT	: Adenovirus catalasa
AdLacZ	: Adenovirus LacZ
AdGPx	: Adenovirus glutatión peroxidasa
AdSOD1	: Adenovirus superóxido dismutasa 1
AdSOD2	: Adenovirus superóxido dismutasa 2
ADP	: Adenosin difosfato
APS	: Persulfato de amonio
ATP	: Adenosin trifosfato
BAPTA	: Bis-o-aminofenoxietano-. N,N,N,N-tetra- acido acético
β -GAL	: β -Galactosidasa
BrdU	: Bromo deoxiuridina
Ca ²⁺ _i	: Calcio intracelular
cél	: Célula
Cl ⁻	: Cloruro
cm	: Centímetro
DCF-DA	: Diclorofluoresceína di acetato
DMPO	: 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DPI	: Difenileneiodonio
DNA	: Acido desoxirribonucleico
DTT	: Ditiotreitól
DTNB	: Acido 5,5'-ditio (2-nitrobenzoico)
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
em	: Emisión
ESR	: Resonancia electrónica del espín
ERK	: Proteína kinasa regulada extracelularmente
ex	: Excitación
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero fetal de cabra
F0	: Fluorescencia basal
FT	: Fluorescencia total
GSH	: Glutatión reducido
GSSG	: Glutatión oxidado
GR	: Glutatión reductasa
h	: Hora
Hank's	: Solución salina balanceada
H ₂ O ₂	: Peróxido de hidrógeno
JNK	: Kinasa N-terminal de <i>c-Jun</i>
K ⁺	: Potasio
kDa	: Kilo dalton
min	: Minuto

mg	: Miligramo
ml	: Mililitro
mM	: Milimolar
mm	: Milímetro
MOI	: Multiplicidad de infección
mOsm	: Miliosmolar
Na ⁺	: Sodio
NAC	: <i>N</i> -acetil-L-cisteína
NaCl	: Cloruro de Sodio
NADPH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
NaOH	: Hidroxido de sodio
nm	: nanómetros
nmoles	: nanomoles
NOS	: Especies reactivas del nitrógeno
NVI	: Aumento del volumen necrótico
OH [•]	: Radical hidroxilo
p38MAPK	: Proteína quinasa de 38 KDa activada por mitógenos
PBS	: Tampón fosfato salino
PKB	: Proteína quinasa B
PMSF	: <i>p</i> -fenilmetilsulfonilfluoruro
p/v	: Porcentaje peso volumen
ROS	: Especies reactivas del Oxígeno
rpm	: Revoluciones por minuto
RVI	: Aumento regulado de volumen
RVD	: Disminución regulada de volumen
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	: Error estándar de la media
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloro acético
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
v/v	: Porcentaje volumen volumen
V0	: Volumen basal
VT	: Volumen total
U	: Unidad enzimática
µg	: Microgramo
µl	: Microlitro
µM	: Micromolar
µm	: Micrómetro
π0	: Isosmolaridad
πT	: Osmolaridad

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares isquémicas son una de las principales causas de muerte en Chile. En estas patologías, los cardiomiocitos están expuestos a privación de nutrientes, hipoxia y estrés osmótico. Nuestro laboratorio ha estudiado el efecto del estrés hiperosmótico sobre el cardiomiocito. Sin embargo se desconocen las consecuencias del estrés hiposmótico ya que a diferencia de otros tipos celulares, las células cardíacas no están expuestas fisiológicamente a grandes fluctuaciones en la osmolaridad externa. Durante los procesos de isquemia y reperfusión, los cardiomiocitos se exponen a estrés oxidativo, desbalance redox intracelular e hiposmolaridad, pudiendo ser las consecuencias de esta última muy severas para el corazón, debido a los cambios electrofisiológicos que acompañan al hinchamiento celular. Este aumento del volumen celular es especialmente marcado durante la reperfusión, evento indispensable para reestablecer la irrigación sanguínea y rescatar al miocardio.

Esta memoria estudió el efecto de las especies reactivas de oxígeno en la regulación del volumen y muerte activada por estrés hiposmótico en cardiomiocitos.

Nuestros resultados a través de calceína-AM y microscopia confocal, muestran que cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas expuestos a estrés hiposmótico con soluciones 248 ó 202 mOsm (medio de cultivo diluido 15% y 30% con agua), aumentaron su volumen en un 40 y 60%, respectivamente. Estas células no presentaron disminución regulada de volumen (RVD) espontáneamente, ni en presencia de gramicidina (inductor de RVD). El estrés hiposmótico generó especies reactivas del oxígeno (ROS), evaluada por diclorofluoresceína, siendo el radical hidroxilo la principal especie radicalaria detectada por resonancia de espín electrónico (ESR), usando el atrapador 5,5-dimetilpirrolina 1-óxido. El origen de ROS se determinó observando el efecto de apocinina (inhibidor NADPH oxidasa), rotenona (inhibidor

mitocondria), alopurinol (inhibidor xantino oxidasa) y N-acetil-cisteína sobre la oxidación de diclorofluoresceína (DCF-DA). Los resultados muestran que sólo apocinina inhibió la generación de ROS dependiente del estrés hiposmótico. Mediante ESR y células transducidas con AdCAT (catalasa), AdSOD1 (superóxido dismutasa citosólica), AdSOD2 (superóxido dismutasa mitocondrial) y AdGPx (glutatión peroxidasa) se identificó a NADPH oxidasa como principal fuente de las ROS. Por otra parte, su generación también se asoció a una disminución en el nivel total de GSH desde los 60 min post-estímulo, siendo significativo a las 4 h, para 202 mOsm. El estrés hiposmótico disminuyó la viabilidad de los cardiomiocitos, determinada por azul de tripán, a las 6 h en un 45 y 40% según el nivel de hiposmolaridad. A diferencia del estrés hiperosmótico no se detectó activación de las caspasas 9 y 3, sugiriendo la existencia de una muerte independiente de caspasas. Dado que no se evaluaron otros parámetros de muerte, aún se desconoce la participación de necrosis o autofagia en la muerte de los cardiomiocitos activada por estrés hiposmótico. La viabilidad celular se recuperó en células transducidas con AdCAT y expuestas a estrés hiposmótico. Además en estas células hubo un RVD parcial.

En conclusión, los resultados indican que el estrés hiposmótico aumenta el volumen del cardiomiocito, siendo NADPH oxidasa una de las principales fuentes en la generación de ROS. Estos últimos inhiben el mecanismo de RVD y median la muerte celular estimulada por el estrés hiposmótico.

SUMMARY

Reactive oxygen species in the regulation of cardiomyocyte volume and death activated by hyposmotic stress

Ischemic cardiovascular diseases are the main cause of death in Chile. In these diseases cardiomyocytes are exposed to nutrient deprivation, hypoxia and osmotic stress. Our laboratory has studied the effect of hyperosmotic stress on cardiomyocytes, but little is known about the consequences of hyposmotic stress. Unlike other cell types, cardiac cells are not physiologically exposed to large changes in the extracellular osmolarity. During ischemia and reperfusion, cardiomyocytes are exposed to oxidative stress, redox imbalance and hyposmolarity, with severe consequences for heart because electrophysiological changes associated to cell swelling. This increase in cell volume is more severe during reperfusion, event which is indispensable to reestablish blood irrigation for rescuing the myocardium.

In this memory, the effect of reactive oxygen species in the regulation of cardiomyocyte volume and death induced by hyposmotic stress was studied.

Using calcein-AM and confocal microscopy in primary culture of cardiomyocytes from new born rats exposed to 248 and 202mOsm (culture medium diluted 15% and 30% with water), we showed that cardiomyocytes increased their volume in 40% and 60%, respectively. These cells did not spontaneously present regulation volume decrease (RVD), even in the presence of gramicidin (RVD inductor). Generation of reactive oxygen species (ROS) by hyposmotic stress was detected by dichlorofluorescein (DCF-DA). Using electron spin resonance (ESR) and 5,5-dimethyl-1-pyrroline-oxide as spin trap, we detected that hyposmotic stress induced the production of hydroxyl radical in cardiomyocytes. The source of ROS was assessed using chemical inhibitors such as apocynin (NADPH oxidase inhibitor), rotenone (mitochondrial inhibitor), allopurinol (xanthine oxidase inhibitor) and N-acetyl-cysteine. Only apocynin blocked ROS induced by hyposmotic stress. Adenoviral transduction

with AdCAT (catalase), AdSOD1 (cytosolic superoxide dismutase), AdSOD2 (mitochondrial superoxide dismutase) and AdGPx (glutathione peroxidase) together with the detection of hydroxyl radical by ESR revealed that NADPH oxidase is the responsible for ROS production ($O_2^{\cdot-}$). ROS generation by hyposmotic stress (202 mOsm) was associated to a decrease in GSH total level, which became significant at 4 h post-stimulus. Hyposmotic stress produced a decrease on cardiomyocyte viability in 45% and 40% at 6 h when 248 and 202 mOsm were used, respectively. Unlike hyperosmotic stress, hyposmotic stress did not activate caspases 9 and 3, suggesting the occurrence of a caspase-independent cell death. Because other parameters were not evaluated, the death of cardiomyocytes by necrosis or autophagy could not be discarded. AdCAT reduced cardiomyocyte death induced by hyposmotic stress. In addition, in these cells a partial RVD was observed.

In conclusion, the results indicate that hyposmotic stress increases the cardiomyocyte volume, and suggest the participation of NADPH oxidase as the main source of ROS, particularly hydroxyl radical, which is involved in the cell death mechanism through the inhibition of RVD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrés hiposmótico en el cardiomiocito

Las cardiomiopatías son enfermedades del músculo cardíaco en las que existe disfunción contráctil y en su conjunto representan hoy en día el principal problema de salud en nuestra sociedad. En estas patologías los cardiomiocitos, responsables de la contractibilidad del corazón, están expuestos a privación de nutrientes, hipoxia y estrés osmótico (Wright and Rees, 1998).

Aunque la osmolaridad del medio extracelular se mantiene normalmente dentro de rangos muy estrechos, hay estados patológicos asociados a isquemia-reperusión en los que se generan cambios osmóticos locales. Se ha descrito que las células cardíacas se someten a estrés osmótico en los procesos isquémicos derivados de cuadros anginosos, infarto al miocardio y en la insuficiencia cardíaca (Wright and Rees, 1998). El aumento del volumen celular inducido por depleción de ATP (ATP en ADP y fosfato) así como inhibición de reacciones oxidativas, es agravada por aumento de reacciones glicolíticas que llevan a la acumulación de metabolitos de la glicolisis tal como lactato y a una acidificación intracelular, condición conocida como lactosidosis, el lactato entra vía transportadores de monocarboxilato H^+ -lactato $^-$, causando que la célula experimente un aumento de su volumen (Wright and Rees, 1998; Okada, 2001). Esta situación se exagera cuando este órgano se reperfunde y el medio extracelular hiperosmótico es reemplazado por sangre normosmótica (Wright and Rees, 1998).

El estrés osmótico puede tener efectos significativos sobre el crecimiento celular. Se ha establecido un vínculo entre proliferación celular y quinasas asociadas a estrés, y entre esas quinasas y cambios osmóticos en células de colon (Caco2) (Gatsios *et al.*, 1998; Kültz & Burg, 1998; Koyama *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2002). En estas células, la hiposmolaridad causa una catástrofe global del ciclo celular, sugiriéndose que el estrés detiene primariamente la proliferación y activa luego la muerte vía apoptosis (Kültz & Burg, 1998; Tao *et al.*, 2002). Por otra parte se ha visto tanto en cultivo de células A6

como en queratinocitos humanos, que el estrés hiposmótico activa las vías ERK 1/2, p38, SAPK/JNK y PKB/Akt, con una sugerente participación de p38 en la regulación del volumen celular de A6 sometidas a estrés hiposmótico (Chiri *et al.*, 2004) y con una rápida activación de estas vías en queratinocitos. Además se ha visto que el estrés hiposmótico produce cambios morfológicos, jugando un rol en la mediación del crecimiento y muerte de cardiomiocitos (Xiao *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2003; Kippenberger *et al.*, 2004). El estrés hiposmótico gatilla la muerte por apoptosis de las células de músculo liso de arteria coronaria humana (VSMC), observándose variaciones individuales en su velocidad y extensión, además de estimular la expresión transitoria de CD95L y CD95, uno de los principales receptores de muerte y de la activación de diversas caspasas (Jäckle *et al.*, 2001).

1.2. Estrés oxidativo en el cardiomiocito

Otro tipo de estrés que conduce a muerte celular es el estrés oxidativo. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) son reguladores críticos de cascadas de señalización intracelular, en particular fuentes de ROS pueden activar la vía ERK 1/2 y aumentar la expresión de proto-oncogenes, tales como c-myc y c-fos.

Los mecanismos descritos por los cuales ROS puede dañar al músculo cardiaco son múltiples y se han visto inducidos tanto procesos de necrosis como apoptosis. El aumento de ROS en cardiomiocitos de corazones expuestos a hiperglicemia lleva a la apoptosis (Shizukuda and Buttrick, 2002). En nuestro laboratorio se ha encontrado que un rápido y fuerte proceso apoptótico es gatillado por un estrés hiperosmótico (Gálvez *et al.*, 2001). Estudios posteriores han involucrado la generación de ROS como intermediarios de este fenómeno que lleva finalmente a la apoptosis (Shizukuda and Buttrick, 2002; Gálvez *et al.*, 2003). Sin embargo, los estudios realizados en células de musculatura lisa vascular (VSMC) muestran que la generación de ROS intracelularmente, es necesaria para la supervivencia de estas, ya que la supresión de H₂O₂ endógeno intracelular, a través de la sobreexpresión de catalasa o tratamiento con antioxidantes permeables a la membrana, no sólo inhibe la proliferación sino que también promueven la apoptosis. En cambio, el ataque de ROS exógenos lleva a la muerte celular de las VSMC. Más aún, dependiendo de la especie de ROS involucrada

será el destino final de la célula, donde el anion superóxido resulta en crecimiento celular mientras que H₂O₂ lleva a la muerte (Irani, 2000). Por estos antecedentes cabe destacar que la generación de ROS, puede llevar finalmente a distintas respuestas celulares, incluso tan opuestas como muerte o sobrevida, todo dependerá de los distintos blancos de ROS que se vean involucrados (figura 1), del tipo celular en estudio y de la especie de ROS generada.

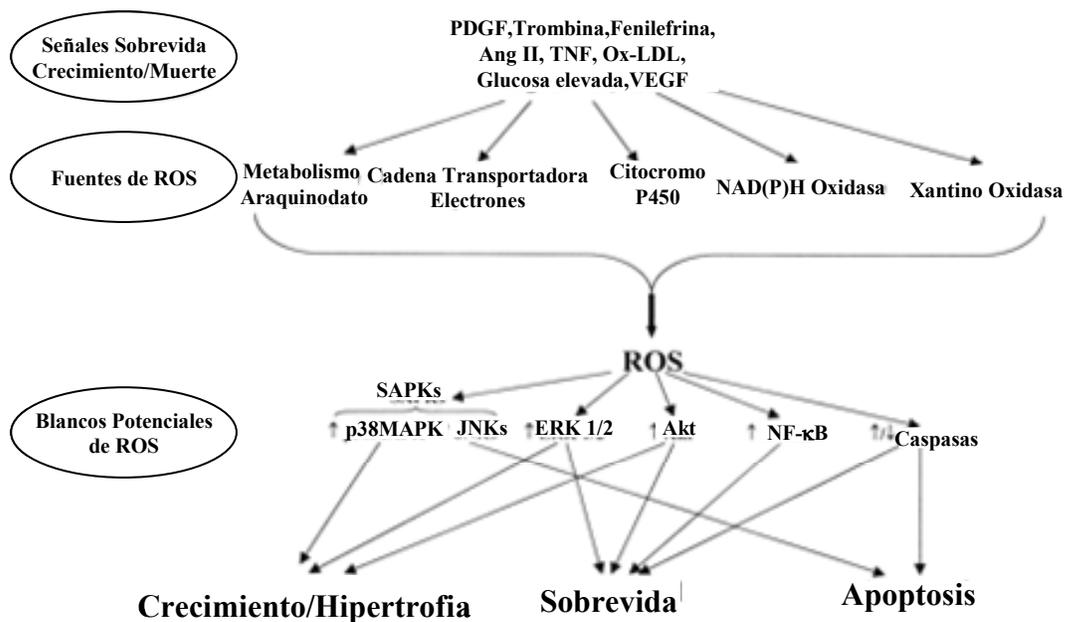


Figura 1. Potenciales fuentes y blancos moleculares de ROS en el crecimiento, apoptosis y sobrevida de las células musculares lisas y endoteliales.

1.3. Especies reactivas derivadas del Oxígeno (ROS)

Los ROS incluyen los radicales libres superóxido (O₂⁻) e hidroxilo (OH[•]) y especies no radicalarias como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e hipoclorito (HOCl). Los ROS son productos altamente tóxicos del metabolismo aeróbico, reaccionan desfavorablemente con las macromoléculas de su entorno, resultando en severo daño tisular y celular, siendo el oxígeno molecular la principal fuente de formación de radicales libres en el medio intra y extracelular (Kumar & Bodh, 2003).

Existen varios sistemas de producción de ROS que incluyen la NADPH oxidasa (Xiao *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2003), la cadena transportadora de electrones, la

xantino oxidasa, la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa (Xiao *et al.*, 2002). La mitocondria es una fuente importante del ROS intracelular y se ha implicado en la activación de vías de señales en cardiomiocitos (Xiao *et al.*, 2002). El estrés hiposmótico produce cambios en su masa y potencial de membrana (Jäckle *et al.*, 2001). También se ha encontrado liberación del citocromo C (importante cofactor en el estrés que induce suicidio programado), asociado con el cambio de permeabilidad mitocondrial (Jäckle *et al.*, 2001). Otras posibles fuentes generadoras de oxidantes en corazones isquémicos, incluyen fosfolipasas, la autooxidación de catecolaminas, neutrofilos, citoquinas y la cascada inflamatoria. La xantino oxidasa, una de estas fuentes alternativas, se encuentra en las células endoteliales y podrían contribuir a la producción de oxidantes en los corazones intactos, pero hay escasa evidencia de su presencia en el cardiomiocito. La NOS es otra fuente potencial de oxidantes que se expresa en el cardiomiocito y bajo ciertas condiciones genera superóxido. Sin embargo, durante la isquemia y antes de la reperfusión no hay un aumento significativo de superóxido vía NOS en los cardiomiocitos, sino principalmente vía mitocondria (Becker *et al.*, 1999).

La NADPH oxidasa, una importante fuente de superóxido citosólico, es un complejo enzimático asociado a la membrana, compuesto al menos, de cuatro subunidades, incluyendo dos unidas a membrana p22^{phox} y gp91^{phox} y dos citosólicas p47^{phox} y p67^{phox}. El requisito fundamental para la activación de esta enzima es la translocación del complejo citosólico, la que se produce previa fosforilación de su subunidad p47 (Vignais, 2002). El aumento posterior en los niveles de ácido araquidónico (observado en fagocitos), serviría como cofactor para el ensamblaje del complejo en la membrana (Dana *et al.*, 1998). Este aumento en los niveles de ácido araquidónico por activación de iPLA₂ (fosfolipasa A₂ independiente de Ca²⁺) también se ha detectado en células NIH3T3 expuestas a medio hipotónico (Lambert, 2003). La NADPH oxidasa se descubrió inicialmente en fagocitos y es responsable de la generación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Hace sólo un par de años se estableció su presencia en los cardiomiocitos (Xiao *et al.*, 2002).

Recientemente Varela *et al.* (2004) han descrito que la NADPH oxidasa de células HTC y HeLa es activada por hipotonicidad y responsable de la generación de ROS.

Debido a que los ROS son altamente reactivos sobre biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las células eucariontes disponen de una gran variedad de enzimas antioxidantes para contrarrestar los ROS generados durante el normal metabolismo celular y/o varios procesos patológicos. Entre éstas destacan la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del anión superóxido a H_2O_2 y O_2 . El H_2O_2 que es aún dañino para la célula, es descompuesto posteriormente a agua por la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx). En la reacción catalizada por GPx, glutatión (GSH), un elemento central en la defensa celular antioxidante (Inserte *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003), se oxida a GSSG, el cual puede ser reducido a GSH nuevamente por la glutatión reductasa (GR). Así las acciones coordinadas de varios sistemas antioxidantes son críticas para una efectiva detoxificación de ROS (Cao *et al.*, 2003). Las investigaciones realizadas por Inserte *et al.* (2000) indican que el grado de apoptosis en respuesta a H_2O_2 , está relacionado con los niveles intracelulares de GSH después de un proceso isquémico.

A pesar de que las células cuentan con un eficiente sistema de defensa antioxidante (SOD, catalasa y GPx), las concentraciones intracelulares de ROS aumentan en células NIH3T3 expuestas a hipotonicidad (Lambert, 2003).

1.4. Mecanismos de regulación del volumen celular

Con sólo pocas excepciones, las membranas de las células animales son altamente permeables al agua. Dado que estas membranas no toleran substancialmente los gradientes de presión hidrostática, el movimiento del agua a través de ellas está, en gran parte, dictado por gradientes de presión osmótica. Así un desbalance entre las osmolaridades intra y extracelulares se acompaña de movimiento de agua a través de la membrana celular y de la consiguiente alteración del volumen celular (Lang *et al.*, 1998).

En condiciones de isosmolaridad externa, la constancia del volumen celular depende de cambios en la osmolaridad al interior de las células producidas por la generación o movilización de sustancias osmóticamente activas (Lang *et al.*, 1998).

Cuando las células son expuestas a un medio extracelular hipotónico, ellas inicialmente se hinchan pero luego tienden a recuperar su volumen original por un mecanismo denominado “disminución regulada de volumen”(RVD). En cambio, las células expuestas a condiciones de hipertonicidad, experimentan inicialmente un encogimiento que se acompaña luego de una recuperación de su volumen original, gracias al mecanismo de aumento regulado de volumen (RVI). Se ha observado que en las células hinchadas por hipotonicidad, hay expulsión de iones, y salida de osmolitos como sorbitol e inositol y del aminoácido taurina principalmente para activar el RVD (Lang *et al.*, 1998; Wright and Rees, 1998). Además en la mayoría de los tipos celulares el RVD es acompañado principalmente por un eflujo de KCl por activación paralela de los canales de K^+ y Cl^- . Este hinchamiento osmótico resulta en un aumento significativo en la concentración de Ca^{2+} citosólico y así activa canales de K^+ dependientes de la conductancia del Ca^{2+} (Okada *et al.*, 2001).

Otro proceso que también conlleva un aumento del volumen celular es el NVI ó aumento del volumen necrótico, mecanismo que se desencadena cuando un daño celular accidental induce ingesta de Na^+ y liberación de ATP hacia el exterior como también una disipación de ATP por una sobrecarga de trabajo de la bomba de Na^+ . Las condiciones de isquemia e hipoxia producen un aumento del volumen celular con frecuencia por medio de este mecanismo. En contraste a la muerte celular necrótica, el encogimiento celular es el principal marcador de la apoptosis, donde el encogimiento celular apoptótico ocurre en dos distintos estados: la primera fase comienza antes de la fragmentación celular o formación de cuerpos apoptóticos y la segunda fase esta asociada con la fragmentación celular. La fase temprana es llamada disminución de volumen apoptótico (AVD). AVD ocurre bajo condiciones normotónicas sin inducción (o por invalidación) del mecanismo de RVI, presumiblemente por activación de canales regulatorios de volumen de K^+ y/o Cl^- (figura 2) (Okada *et al.*, 2001).

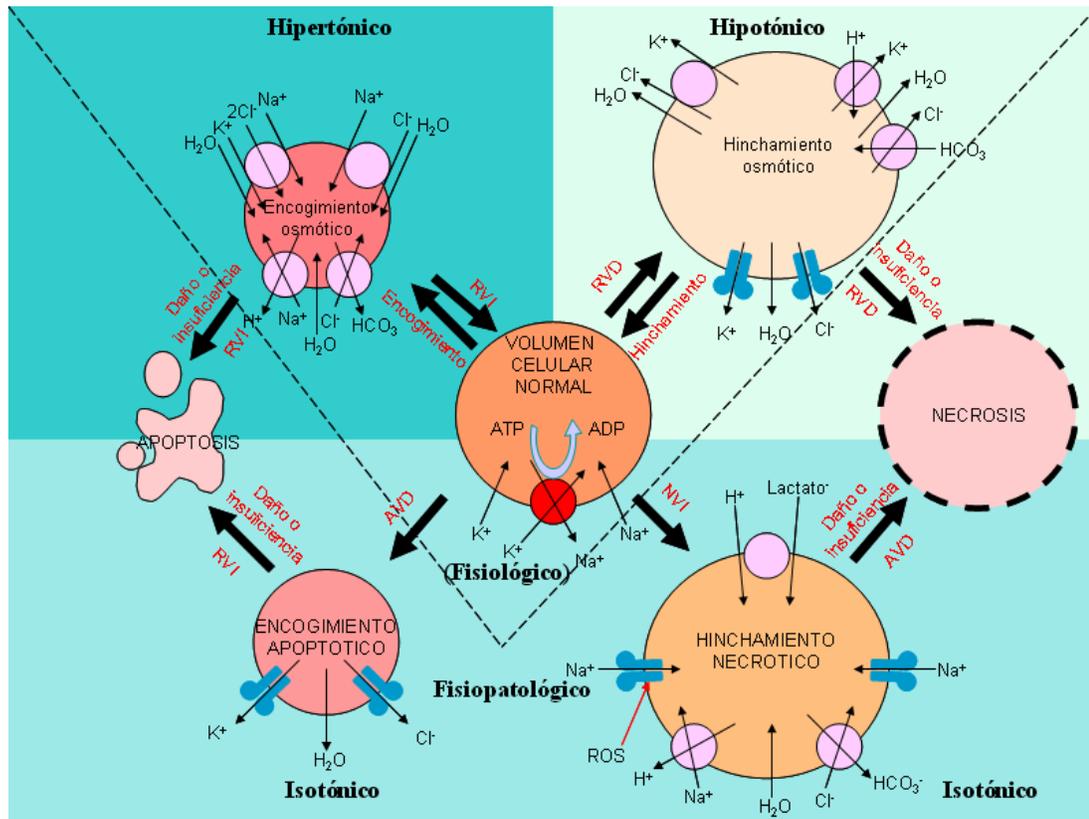


Figura 2. Ilustración esquemática del mecanismo iónico para RVD y RVI bajo condiciones fisiológicas como también para AVD y NVI bajo condiciones fisiopatológicas. La condición balanceada es descrita en el centro de la figura. Tres diferentes mecanismos para RVI y RVD son descritos arriba a la izquierda y arriba a la derecha, respectivamente. El mecanismo de inducción del AVD y NVI están abajo a la izquierda y abajo a la derecha respectivamente. Muerte por apoptosis y necrosis podrían ser gatilladas por persistente recogimiento o hinchamiento celular, como se describe a la izquierda y a la derecha de las células respectivamente.

1.5. Mecanismos de muerte por necrosis

Aunque la apoptosis es una característica del daño al miocardio por isquemia-reperfusión (Taimor *et al*, 1999; Inserte *et al.*, 2000), también se ha detectado muerte por necrosis en la isquemia prolongada. Este aumento de las células necróticas correlaciona con un aumento de la liberación de láctico deshidrogenada (LDH) (Taimor *et al.*, 1999).

La necrosis se activa a consecuencia de un daño celular severo y no es controlada transcripcionalmente. Ella se caracteriza por la pérdida de integridad de la membrana plasmática, seguida por liberación de enzimas y degradación inespecífica del DNA (Taimor *et al.*, 1999). Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la necrosis

también podría ser un tipo de muerte programada que participa de características bioquímicas clásicas de la apoptosis. En neuronas y células gliales expuestas a estrés hiposmótico se observa muerte por necrosis, documentada morfológicamente, con activación temprana de caspasa-3, sugiriendo su participación en la muerte por necrosis (Niquet *et al.*, 2004).

La muerte por necrosis se acompaña de un aumento del volumen celular en parte debido a un aumento a la permeabilidad del Na^+ y de la conducción osmótica del flujo de agua en varios tipos celulares expuestos a estrés oxidativo. En células HTC se ha demostrado que la activación de un canal catiónico no selectivo sensible a Ca^{2+} (NSCC) por el radical hidroxilo está involucrado en la muerte por necrosis. Aunque este canal es igualmente permeable a Na^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ e impermeable a Ca^{2+} , su actividad depende de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Si bien es frecuente encontrar en células normales niveles de Ca^{2+}_i de $450 \mu\text{M}$, las células dañadas exhiben una sobrecarga significativa de Ca^{2+}_i , el cual se relaciona con la muerte celular (Simon *et al.*, 2004).

Por estos motivos resulta interesante y necesario saber sí:

1. El estrés hiposmótico genera ROS
2. El estrés hiposmótico cambia el volumen en el cardiomiocito.
3. Que especie de ROS es la involucrada y su procedencia.
4. La muerte inducida por estrés hiposmótico depende de la generación de ROS.

2. HIPÓTESIS

Basándonos en los antecedentes mencionados, postulamos como hipótesis de esta memoria lo siguiente:

Las especies reactivas de oxígeno median la regulación de volumen y muerte del cardiomiocito activada por estrés hiposmótico.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar *in vitro* si las especies reactivas de oxígeno (ROS) participan en la regulación de volumen y muerte del cardiomiocito activada por estrés hiposmótico.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Cuantificar los cambios de volumen de los cardiomiocitos en cultivo expuestos a estrés hiposmótico y la capacidad de RVD.
- 2.- Determinar y caracterizar la generación de ROS en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.
- 3.- Determinar la asociación entre la generación de ROS dependiente de estrés hiposmótico y la muerte del cardiomiocito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio DME, medio M-199, HANKS, gelatina, pancreatina, Triton X-100, 5-bromo-2-deoxiuridina, *N*-acetil cisteina (NAC), diclorofluoresceína (DCFH-DA), glutatión reductasa, NADPH⁺, NADH, glutatión (GSH), ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) y 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO), Apocinina, Rotenona, Alopurinol, DPI. En Molecular Probes (Eugenia, Oregon EEUU) se adquirió calceína-acetoximetil éster. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirieron colagenasa II, suero fetal de bovino y suero de caballo. Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning) fue adquirido en PerkinElmer Life Sciences, Inc. El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de cardiomiocitos se obtuvieron en Falcon. Los anticuerpos para procaspasa/caspasa-9 y procaspasa/caspasa-3, se adquirieron en Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa se obtuvo en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU).

5.2. Modelo animal

Se utilizaron como modelo de estudio ratas neonatas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

5.3. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones fueron removidos, lavados a 37°C en medio Hank's estéril, desprovistos de sus aurículas y finamente homogeneizados para comenzar con la digestión enzimática que permitió obtener las

células aisladas. Los ciclos de digestión se realizaron en presencia de colagenasa de tipo II y pancreatina. Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos y aprovechando la adhesión diferencial de los diferentes tipos celulares sobre superficies plásticas, el producto de la digestión fue pre-plaqueado en botellas de cultivo de 250 mL durante 2 h en medio DME:M199 (4:1) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, centrifugaron a 1.000 r.p.m durante 5 min y resuspendieron en 21 mL de medio DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó por microscopía usando como colorante azul de tripán para visualizar las células vivas y muertas.

Conocida su concentración, las células se sembraron en DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina, sobre placas de cultivo precubiertas con una monocapa de gelatina (2% p/v) y mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% y 95% de aire.

5.4. Modelo experimental de inducción de estrés hiposmótico

Para inducir estrés hiposmótico los cardiomiocitos se trataron con diluciones del 30% y 15% del medio DME:M199 (4:1) con agua nanopura filtrada, las concentraciones hiposmolares correspondieron a 248±2 mOsm y 202±2 mOsm respectivamente y se determinaron utilizando un microsmómetro Advanced™ 3MO plus. Las soluciones se utilizaron 18 h después de que el cultivo se privara de suero.

5.5. Determinación del volumen celular

Se realizaron determinaciones de volumen para:

- Establecer una curva de calibración.
- Determinar el efecto del estrés hiposmótico sobre los cambios de volumen.
- Estudiar existencia de disminución de volumen regulatorio (RVD).
- Determinar el efecto de DMPO sobre el volumen.
- Evaluar participación de ROS en los cambios de volumen.

Para esto las células se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^6$ en placas de 35

mm células/placa, sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos de gelatina (2% p/v). Los cardiomiocitos se preincubaron con calceína-acetoximetil ester (5 μ M) por 5-10 min, lavados con medio isosmótico (PBS), posteriormente los cubreobjetos se colocaron en una cámara de perfusión, donde se hizo pasar medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) por 10 min con intervalos de medio isosmótico (DME:M199 4:1) por 5 min, entre ambas soluciones hiposmóticas, además, para determinar existencia de RVD se utilizó como control positivo la línea celular HeLa, la que se expuso a condiciones de osmolaridad equivalentes a las utilizadas en cardiomiocitos. Para ver si DMPO (200 mM) tenía incidencia en el cambio de volumen se incubaron los cardiomiocitos por 30 min con este compuesto. Finalmente los cardiomiocitos transducidos con AdCAT y AdLACZ (control) fueron estimulados con medio hiposmótico (248 y 202 mOsm). Los cambios en la intensidad de la fluorescencia se determinaron fotografiando las células cada 20 segundos a λ_{ex} =488 nm y λ_{em} =510-545 nm en un microscopio confocal Zeiss LSM 410. Los valores se estandarizaron asignando a la fluorescencia basal (F_0) el valor de 1. Para la conversión de fluorescencia a volumen relativo se realizó una curva de calibración mediante el paso de soluciones con distinta osmolaridad desde 202 mOsm hasta 600 mOsm, el factor de corrección n se obtiene del intercepto de la ecuación de la recta (F_0/F_T vs π_0/π_T). A partir de la ecuación $V_T/V_0 = \{(F_0/F_T) - n\} / (1 - n)$ se puede realizar la conversión de los valores.

5.6. Tratamiento adenoviral

Las células se transducieron con adenovirus para:

- Estudiar la participación de ROS en la viabilidad celular.
- Determinar el origen de la especie radicalaria involucrada.
- Evaluar la participación de ROS en los cambios de volumen.

Las células se sembraron a distintas densidades dependiendo del experimento. Luego de 24 h, las células se privaron de suero y transducieron con AdSOD1, AdSOD2, AdCAT o AdGPx, a una multiplicidad de infección (MOI) de 300 partículas virales por célula, se mantuvieron por 48 h antes de lavarlas y se estimularon con medio hiposmótico (248 o 202 mOsm). Como control de transducción se utilizó el vector adenoviral que expresa la enzima β -GAL (AdLacZ), a la misma multiplicidad de

infección.

5.7. Tratamiento con antioxidantes e inhibidores específicos

Se utilizaron diversos inhibidores específicos y un antioxidante para:

- Determinar la fuente de origen de las especies reactivas de oxígeno.

Las células se sembraron a distintas densidades dependiendo de las necesidades experimentales y preincubadas 30 min antes del estímulo con el antioxidante NAC (1mM) y los inhibidores apocinina (300 μ M), alopurinol (100 μ M), rotenona (100 μ M), DPI (100 μ M).

5.8. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para:

- Evaluar las formas inactiva y activa de las caspasas-9 y -3 en respuesta a tratamiento con medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) por distintos tiempos.

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 2×10^6 células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 100 μ L 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 Na_3VO_4 1 mM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 r.p.m 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 (el extracto) a -20°C.

5.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para la detección de las formas activas e inactivas de las caspasas en los extractos totales se cargaron alrededor de 30 μ g de extracto proteico. Los geles concentrador y separador fueron de 5 y 12%,

respectivamente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 Volt en tampón de electroforesis.

5.10. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2 μm para determinar las formas activas e inactivas de las caspasas a amperaje constante de 0,4 Ampere durante 75 min en tampón de transferencia.

5.11. Western blot

Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios Procaspasa/caspasa-9 y Procaspasa/caspasa-3 en tampón de incubación (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) toda la noche a 4°C con agitación suave.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1X / Tween-20 al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la reacción "Western Lightning" y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron procesadas con ayuda de los programas computacionales Photoshop 6.0 y USI.

Después de realizar los ensayos de inmuno western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h en una solución de rojo ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos.

5.12. Determinación de los niveles totales de GSH

Para medir los niveles de GSH en cardiomiocitos se ocupó el método descrito por

Anderson y Meister (23). Se realizaron cultivos celulares con una densidad de 2×10^6 células / placa de 35 mm. Las células se privaron 18 h antes del estímulo con medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) a distintos tiempos, además de un control sin privación, una vez terminado el tiempo de estímulo se le agregaron 70 μ L de tampón de lisis pH 7,4 (Tris/HCl 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50mM, Tritón X-100 1% v/v, PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1mM). Los homogeneizados se centrifugaron a 12.000 r.p.m x 20 min, y los sobrenadantes rescatados a tubos nuevos, luego se separaron alícuotas de 10 μ L de cada muestra para medir la concentración de proteínas totales. Posteriormente se agregó a los sobrenadantes TCA al 2,5% se incubó por 5 min para precipitar las proteínas contenidas en las muestras y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. x 20 min. El sobrenadante se rescató, neutralizó con 1 volumen de tampón fosfato 250 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4 y luego se añadió a una mezcla que contiene NADPH 0,2 mM, DTNB 0,6 mM y Glutathion reductasa 1 U/mL. A continuación se monitoreó espectrofotométricamente a 412 nm la formación del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, cuya velocidad de formación es dependiente de los niveles de GSH presente en las muestras. Para calcular los niveles de GSH fue necesario realizar una curva de calibración en las condiciones mencionadas anteriormente con concentraciones conocidas de GSH, cuyo rango varió entre 0,1 μ M y 2,0 μ M. Los resultados se expresaron en nmoles de GSH/mg. de proteína.

5.13. Determinación de especies reactivas de oxígeno por espectrofluorometría

Los experimentos para la determinación de especies reactivas derivadas del oxígeno se realizaron con cultivos de cardiomiocitos en placas de 24 pocillos, donde se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por placa. Los cultivos se expusieron a estrés hiposmótico con medio hiposmótico 248 y 202 mOsm, por 0, 1, 15 y 30 min Para confirmar la naturaleza oxidante de las especies formadas se preincubaron los cardiomiocitos con el antioxidante NAC (1 mM), además de los inhibidores apocinina (300 μ M), rotenona (100 μ M), DPI (100 μ M), alopurinol (100 μ M) y un quelante de calcio interno, BAPTA (100 μ M), por 30 min y se trataron por 15 min con medio hiposmótico. Diez minutos antes de finalizar el tiempo de estímulo, evitando un ambiente muy iluminado, se agregaron a los cultivos DCF-DA a una concentración final de 10 μ M. Para detener la reacción se lisaron los cultivos con 200 μ L de una solución de NaOH 100 mM y de los

homogeneizados resultantes se separó una alícuota para determinar la concentración de proteínas totales. Luego 100 µL del homogeneizado se completa con agua a 2.000 µL y se cuantificó la fluorescencia en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B/29 a longitudes de onda de excitación y emisión de 490 y 515 nm, respectivamente.

5.14. Determinación de ROS por Resonancia electrónica del espín (ESR)

Se obtuvieron cultivos de cardiomiocitos, con una confluencia de $2,5 \times 10^5$ de células en placas de 24 pocillos. Después de privar de suero a los cultivos durante 18 h, se estimularon con medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) por 30 min. Para la evaluación de la generación de radical OH^\bullet inducida por estrés hiposmótico, los cardiomiocitos se trataron con medio de mantención (Control) o medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) por 30 min en presencia de DMPO (200 mM), el cual es un atrapador de radicales libres (spin trap) centrado principalmente en oxígeno. Además, para determinar la fuente de origen de la especie radicalaria, se utilizaron los inhibidores apocinina (300 µM), rotenona (100 µM), alopurinol (100 µM) y BAPTA (100 µM), preincubados 30 min antes del estímulo y la transducción adenoviral (AdSOD1, AdSOD2, AdCAT, AdGPx, AdLACZ).

.....Concluido el tiempo del estímulo se retiró el medio de cultivo, se agregaron 500 µL de un tampón de lisis que contiene TRITON X100 (0.8%) y DMPO (200 mM) en DME/M199 4:1 y se incubó durante 10 min. Como control positivo se empleó la fotólisis de H_2O_2 que presenta el espectro característico de DMPO- OH^\bullet . Posteriormente los extractos crudos se sometieron a análisis por ESR en un espectrómetro Bruker ECS 106.

5.15. Viabilidad celular

Se realizaron estudios de viabilidad para:

- Estudiar la muerte de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico.
- Estudiar la participación de ROS en la muerte del cardiomiocito.

Los cardiomiocitos se estimularon con medio de mantención (control) y medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) por 2, 4, 6 y 18 h, o bien, se transducieron con

AdSOD1, AdSOD2 y AdCAT, además del control de transducción (AdLacZ) por 48 h y se trataron con medio hiposmótico (248 y 202 mOsm) por 4 h. Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,0 \times 10^6$ y luego de estimularlas, se desprendieron con 500 μ L de tripsina 1x en medio Hank's. 5 min después, la reacción de tripsinización se detuvo con 50 μ L de FBS (inactivado a 56°C). Las células se centrifugaron a 1.200 r.p.m por 5 min y resuspendieron en 100-200 μ L de medio Hank's, dependiendo de la cantidad de pella, se tomaron luego 20 μ L y se le agregaron 20 μ L de Hank's. El número de cardiomiocitos viables fue determinado al microscopio por exclusión con azul de tripán al 0,5% en una cámara de Neubauer.

5.16. Análisis estadístico

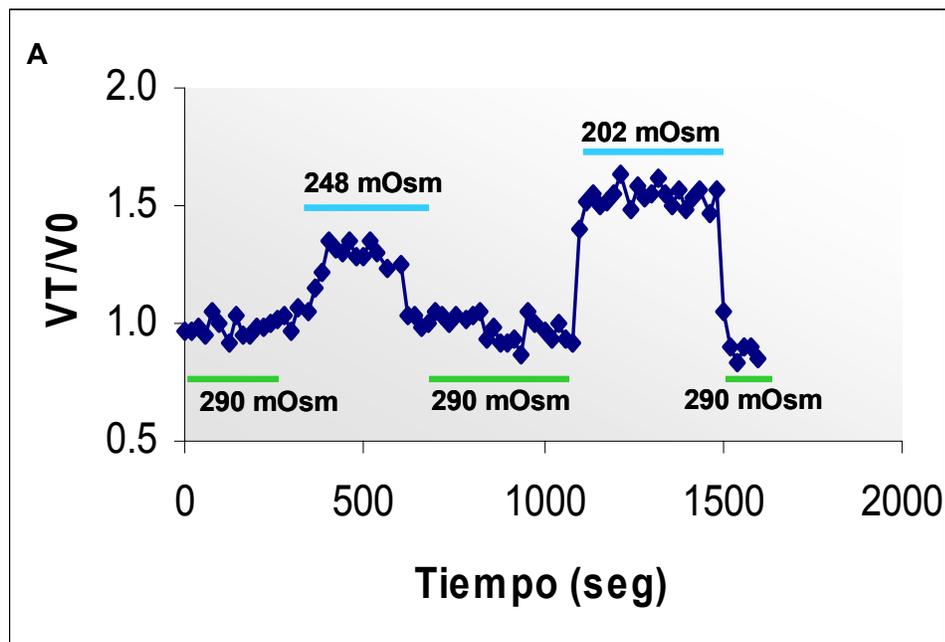
Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto del estrés hiposmótico sobre el volumen del cardiomiocito

6.1.1. Determinación del volumen celular por microscopia confocal en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico

Para evaluar el efecto del estrés hiposmótico en los cambios de volumen, se expusieron cultivos de cardiomiocitos a soluciones hiposmolares de 248 y 202 mOsm, se cargaron con calceína-AM (5 μ M) y posteriormente se analizaron los cambios en la fluorescencia por microscopía confocal, donde la disminución de la fluorescencia fue inversamente proporcional al cambio de volumen. La conversión de fluorescencia a volumen se realizó por medio de una ecuación obtenida de una curva de calibración, donde el intercepto representó el factor de corrección de volumen, el que es particular de cada tipo celular. Los resultados mostraron que tanto 248 como 202 mOsm aumentaron el volumen del cardiomiocito inmediatamente aplicado el estímulo (Figura 3A), en 40 y 60%, respectivamente, respecto al basal (Figura 3B). Igualmente estas células no reestablecieron su volumen original en 10 min, sólo recuperando su volumen inicial cuando se expusieron a condiciones normosmóticas (290 mOsm) (Figura 3A).



B

Osmolaridad (mOsm)	VT/V0	% Aumento volumen respecto al basal
290	1,1 ± 0,1	-
248	1,4 ± 0,2*	40
202	1,6 ± 0,4**	60

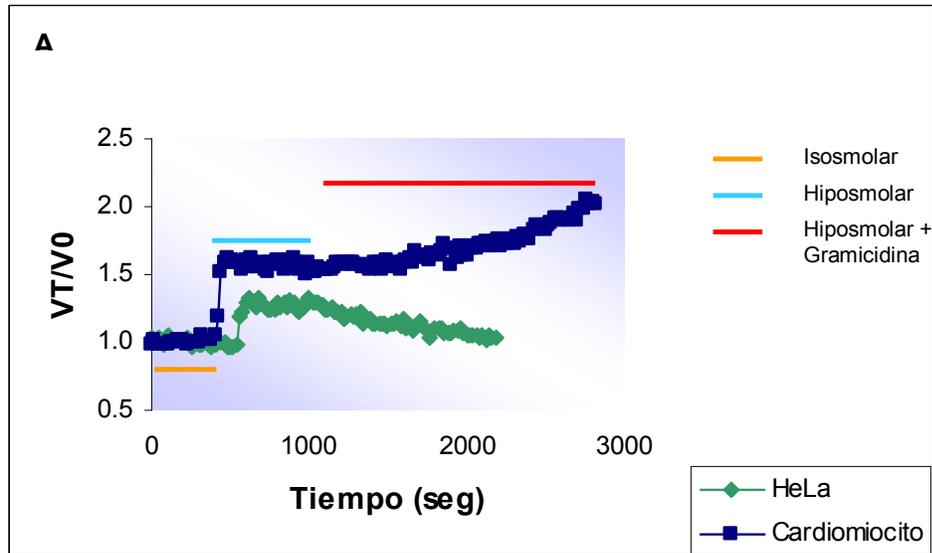
Figura 3. Determinación del volumen celular en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Las células se expusieron a soluciones de distintas osmolaridades (290±1, 248±2, 202±2) por un tiempo determinado. Los cardiomiocitos se preincubaron con Calceína-AM (5 µM) por 10 min y luego lavados con solución isosmótica para remover el exceso del fluoróforo. (A) Gráfico representativo del cambio de volumen, las barras celestes y verdes indican el periodo en que los cardiomiocitos se mantuvieron bajo condiciones hiposmóticas e isosmóticas respectivamente. (B) Tabla de cuantificación del volumen celular bajo las distintas soluciones osmóticas. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal. Los resultados representan la media ± SD, n=3- 8; *p< 0,05, **p< 0.01 con respecto a 290 mOsm.

6.1.2. Determinación de la disminución regulada del volumen (RVD) en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico

Una vez que se determinó que los cardiomiocitos experimentan un aumento en su volumen después de ser expuestos a estrés hiposmótico, se evaluó la capacidad de estas células para regular su volumen, exponiéndose en primer término cultivos primarios de cardiomiocitos a soluciones hiposmolares de 202 mOsm durante 10 min y luego por 30 min a una solución hiposmótica 202 mOsm que además contenía gramicidina 10 μ M (un conocido acelerador del RVD) (Riquelme *et al*, 1997; Stutzin *et al.*, 1999). En paralelo se repitieron estos experimentos empleando la línea celular HeLa. Ambos tipos celulares se preincubaron con calceína-AM y posteriormente se analizaron los cambios en la fluorescencia por microscopía confocal, donde la disminución de la fluorescencia fue inversamente proporcional al cambio de volumen.

Los resultados mostraron que 202 mOsm aumentó el volumen en el cardiomiocito, inmediatamente aplicado el estímulo, siendo estas células incapaces de reestablecer su volumen en 10 min en forma espontánea o por acción de gramicidina (Figura 4A).

En cambio, las células HeLa, usadas como un control positivo del RVD, aumentaron en menor magnitud su volumen en comparación con los cardiomiocitos (Figura 4A) y recuperaron su volumen en un 97% después de 20 min de exposición a una solución hiposmótica que contenía gramicidina (Figura 4B).



B	% Aumento de volumen	% RVD
HeLa	33	97
Cardiomiocito	60	0

Figura 4. Cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico no presentan RVD. Las células se expusieron a estrés hiposmótico (202 mOsm) por los tiempos indicados y luego por 30 min a una solución hiposmolar que contenía gramicidina (10 μ M). Como control positivo se usaron células HeLa, las que se expusieron a condiciones equivalentes a la de los cardiomiocitos (A). (B) Tabla de cuantificación del cambio de volumen celular bajo las distintas soluciones osmóticas. Las células se preincubaron con Calceína-AM (5 μ M) por 10 min y luego se lavaron con solución isosmótica para remover el exceso del fluoróforo. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal. Los resultados (n=3) representan el % de aumento de volumen y % de RVD una vez finalizada la medición.

6.1.3. Determinación del efecto de DMPO sobre el volumen del cardiomiocito

Este experimento se realizó como un control, para determinar si el atrapador DMPO tenía alguna incidencia en el cambio de volumen de los cardiomiocitos en las determinaciones de ESR. Las células se preincubaron con calceína-AM (5 μM) por 5 min y se expusieron a una solución isosmolar (290 mOsm) por 5 min para obtener un estado basal, luego se agregó DMPO (200 mM) y se observó la variación en el volumen durante 10 min. La figura 5 no muestra cambios significativos en el volumen de los cardiomiocitos cuando estos son expuestos a una concentración de 200 mM de DMPO, indicando que DMPO no se comporta como un compuesto osmóticamente activo y por lo tanto no tiene incidencia en las determinaciones de ESR.

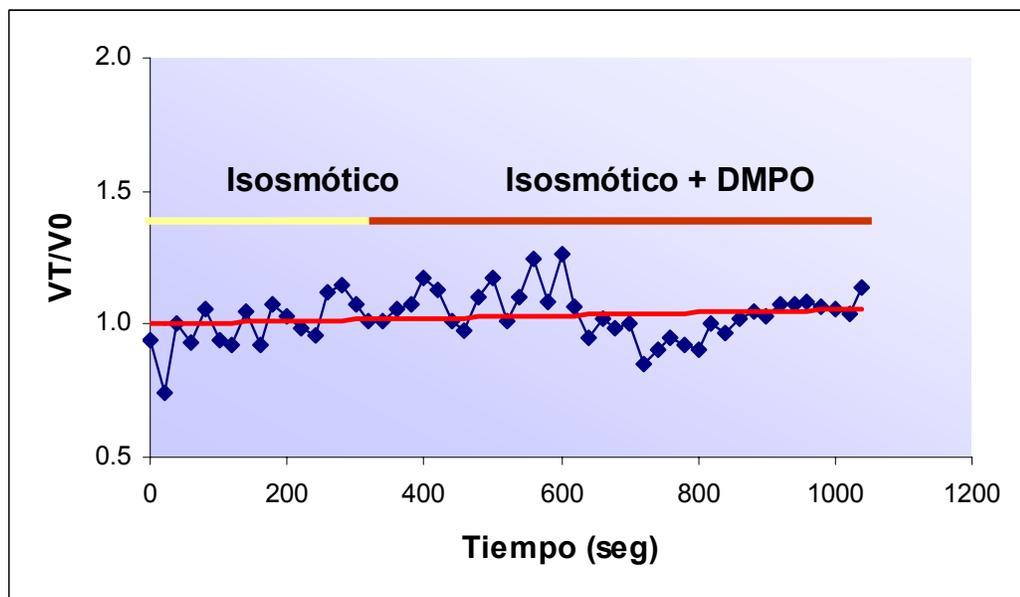


Figura 5. Efecto del atrapador DMPO en el volumen de cardiomiocitos. Los cardiomiocitos se expusieron a un medio isosmótico (290 mOsm) y posteriormente se adicionó DMPO (200 mM), previamente las células se cargaron con calceína (5 μM), y se lavaron con medio isosmótico. Los cambios en la concentración intracelular de calceína, un indicador de volumen celular, se determinaron por microscopía confocal. La línea roja es la tendencia lineal de los valores.

6.2. Efecto del estrés hiposmótico en la generación de ROS en cardiomiocitos

6.2.1. Determinación de ROS por espectrofluorometría

Para evaluar el efecto del estrés hiposmótico en la generación de radicales libres, se expusieron cultivos de cardiomiocitos a soluciones hiposmolares de 202 ó 248 mOsm, se cargaron con DCF-DA y posteriormente se analizó la oxidación de la DCF generada por radicales libres por espectrofluorometría. Los ensayos realizados por espectrofluorometría mostraron que los cultivos de cardiomiocitos expuestos a 248 ó 202 mOsm producen un aumento de ROS, desde el minuto de aplicado el estímulo con un máximo a los 15 min, valores que disminuyeron conforme aumentó el tiempo de estímulo. Cabe señalar que los niveles de ROS generados por 248 mOsm siempre resultaron menores a los producidos por 202 mOsm, no resultando significativos.

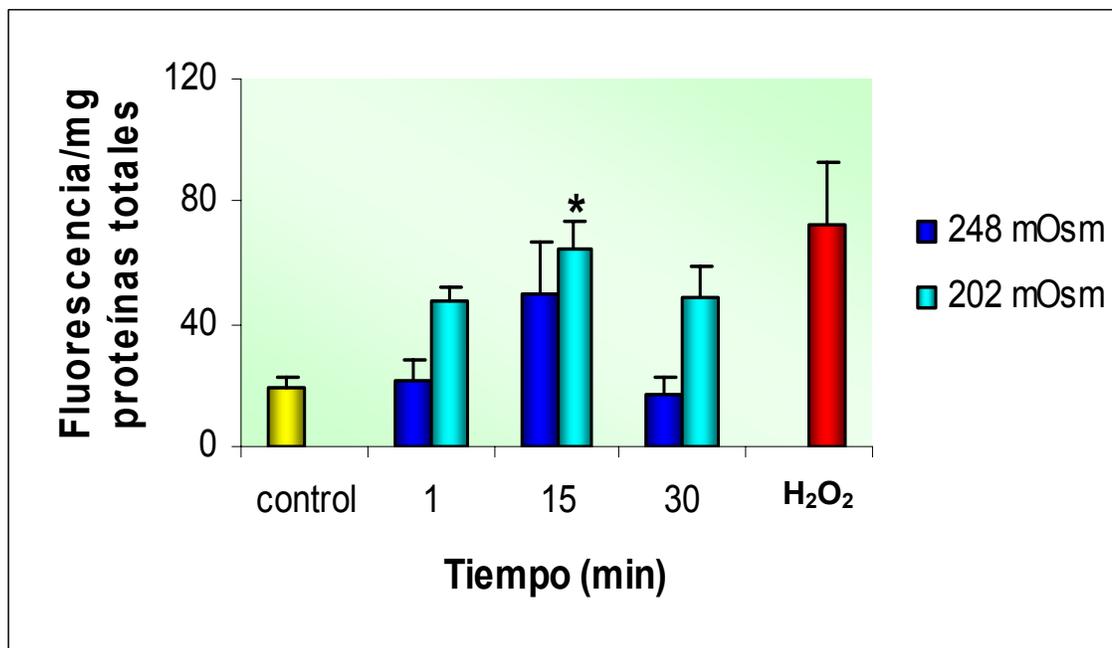


Figura 6. Niveles de ROS en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos se expusieron a 248 ó 202 mOsm por 1, 15 y 30 min y luego se incubaron con DCF-DA (10 μ M). La fluorescencia generada por oxidación de DCF (directamente proporcional a los niveles de ROS) fue monitoreada espectrofluorométricamente. Los valores del gráfico muestran la media \pm SEM (n=3). *p<0,05 vs control.

6.2.2. Determinación de ROS por ESR

La evaluación de la fluorescencia generada por la oxidación de la DCF es indirecta para estudiar la presencia de ROS en nuestro modelo. Sin embargo, la técnica del ESR permite cuantificar de forma directa los niveles de un radical libre, así como también, identificar su naturaleza química. Para probar la presencia de ROS, los cultivos de cardiomiocitos fueron preincubados con 200 mM de DMPO y posteriormente expuestos a 248 ó 202 mOsm durante 30 min. Después de obtener los extractos crudos de cardiomiocitos, se analizaron por ESR, donde se realizó entre 10 a 14 barridos, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que tanto 248 como 202 mOsm, generaron radicales libres centrados en el oxígeno, identificándose principalmente al radical hidroxilo (OH^\bullet) como la especie radicalaria. En la Figura 7 se observan las señales obtenidas con 248, 202 mOsm, control medio de cultivo (290 mOsm) y un control positivo generado a partir de la fotólisis del H_2O_2 en los cultivos de cardiomiocitos.

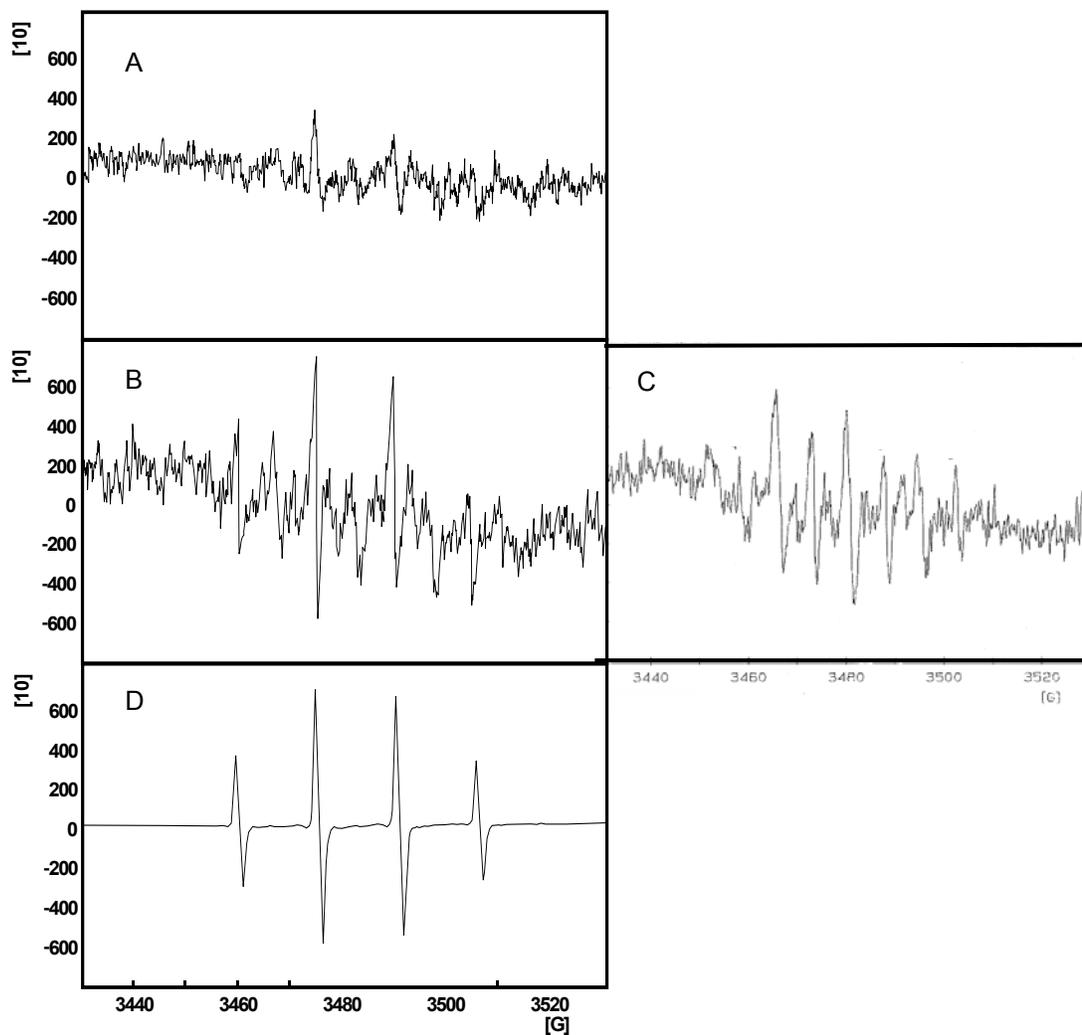


Figura 7. Determinación de ROS por ESR en cultivos de cardiomiocitos. Los cultivos de cardiomiocitos se incubaron en ausencia (control, A) o en presencia de soluciones hiposmolares 202 (B) ó 248 (C) mOsm durante 0,5 h. Como control positivo, los cardiomiocitos se incubaron con H_2O_2 (1 mM) durante 5 min (D). Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos se analizaron por ESR.

6.3. Efecto del estrés hiposmótico sobre los niveles totales de GSH

Demostrada la generación de ROS en los cardiomiocitos sometidos a estrés hiposmótico, se evaluaron los niveles intracelulares de GSH como un parámetro del estrés oxidativo. Para estos fines, cultivos de cardiomiocitos se expusieron a 248 ó 202 mOsm y los niveles totales de GSH se determinaron entre 0 y 18 h de estímulo, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que después de 4 h de tratamiento con 248 ó 202 mOsm, los niveles de GSH disminuyeron de $18,5 \pm 4,1$ a $12,9 \pm 0,3$ y de $23,0 \pm 1,1$ a $15,1 \pm 2,8$ nmoles/mg proteína, respectivamente. Dicha disminución fue sostenida hasta las 18 h de estímulo (Figuras 8A y B). A diferencia de 202 mOsm, los cultivos de cardiomiocitos expuestos a 248 mOsm, no mostraron cambios significativos en los niveles de GSH.

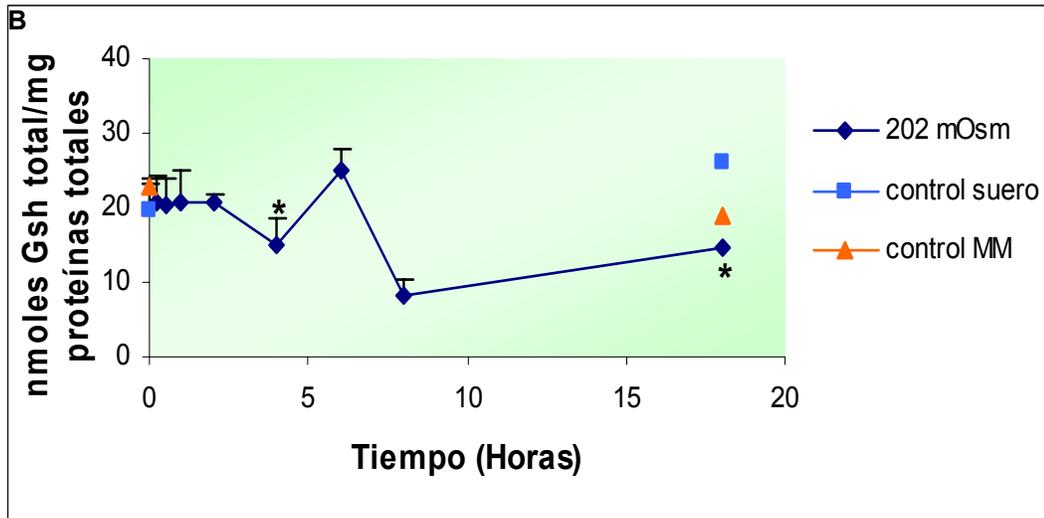
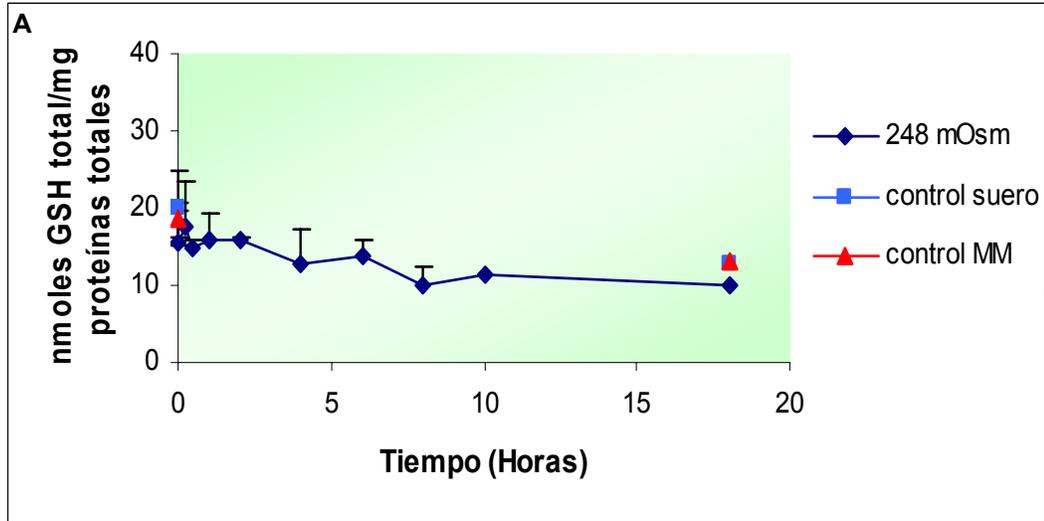


Figura 8. Niveles de GSH total en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos se incubaron con 248 (A) o 202 (B) mOsm entre 0 y 18 h. Posteriormente se obtuvieron extractos crudos y se determinaron los niveles de GSH a través de una cinética enzimática acoplada a glutatión reductasa. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM (n=3), *p<0,05 vs 0 h.

6.4. Origen de los ROS por acción del estrés hiposmótico en cultivos de cardiomiocitos

6.4.1. Determinación por espectrofluorometría

Demostrada la generación de ROS en cultivos de cardiomiocitos expuestos a 248 y 202 mOsm, se evaluó si apocinina (inhibidor específico NADPH oxidasa), rotenona (inhibidor específico mitocondria), alopurinol (inhibidor Xantino oxidasa) y DPI (inhibidor inespecífico), el antioxidante NAC y el quelante de calcio interno BAPTA, atenúan los niveles de ROS en estos cultivos. Estos experimentos se realizaron evaluando la oxidación de la DCF-DA por radicales libres, a través de espectrofluorometría. Para ello, los cultivos de cardiomiocitos se preincubaron con apocinina (300 μ M), rotenona (100 μ M), alopurinol (100 μ M), DPI (100 μ M), NAC (1 mM) y BAPTA (100 μ M) durante 30 min, se expusieron a soluciones de 248 ó 202 mOsm durante 15 min y a H₂O₂ (1 mM) por 10 min., y se cargaron con DCF-DA para posteriormente evaluar los niveles de ROS. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos por espectrofluorometría, donde se observa el efecto inhibitorio de apocinina y en menor medida el efecto antioxidante de NAC en los niveles de ROS generados por 202 mOsm en cardiomiocitos. A diferencia, con 248 mOsm se observa una tendencia en la disminución de ROS por BAPTA, sin embargo ninguna disminución resultó ser estadísticamente significativa (Figura 9).

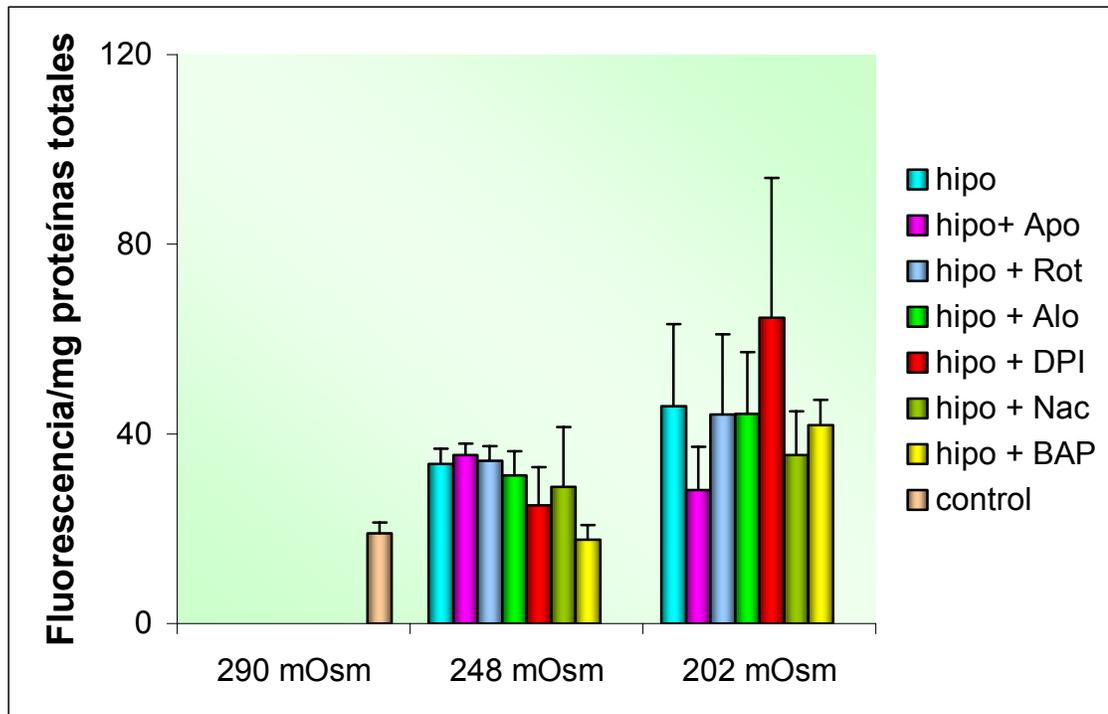


Figura 9. Efecto de apocinina, rotenona, alopurinol, DPI, NAC y BAPTA en la generación de ROS en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos se preincubaron con apocinina, rotenona, alopurinol, DPI, NAC y BAPTA, luego se trataron con 248 ó 202 mOsm por 15 min., y DCF-DA (10 μ M). La fluorescencia generada por oxidación de DCF fue monitoreada espectrofluorométricamente en los extractos crudos de cardiomiocitos.

6.4.2. Determinación por ESR

Demostrada la presencia del radical hidroxilo (OH^\bullet) en cultivos de cardiomiocitos expuestos a 248 ó 202 mOsm, se evaluó si apocinina (inhibidor específico NADPH oxidasa), rotenona (inhibidor específico mitocondria), el quelante de Calcio interno BAPTA, atenúan los niveles de ROS en estos cultivos y la posible fuente de origen del radical involucrado por ESR. Para confirmar la procedencia del radical, se transdujeron las células con distintos adenovirus (AdCAT, AdSOD1, AdSOD2 y AdGPx), además del control de infección (AdLACZ).

Los cultivos de cardiomiocitos se preincubaron con los distintos inhibidores y transdujeron con los distintos adenovirus tal como se describe en Materiales y Métodos, luego preincubados con 200 mM de DMPO y posteriormente expuestos a 248 o 202 mOsm durante 30 min. Después de obtener los extractos crudos de cardiomiocitos, se analizaron por ESR, donde se realizó entre 10 a 14 barridos. Los resultados mostraron que tanto apocinina como el AdCAT disminuyeron la señal con respecto a las células estimuladas con 202 ó 248 mOsm. En la figura 10 se muestran los espectros obtenidos para 248 mOsm, apocinina, BAPTA y rotenona, donde se observa una clara señal para el estímulo de estrés hiposmótico y una disminución total (se restó el basal del control) de la señal para BAPTA. En la figura 11 se muestran los espectros obtenidos para 202 mOsm, rotenona y BAPTA, en estos espectros se determinó la altura del segundo pico, arrojando como resultado un 100% de disminución de la señal para apocinina. En las tablas 1 y 2, se muestran el porcentaje de inhibición con respecto al estímulo 248 y 202 mOsm respectivamente, que presentaron los distintos inhibidores. En la condición 248 mOsm, BAPTA inhibió completamente la señal, seguido por rotenona y apocinina. En la condición 202 mOsm apocinina inhibió por completo la señal, rotenona y BAPTA tuvieron baja incidencia en la disminución de la señal (25% y 12% respectivamente). En la Figura 12, se observan las señales obtenidas con 248 mOsm, AdCAT, AdSOD1 y AdSOD2, donde se observa una evidente disminución de la señal en las células que sobreexpresaron catalasa. En la figura 13 se muestran las señales obtenidas con 202 mOsm, AdCAT, AdSOD1 y AdSOD2, donde se aprecia una disminución de la señal en las células transducidas

tanto con AdCAT como con AdSOD1. En la tabla 3, se muestra el porcentaje de inhibición con respecto al estímulo 248 y 202 mOsm, que presentaron los distintos adenovirus.

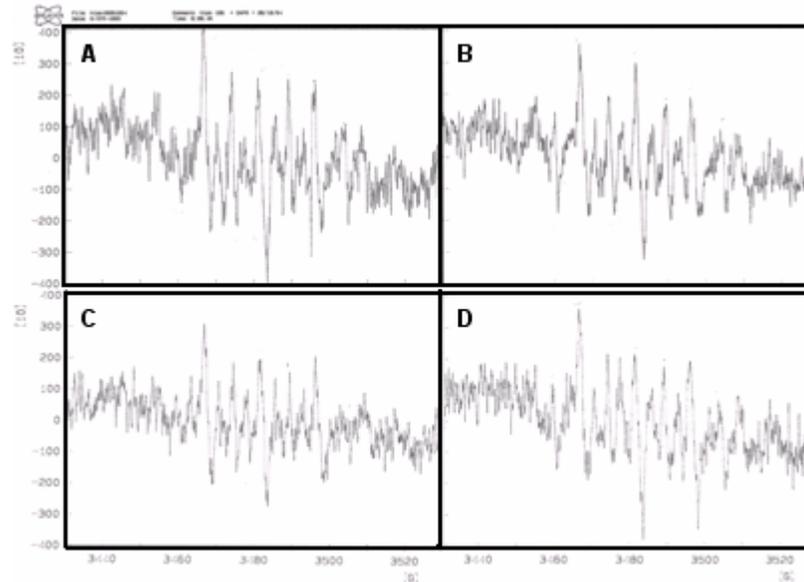


Figura 10. Efecto de distintos inhibidores de ROS sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos se incubaron en una solución hiposmolar 248 mOsm (A), apocinina + 248 mOsm (B), BAPTA + 248 mOsm (C) y rotenona + 248 mOsm (D) durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR.

Tabla 1. Efecto de distintos inhibidores sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Cultivos de cardiomiocitos se preincubaron con los distintos inhibidores por 30 min y luego en presencia de la solución hiposmolar 248 durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR. Los datos representan el porcentaje de inhibición con respecto al estímulo, el cual se calculó por disminución de la altura del segundo pico.

Condición	Altura pico (cm)	% inhibición respecto al estímulo
Control	6,5	
248 mOsm	9,5	
248 mOsm + apocinina	7,3	75
248 mOsm + BAPTA	6,5	100
248 mOsm + rotenona	6,6	97

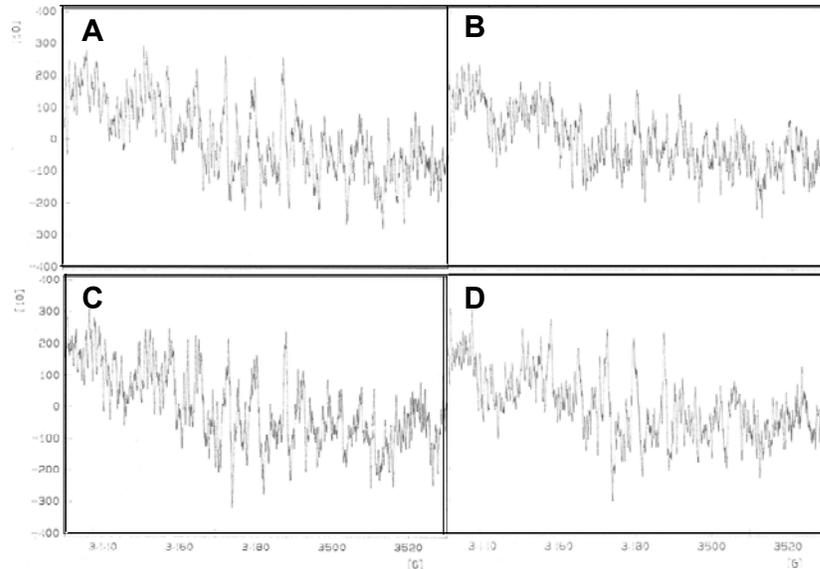


Figura 11. Efecto de distintos inhibidores de ROS sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos se incubaron en presencia de la solución hiposmolar 202 mOsm (A), apocinina + 202 mOsm (B), BAPTA + 202 mOsm (C) y rotenona + 202 mOsm (D) durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR.

Tabla 2. Efecto de distintos inhibidores sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos se preincubaron con los distintos inhibidores por 30 min y luego incubados en presencia de la solución hiposmolar 202 durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR. Los datos representan el porcentaje de inhibición con respecto al estímulo, el cual se calculó por disminución de la altura del segundo pico.

Condición	Altura pick (cm)	% inhibición respecto al estímulo
Control	6,5	
202 mOsm	9,8	
202 mOsm + apocinina	6,5	100
202 mOsm + BAPTA	9,4	12
202 mOsm + rotenona	9,0	25

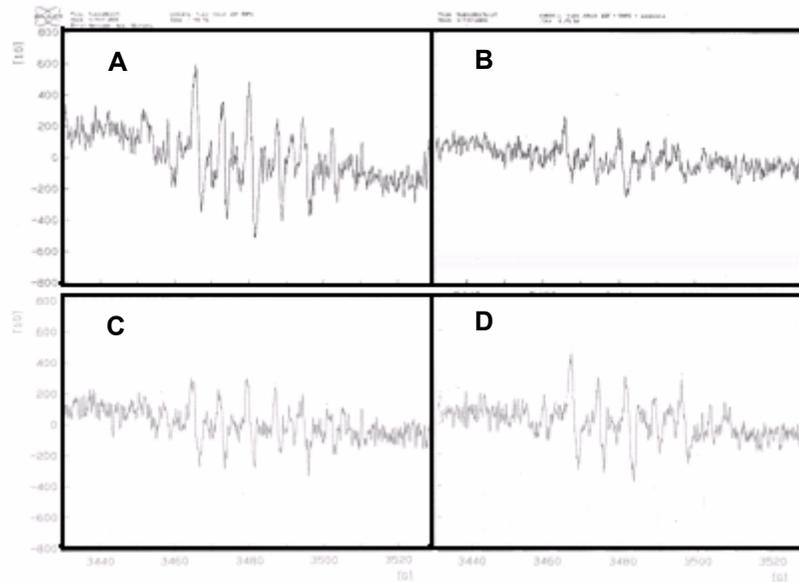


Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes mediante transducción adenoviral sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos transducidos se incubaron en presencia de la solución hiposmolar 248 mOsm. 248 mOsm (A), AdCAT (B), AdSOD1 (C) y AdSOD2 (D) durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR.

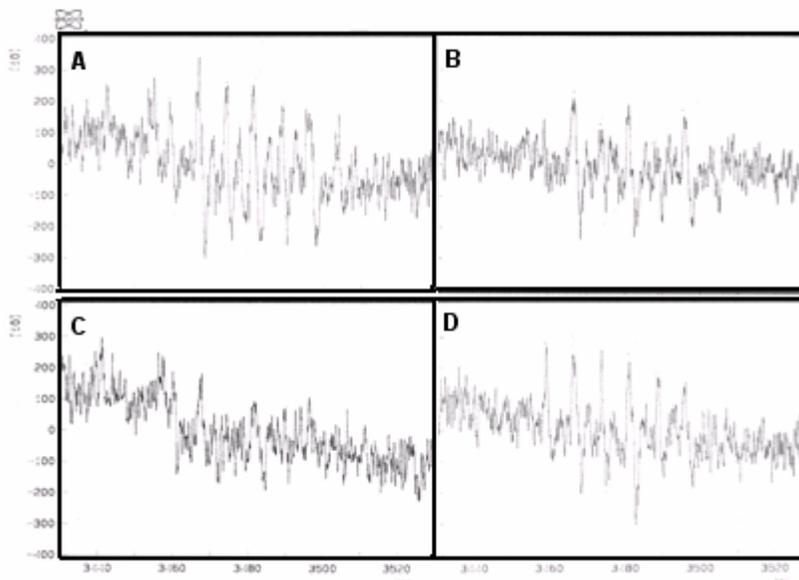


Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes mediante transducción adenoviral sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos transducidos se incubaron en presencia de la solución hiposmolar 202 mOsm. 202 mOsm (A), AdCAT (B), AdSOD1 (C) y AdSOD2 (D) durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR.

Tabla 3. Efecto de distintos adenovirus sobre los niveles del radical hidroxilo en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos transducidos con los distintos adenovirus por 48 h y luego incubados en presencia de la solución hiposmolar 248 ó 202 mOsm durante 30 min. Los cultivos se lisaron con un tampón de lisis que contenía DMPO (200 mM) y los extractos crudos se analizaron por ESR. Los datos representan el porcentaje de inhibición con respecto al estímulo, el cual se calculó por disminución de la altura del segundo pico.

Condición	Altura pick (cm)	% inhibición respecto al estímulo
248 mOsm	7,5	
248 mOsm + AdLacZ	6,5	13
248 mOsm + AdGPx	5,7	24
248 mOsm + AdSOD1	5,0	33
248 mOsm + AdSOD2	5,8	23
248 mOsm + AdCAT	3,1	59
202 mOsm	2,9	
202 mOsm + AdGPx	0,7	76
202 mOsm + AdSOD1	0	100
202 mOsm + AdSOD2	1,9	35
202 mOsm + AdCAT	0	100

6.5. Efecto del estrés hiposmótico sobre la viabilidad del cardiomiocito

6.5.1. Determinación de la viabilidad celular

Para determinar el efecto del estrés hiposmótico sobre la viabilidad de los cardiomiocitos, se expusieron las células a distintas soluciones hiposmolares de 248 (Figura 14A) ó 202 (Figura 14B) mOsm por diferentes tiempos. El porcentaje de células vivas con respecto al control se determinaron entre 0 y 18 h de estímulo, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad a partir de las 4 h pos-estímulo y después de 6 h de tratamiento con 202 ó 248 mOsm, el porcentaje de células vivas con respecto al control (0 h) disminuyó de 100 a $55,4 \pm 7,3$ y de 100 a $60,1 \pm 4,3$, respectivamente. Dicha disminución es sostenida hasta las 18 h de estímulo.

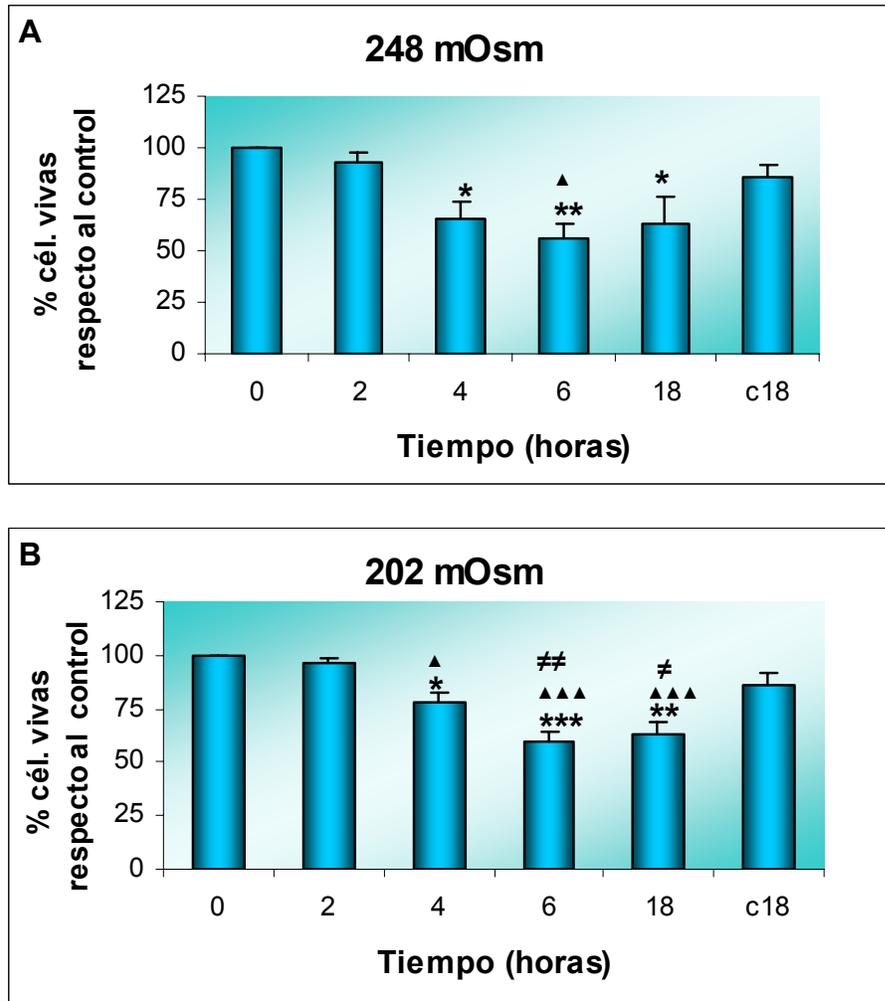


Figura 14. Efecto del estrés hiposmótico sobre la viabilidad en cultivos de cardiomiocitos. Los cultivos de cardiomiocitos se incubaron en presencia de la solución hiposmolar 202 mOsm (A) ó 248 mOsm (B) por diferentes tiempos. Las células se tripsinizaron y la viabilidad se determinó por el método de azul de tripán. Los resultados corresponden a la media \pm SEM (n= 5), * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001 vs 0 h, [▲]p< 0,05; ^{▲▲▲}p< 0,001 vs 2 h y [≠]p< 0,05; [≠]p< 0,01 vs c18 h.

6.5.2. Efecto del estrés hiposmótico sobre los niveles de caspasas 9 y 3 en cultivos de cardiomiocitos

Usando un anticuerpo anti-caspasa 9 y anti-caspasa 3 se analizó por Western blot, si 248 ó 202 mOsm producían proteólisis de las formas inactivas procaspasa 9 y 3 en caspasa 9 y 3 (indicadoras de apoptosis) en los cultivos de cardiomiocitos. En la Figura 15 se muestra el curso temporal del efecto de 202 y 248 mOsm, observándose que ninguna de las osmolaridades, produce aparición de caspasa 9 y 3. En todos los casos fue posible apreciar sólo las formas procaspasas.

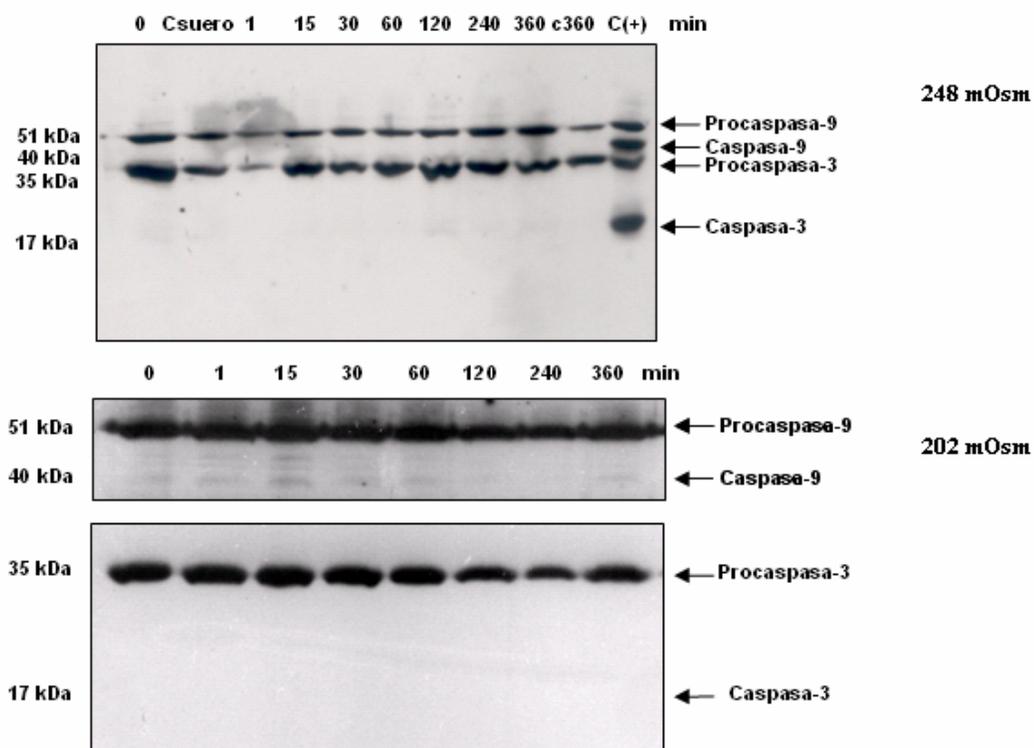


Figura 15. Niveles de procaspasas y caspasas 9 y 3 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos fueron tratados con 202 ó 248 mOsm entre 0 y 360 min. Para evaluar los niveles de procaspasas y caspasas se obtuvieron extractos de proteínas totales y se analizaron por Western blots usando un anticuerpo anti-caspasa 9 y anti-caspasa 3. La fotografía muestra geles representativos de los experimentos realizados (n= 3).

6.5.3. Efecto del AdCAT sobre la viabilidad en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico

Para determinar si la generación de ROS tiene algún efecto en la viabilidad de los cardiomiocitos, estos se transdujeron con AdCAT y AdLacZ (control), ambos con un MOI 300, luego se expusieron las células a distintas soluciones hiposmolares de 248 ó 202 mOsm por 6 h. El porcentaje de células vivas con respecto al control se determinó tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados muestran que la sobreexpresión de Catalasa protege de la muerte por estrés hiposmótico inducido por ambas soluciones hiposmolares, indicando que la generación de ROS está involucrado en la pérdida de la viabilidad de los cardiomiocitos.

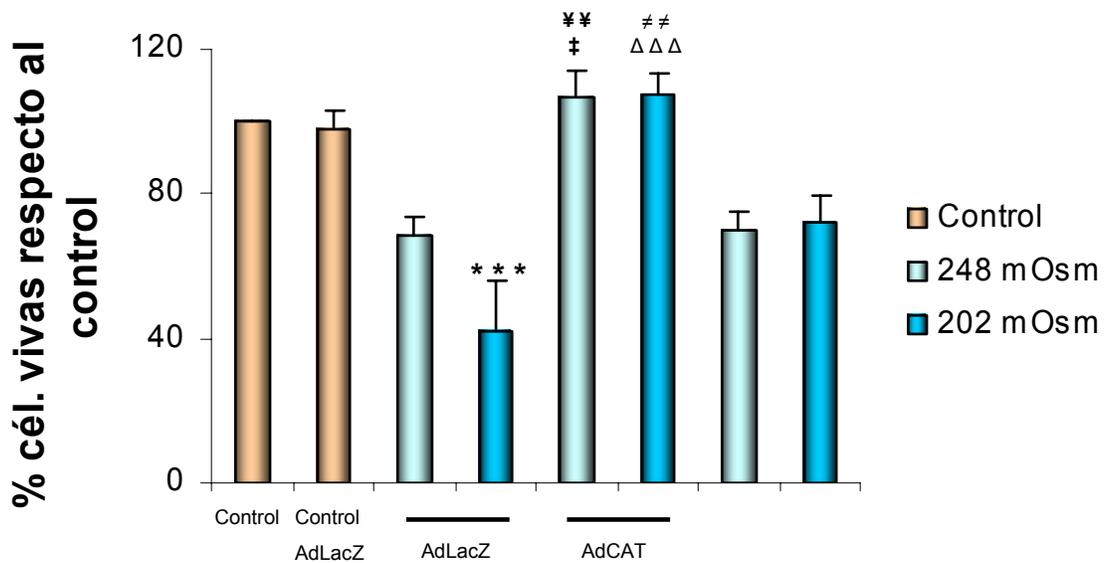


Figura 16. Efecto de la inhibición de ROS sobre la viabilidad en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico. Los cultivos de cardiomiocitos previamente se transdujeron con AdCAT y AdLacZ (control) por 48 h. Luego se incubaron en presencia de la solución hiposmolar 202 mOsm ó 248 mOsm por 6 h. Las células se tripsinizaron y la viabilidad se determinó por el método de azul de tripán. Los resultados corresponden a la media \pm SEM (n=5), ***p < 0,001 vs control AdLacZ, $\Delta \Delta \Delta$ p < 0,001 vs AdLacZ 202 mOsm; ‡p < 0,05 vs AdLacZ 248 mOsm y **p < 0,01 vs 202 mOsm; *‡p < 0,01 vs 248 mOsm.

6.6. Efecto de ROS sobre la disminución regulada de volumen en cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico

Para determinar si la generación de ROS tiene algún efecto en los cambios de volumen, los cardiomiocitos se transdujeron con AdCAT o AdLacZ (control), ambos con MOI 300. Luego las células se expusieron a una solución hiposmolar de 202 mOsm por 10 min. La fluorescencia comenzó a aumentar desde los 2 min dando cuenta de una disminución del volumen (Figura 17). Al final de la medición el porcentaje de RVD comparado con las células control correspondió a 58,3%, si bien la recuperación no fue completa los resultados muestran, que la sobreexpresión de catalasa en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiposmótico, permitió la regulación de su volumen.

Conjuntamente estos datos junto a los descritos en el punto anterior, sugieren que la generación de ROS está involucrada en la pérdida de la viabilidad de los cardiomiocitos por inhibición del RVD.

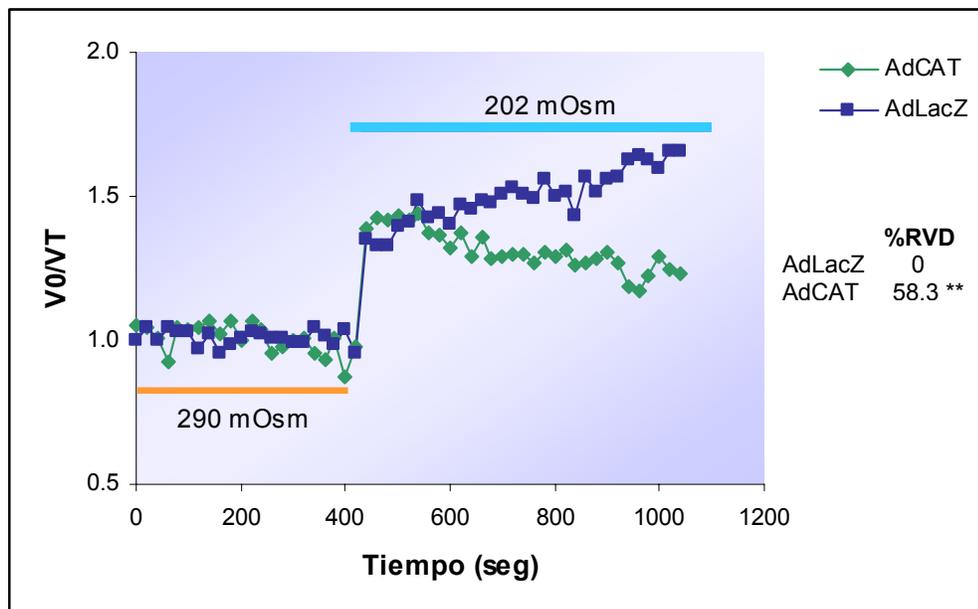


Figura 17. Efecto de ROS en el cambio de volumen frente a estrés hiposmótico. Las células transducidas con AdCAT y AdLacZ (control) se preincubaron con Calceína-AM (5 μ M) por 10 min y luego se lavaron con solución isosmótica para remover el exceso del fluoróforo. Se expusieron a estrés hiposmótico (202 mOsm) por 10 min. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal. El gráfico es representativo de un experimento, n= 9 células. Los resultados representan % de RVD una vez finalizada la medición de un total de 33 células de 3 experimentos independientes. ** p< 0.01 vs V0.

7. DISCUSIÓN

El corazón está formado por fibroblastos y cardiomiocitos. Estas últimas células, terminalmente diferenciadas que cesan de proliferar poco después del nacimiento, forman las unidades contráctiles funcionales del corazón. La natural restricción evolutiva del cardiomiocito para proliferar, hacen del corazón un órgano muy vulnerable a situaciones de estrés (Chien *et al.*, 1991). Las enfermedades cardiovasculares, entre las que figuran el infarto agudo al miocardio, la insuficiencia cardiaca, miocarditis, arritmias, etc, siguen siendo las principales causas de mortalidad y morbilidad en países desarrollados, y empiezan a ser cada vez, de mayor prevalencia en países como el nuestro (Kannel, 2000; Prieto *et al.*, 1999). Durante los procesos de isquemia y reperfusión, los cardiomiocitos se exponen a situaciones de hiposmolaridad y sus consecuencias pueden ser muy severas para el corazón, debido a los cambios electrofisiológicos relacionados con el hinchamiento celular. Este aumento del volumen celular es especialmente más marcado durante la reperfusión, evento indispensable para reestablecer la irrigación sanguínea y salvar el miocardio (Wright y Rees, 1998). También en los procesos isquémicos se produce estrés oxidativo previo al desarrollo de muerte celular por apoptosis (Kacimi *et al.*, 1997). Sin embargo, otras patologías como la hipertensión arterial o estímulos estresores diversos (ejemplo hipoxia, doxorubicina, citoquinas, H₂O₂, estiramiento mecánico, etc) también generan estrés oxidativo, desbalance redox intracelular y apoptosis (Kacimi *et al.*, 1997).

Esta memoria tuvo por objetivos investigar si:

- a) La hiposmolaridad aumenta el volumen del cardiomiocito
- b) Esta célula posee el mecanismo de disminución regulada de volumen
- c) La hiposmolaridad genera radicales libres y muerte del cardiomiocito así como la relación de éstos con la regulación del volumen

7.1. Estrés hiposmótico y cambios de volumen

Comparada con células renales o sanguíneas, las células cardíacas se caracterizan por su baja permeabilidad al agua y por desconocerse el papel de las aquaporinas (AQPs) en este proceso (Wright y Rees, 1998). A diferencia de otros tipos celulares, las células cardíacas no están expuestas fisiológicamente a grandes cambios en la osmolaridad extracelular (Lang *et al.*, 1998; Wright y Rees, 1998; Trischitta *et al.*, 2005). Nuestros experimentos mostraron que el estrés hiposmótico (202 y 248 mOsm) aumentaron significativamente el volumen de los cardiomiocitos y su magnitud de cambio dependió de la osmolaridad, siendo menor el cambio en la solución 248 mOsm. Otra característica de las células es la capacidad que poseen para regular los cambios de volumen, activando diversos mecanismos compensatorios que modifican las concentraciones intracelulares de osmolitos. Uno de ellos, el aumento regulado de volumen (RVI) se investigó anteriormente en nuestro modelo.

Los resultados anteriores mostraron que la hiperosmolaridad extracelular disminuyó el volumen de los cardiomiocitos sin presentar RVI espontáneo (Galvez *et al.*, 2003). El otro mecanismo, disminución regulada de volumen (RVD) depende de distintos factores según el tipo celular, siendo los más importantes la participación de Ca^{2+} extra e intracelular, activación de distintas MAPK y de distintos canales iónicos (Lang *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2001; vom Dahl *et al.*, 2001; Trischitta *et al.*, 2005). Los resultados expuestos en la Fig. 4 mostraron que los cardiomiocitos no regularon espontáneamente el aumento de su volumen en los tiempos evaluados ni tampoco cuando se estimuló con gramicidina la salida de potasio. Por el contrario, gramicidina pareció aumentar más el volumen, dando cuenta que los cardiomiocitos carecen de este mecanismo de regulación o que si existe puede haber sido sobrepasado por la magnitud del estrés empleado (202 mOsm). Una segunda alternativa podría derivar la capacidad natural que poseen los cardiomiocitos de aumentar su tamaño por hipertrofia (Clark y Rodnick, 1998). No se puede descartar que tal vez el RVD se manifestara con estrés de menor magnitud al empleado.

Existe controversia acerca de la capacidad de los cardiomiocitos para regular su volumen. Si bien existe evidencia de esta capacidad en células de corazón de

invertebrados marinos, los datos en seres con mayor complejidad evolutiva no son concluyentes (Deaton, 1997). En los escasos casos en que se detectó RVD espontáneo en los cardiomiocitos (Taouil *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2003), la metodología empleada no utilizó calceína ni microscopia confocal.

En resumen, los cardiomiocitos son muy sensibles a los cambios de osmolaridad, experimentando un aumento de volumen casi instantáneo bajo ambas osmolaridades (248 y 202 mOsm) y sólo se recupera rápidamente el volumen inicial si se reexponen a isosmolaridad. Además no experimentaron RVD espontáneo bajo las condiciones ensayadas.

7.2. Estrés hiposmótico y generación de ROS

Los resultados de esta tesis también mostraron que el estrés hiposmótico a similitud que el estrés hiperosmótico (Criollo, 2003) generó ROS, evidenciado por distintas aproximaciones experimentales tales como oxidación de DCF y ESR. A diferencia del estrés hiperosmótico, la producción de ROS por hiposmolaridad fue más rápida, con un aumento ya desde el primer minuto post-estímulo, alcanzando un máximo a los 15 min y una disminución a los 30 min. Dicho aumento fue proporcional al nivel de hiposmolaridad aplicado. Usando ESR y DMPO como atrapador (spin trap) se estableció que el radical hidroxilo fue la especie radicalaria generada por la hiposmolaridad y sus niveles fueron también proporcionales a la magnitud del estímulo aplicado. Sin embargo no se puede descartar la presencia de otras especies radicalarias, como el anión superóxido, puesto que el DMPO interacciona principalmente con el radical OH^\bullet cuando sus concentraciones son más elevadas. A diferencia de la técnica de DCF, los análisis de ESR se realizaron a los 30 min de estímulo para permitir la acumulación del radical y obtener un mejor espectro de la señal.

Además se evaluaron los niveles intracelulares de GSH total, parámetro que da cuenta del nivel de estrés oxidativo al que ha sido expuesta la célula. Los niveles de GSH disminuyeron a partir de los 15 min, alcanzando valores significativos a las 4 h. Con una hiposmolaridad de 248 mOsm, la reducción de los niveles de GSH fue

sostenida no así con 202 mOsm donde hubo una brusca disminución de los niveles a las 4 y 8 h, con una transitoria recuperación a las 6 h. Estas disminuciones fueron posteriores a la generación máxima de ROS (15 min), sugiriendo que los ROS generados por la hiposmolaridad producen estrés oxidativo. La recuperación transitoria de estos niveles a las 6 h podría estar dada por un aumento en las células que lograron sobrevivir para atenuar los niveles de ROS. Adicionalmente tal como han sugerido Häusingger *et al.* (1998) al GSH como un osmolito, la baja inicial en sus niveles intracelulares podría ser también explicada por su salida como un mecanismo compensatorio adicional de regulación del volumen.

A fin de descartar que la alta concentración de DMPO (200 mM) utilizada en los experimentos de ESR induce estrés hiperosmótico, se investigó si el DMPO afecta el volumen celular. Los resultados mostraron que este compuesto no se comporta como osmolito y no genera estrés osmótico.

Por otra parte, el aumento en los niveles de ROS fue atenuado por distintos inhibidores, dependiendo de la hiposmolaridad utilizada. A 248 mOsm, sólo BAPTA-AM atenuó la generación de ROS, indicando que los niveles intracelulares de calcio participan en la generación de ROS. La inhibición parcial obtenida con rotenona bajo 248 mOsm indica la participación de la mitocondria como una de las fuentes de ROS. Tal participación se vería favorecida por el calcio interno, el que estimula la producción de ROS en la mitocondria (Sousa *et al.*, 2003). La inhibición con apocinina fue similar a las anteriores, indicando la participación tanto de NADPH oxidasa como la mitocondria. Sin embargo a 202 mOsm, la contribución de la NADPH oxidasa fue mayor que la mitocondrial pues sólo la inhibición por apocinina fue efectiva. No existe información en la literatura que de cuenta de un aporte diferencial de estas dos fuentes dependiendo de la intensidad del estímulo aplicado.

La inhibición por apocinina a ambas hiposmolaridades indica la participación de la NADPH oxidasa, como la principal fuente generadora de ROS. La sobreexpresión de enzimas antioxidantes SOD, catalasa y GPx por transducción adenoviral confirmó el radical hidroxilo, originado tanto mitocondrial como por la NADPH oxidasa, siendo nuevamente mayor el aporte de esta última. En ambas hiposmolaridades, la

sobreexpresión de catalasa inhibió la señal originada por radical hidroxilo, seguida por SOD1 (enzima citosólica), la que por su ubicación parece estar más dedicada a neutralizar los ROS generados por NADPH oxidasa. Se esperaba que SOD1 o GPx inhibieran más intensamente los niveles de ROS que catalasa, debido a que el anión superóxido es generado principalmente por NADPH oxidasa (Nakagami *et al.*, 2003). Sin embargo, este último rápidamente se descompone a H₂O₂ y O₂ por acción de SOD. Dado que el H₂O₂ aún es dañino para la célula, éste se convierte a H₂O principalmente por GPx debido a la menor afinidad que presenta la catalasa por el H₂O₂ (Dieterich *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003). En corazones infartados se han observado aumentos en los niveles de mRNA, expresión y actividad de catalasa, no así para las otras enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPx). En la insuficiencia cardíaca, los niveles de GSH están reducidos en el corazón, teniendo la actividad de la catalasa vital importancia (Dieterich *et al.*, 2000), lo que daría un sentido a que la sobreexpresión de esta enzima fuera más efectiva en la disminución de la señal.

7.3. Estrés hiposmótico y muerte del cardiomiocito

En diversas cardiomiopatías, los cardiomiocitos están expuestos a privación de nutrientes, hipoxia y estrés osmótico (Wright y Rees, 1998). Las células mueren si no neutralizan o se adaptan a estos tipos de daño. Hasta hace poco sólo eran conocidos dos tipos de muerte: apoptosis y necrosis (Dinender y Judutt, 2003). Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de muerte denominada autofagia (Kostin *et al.*, 2003). En esta tesis se evaluó si, al igual que en el estrés hiperosmótico, los cardiomiocitos experimentan muerte por apoptosis (Galvez *et al.*, 2001, 2003). Los resultados mostraron que la disminución de la osmolaridad extracelular redujo la viabilidad de los cardiomiocitos a similitud de lo observado previamente con el estrés hiperosmótico (Galvez *et al.*, 2001). El nivel de muerte fue independiente de la hiposmolaridad aplicada, indicando la existencia de un umbral de osmolaridad que cuando es superado, gatillaría vías transduccionales que conducen a la muerte. Sin embargo, el mecanismo de muerte es distinto ya que no se detectó activación de las caspasas 9 y 3, lo que descartaría una apoptosis dependiente de caspasas (Kroemer y Martin, 2005). Dado que no se evaluaron otros parámetros, la muerte de los cardiomiocitos por necrosis o autofagia aún no está descartada.

7.4. Radicales libres y muerte del cardiomiocito

Cuando los niveles elevados de ROS sobrepasan las defensas antioxidantes intracelulares, distintas moléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y estructuras celulares se dañan por oxidación, denominándose a este estado como “estrés oxidativo” (Berlett *et al.*, 1997). Sin embargo, los ROS también son importantes reguladores fisiológicos (Sauer *et al.*, 2001) y dependiendo de la concentración, estos actúan como segundos mensajeros o bien como actores claves en la inducción de apoptosis o necrosis (Irani, 2000). Para evaluar si la generación de ROS inducida por hiposmolaridad participa en la muerte del cardiomiocito, se estudió el efecto de la sobreexpresión de catalasa en la muerte inducida por estrés hiposmótico. Los resultados mostraron que los mayores niveles de catalasa inhibieron la muerte del cardiomiocito, sugiriéndose que los ROS participan en la muerte activada por hiposmolaridad. Estos hallazgos concuerdan con que la sobreexpresión del AdCAT apagó completamente la señal del radical hidroxilo detectada por ESR. La sobreexpresión de catalasa también tuvo efectos en la regulación del volumen, indicando que la generación de ROS es responsable de la ausencia de RVD.

8. CONCLUSIONES

- El estrés hiposmótico aumentó el volumen del cardiomiocito, dependiendo la magnitud de este efecto del grado de hiposmolaridad.
- Los cardiomiocitos expuestos a hiposmolaridad (202 mOsm) no recuperan en forma espontánea su volumen ni en presencia de gramicidina.
- El estrés hiposmótico generó estrés oxidativo caracterizado por un rápido incremento en los niveles de ROS (principalmente radical hidroxilo) y disminución de los niveles intracelulares de GSH total.
- La NADPH oxidasa fue la principal fuente generadora de ROS en los cardiomiocitos expuestos a hiposmolaridad.
- El estrés hiposmótico disminuyó la viabilidad de los cardiomiocitos, induciendo muerte sin activación de caspasas.
- Los ROS generados por estrés hiposmótico inhiben RVD y median la muerte del cardiomiocito.

En la Figura 18 se muestra un resumen con los resultados más relevantes obtenidos a partir de esta memoria.

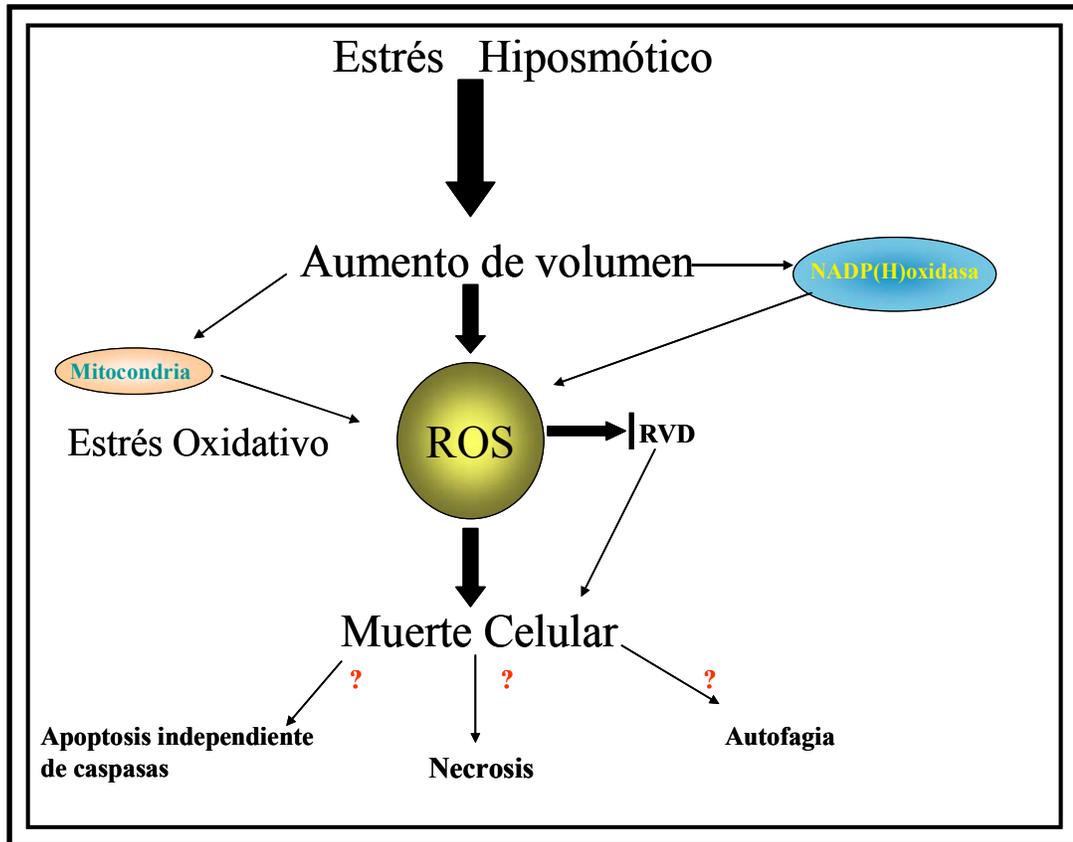


Figura 18. Resumen de los eventos inducidos por estrés hiposmótico en el cardiomiocito. Se muestra que el estrés hiposmótico produce un aumento de volumen celular, genera ROS, provenientes principalmente de la NADPH oxidasa, con un menor aporte mitocondrial y que los niveles alcanzados producen estrés oxidativo. Las ROS generadas por estrés hiposmótico inhiben RVD y median la muerte del cardiomiocito.

9. BIBLIOGRAFÍA

Altamirano J, Brodwick M.S, Alvarez-Leefmans F. Regulatory volume decrease and intracellular Ca^{2+} in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J Gen Physiol.* 112: 145-160, 1998.

Andersson R.M, Aizman O, Aperia A, Brismar H. Modulation of Na^+ , K^+ - ATPase activity is of importance for RVD. *Acta Physiol Scand.* 180: 329-334, 2004.

Becker L, Vanden Hoek T, Shao Z, Li C, Shumacker P. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol.* 277: H2240-H2246, 1999.

Berlett B, Stadtman E. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272: 20313-20316, 1997.

Cao Z, Tsang M, Zhao H, Li Y. Induction of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by α -lipoic acid in rat cardiac H9C2 cell: protection against oxidative injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 310: 979- 985, 2003.

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.* 5: 3037-3046, 1991.

Chiri S, Bogliolo S, Ehrenfeld J, Ciapa B. Activation of extracellular signal-regulated kinase ERK after hypo-osmotic stress in renal epithelial A6 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1664: 224-229, 2004.

Clark Raymond, Rodnick K. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *J Exp Biol.* 201: 1541-1552, 1998.

Criollo A. Estrés oxidativo y activación del NF- κ B en cardiomiocitos sometidos a estrés hiperosmótico, regulación por antioxidantes e IGF-1. Memoria para optar al título de bioquímico. 2003.

Dana R, Leto TL, Malech HI, Levy R. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 273: 441-445, 1998.

Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. *Circulation.* 101:33-39. 2000.

Deaton Lewis E. Comparative aspects of cellular-volume regulation in cardiomyocytes. *Physiol Zoology.* 70(4): 379-390, 1997.

Gálvez A, Ulloa J, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros L, Lavandero S. Aldose Reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 278: 38484- 38494, 2003.

Gálvez A, Morales M, Eltit J, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Díaz- Araya G, Lavandero S. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res.* 304: 279- 285, 2001.

Gatsios P, Terstegen L, Schliess F, Häussinger D, Kerr I, Heinrich P, Graeve L. Activation of the Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock. *J Biol Chem.* 273: 22962- 22968, 1998.

Häussinger D, Lang F, Bauers K, Gerok W. Control of hepatic nitrogen metabolism and glutathione release by cell volume regulatory mechanisms. *Eur J Biochem.* 193: 891-898, 1990.

Inserte J, Taimor G, Hofstaetter D, Garcia- Dorado D, Piper H. Influence of simulated ischemia on apoptosis induction by oxidative stress in adult cardiomyocytes of rats. *Am J Physiol.* 278: H94- H99, 2000.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circ Res.* 87: 179-183, 2000.

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.

Kannel WB. Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol.* **53**: 229-235, 2000.

Kacimi R, Long C, Karlner J. Chronic hypoxia modulates the interleukin-1 β - stimulated inducible nitric oxide synthase pathway in cardiac myocytes. *Circulation* 96: 1937-1943, 1997.

Kippenberger S, Loitsch S, Guschel M, Müller J, Kaufmann R, Bernd A. Hypotonic stress induces E-cadherin expression in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* 579: 207-214, 2005.

Koyama T, Oike M, Ito Y. Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol.* 532.3: 759-769, 2001.

Kostin S, Pool L, Elsässer A, Hein S, Drexler H, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann, Bauer E, Klövekorn W.P, Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res.* 92: 715-724, 2003.

- Kroemer G, Martin S. Caspase-independent cell death. *Nat Med*. 11(7): 725-730. 2005.
- Kültz D, Burg M. Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol*. 201: 3015- 3021, 1998.
- Kumar D, Jugdutt B. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med*. 142: 288-296, 2003.
- Lambert I. H. Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Memb Biol*. 192: 19-32, 2003.
- Lang F, Busch G, Ritter M, Völki H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 78: 247-303, 1998.
- Nakagami H, Takemoto M, Liao J. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II- induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 35: 851- 859, 2003.
- Niquet J, Allen S, Baldwin R, Wasterlain C. Evidence of caspase-3 activation in hypotonic stress-induced necrosis. *Neurosc Lett*. 356: 225-227, 2004.
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Desaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 532.1: 3-16, 2001.
- Prieto JC, Corbalán R, Chávez E, Lanas F, Cumsille F, Nazzari C. Acute myocardial infarction in Chilean hospitals. Final results of the GEMI study. *Rev Med Chil*. 127: 763-774, 1999.
- Riquelme G, Sepúlveda F, Jørgensen F, Pedersen S, Hoffmann E. Swelling-activated potassium currents of Ehrlich ascites tumour cells. *Biochim Biophys Acta*. 1371:101-106, 1998.

Shen M.R, Chou C.Y, Browning A, Wilkins R, Ellory C. Human cervical cancer cells use Ca^{2+} signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J Physiol*. 537.2: 347-362, 2001.

Shizukuda Y, Buttrick P. Oxygen free radicals and heart failure: new insight into an old question. *Am J Physiol*. 283: L237- L238, 2002.

Simon F, Varela D, Eguiguren A, Díaz L, Sala F, Stutzin A. Hydroxyl radical activation of Ca^{2+} -sensitive nonselective cation channel involved in epithelial cell necrosis. *Am J Physiol*. 287: C963-C970, 2004.

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 11: 173-186; 2001.

Sousa S, Maciel E, Vercesi A, Castilho R. Ca^{2+} -induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Lett*. 543: 179-183, 2003.

Souza M, Boyle R, Lieberman M. Comparisons of different stages of chick embryonic development by the physiological regulatory response to hyposmotic challenge. *Comp Biochem Physiol*. 125: 451-458, 2000.

Stutzin A, Torres R, Oporto M, Pacheco P, Eguiguren A, Cid P, Sepúlveda F. Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol*. 277(46): C392-C402, 1999.

Taimor G, Lorenz H, Schlüter B. H, Piper H. M. Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovasc Res*. 41: 147-156, 1999.

Tao G, Rott L, Lowe A, M Omary M. Hypotonic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/cyclin-dependent kinase degradation. *J Biol Chem.* 277: 19295-19303, 2002.

Taouil K, Giancola R, Morel J.M, Hannaert P. Hypotonically induced calcium increase and regulatory volume decrease in newborn rat cardiomyocytes. *Eur J Physiol.* 436: 565-574, 1998.

Trischitta F, Denaro M, Faggio C. Cell volume regulation following hypotonic stress in the intestine of the eel, *Anguilla anguilla*, is Ca^{2+} -dependent. *Comp Biochem Physiol.* 140: 359-367. 2005

Varela D, Simon F, Riveros A, Jorgensen F, Stutzin A. NADPH oxidase-derived H_2O_2 signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem.* 279: 13301-13304, 2004.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 59: 1428-1459, 2002.

Vom Dahl S, Schliess F, Graf D, Häussinger. Role of $p38^{MAPK}$ in cell volume regulation of perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem.* 11: 285-294, 2001.

Wright A, Rees S. Cardiac cell volume: crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types. *Pharmacol Ther.* 80: 89-121, 1998.

Xiao L, Pimentel D, Wang J, Singh K, Colussi W, Sawyer D. Role of reactive oxygen species and NADPH oxidase in α_1 -adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 282: C926- C934, 2002.

ANEXO 1

Determinación del volumen celular: curva de calibración de cambio de volumen (VT/V0) vs osmolaridades (π_0/π_T)

A fin de expresar los cambios de fluorescencia como cambio de volumen se realizó una curva de calibración con soluciones de distinta osmolaridad (entre 202 a 594 mOsm). Los cardiomiocitos se preincubaron con Calceína-AM (5 μ M) a 37°C por 10 min, luego se lavaron con una solución isosmótica para remover el exceso de fluoróforo. Mediante un sistema de perfusión se hizo pasar soluciones con distinta osmolaridad, empezando por la solución isosmótica (290 mOsm) por 5 min con el fin de obtener una línea base. Luego se intercalaron soluciones de alta y baja osmolaridad, 441 y 594 mOsm; 248 y 202 mOsm, respectivamente, hasta obtener una estabilización del cambio de fluorescencia. Entre cada solución fue necesario volver al medio isosmótico y obtener una nueva línea base.

Del gráfico F_0/F_T vs π_0/π_T (figura 19) se obtuvo un intercepto de 0,6399, indicando que 64% de la sonda fue atrapada en un compartimiento intracelular insensible a los cambios en la osmolaridad. Este factor depende del tipo celular y se usó para corregir los datos en los cambios de volumen celular en la siguiente ecuación: $VT/V_0 = [(F_0/F_T) - n] / (1 - n)$, donde $n = 0,64$.

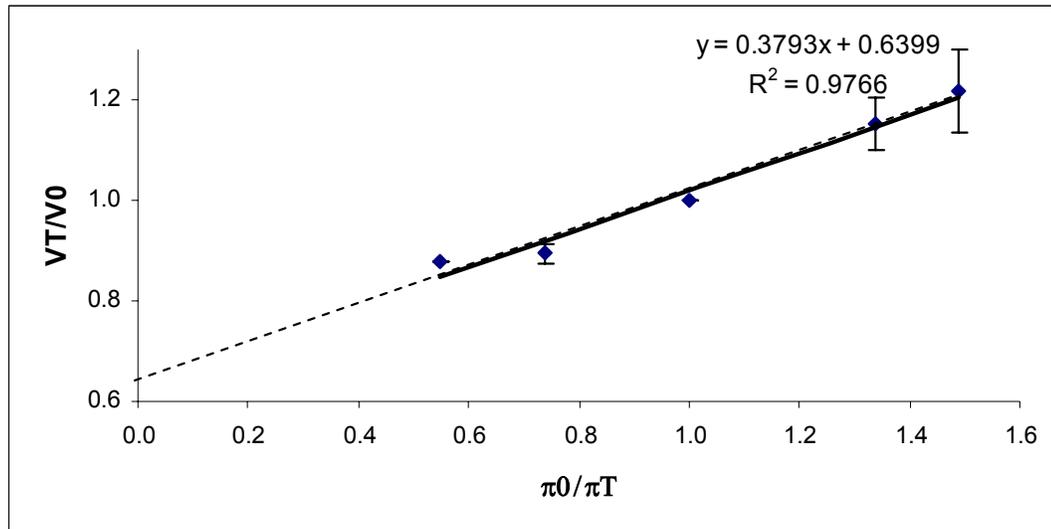


Figura 19. Curva de calibración en cardiomiocitos. Las células se expusieron a soluciones de distinta osmolaridad (290, 248, 202, 441, 594 mOsm) por un tiempo determinado (hasta estabilización de la fluorescencia). Luego los cardiomiocitos se preincubaron con calceína-AM (5 μ M) por 10 min y se lavaron con solución isosmótica para remover el exceso del fluoroforo. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal. Los resultados representan la media \pm SD (n=2– 5).