



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**PARTICIPACIÓN DE CREB EN LA SEÑALIZACIÓN
ANTIAPOPTÓTICA DEL IGF-1 EN CARDIOMIOCITOS
EXPUESTOS A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO**

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

POR

CAROLA PATRICIA MALDONADO VERA

**DIRECTOR DE TESIS
DR. SERGIO LAVANDERO GONZÁLEZ**

**SANTIAGO-CHILE
2004**

A mis dos grandes amores

Pablo y Tomás

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de todo corazón el apoyo y cariño que mis padres (Roberto e Irene) me dieron y me dan en todo momento, los quiero mucho; su sacrificio dio frutos, gran parte de la persona que soy se los debo a ustedes. A mis hermanas, Mónica (monita) y Camila (cami), por el cariño y la comprensión cuando las necesito a mi lado, gracias por todo.

A Pablo por su amor, comprensión y paciencia. Pablo, sin tu apoyo dudo que hubiese logrado terminar esta tesis; gracias por tu apoyo técnico (figuras y procesamiento de resultados) y oportunas intervenciones. Te amo y nuevamente gracias. A Tomás, mi Tomito, tú iluminas mis mañanas y alegras mis días, gracias por existir.

Al Dr. Sergio Lavandero, por su confianza y sabios consejos cuando más los necesité. Gracias por invitarme a ser parte de su laboratorio y por haber guiado esta tesis. Gracias por enseñarme a confiar en mis cualidades como científica y a detectar y mejorar mis debilidades.

Al Dr. Guillermo Diaz (caballero) por su cariño y apoyo; gracias por los buenos consejos y momentos. Al Dr. Mario Sapag, por su sabiduría y cariño.

A los Drs. de mi comisión. Gracias por los sabios consejos y ayuda.

A mi familia en general. A mi Mama Rebeca, a mis tíos, a mis suegros (Pablo y Rebeca) y cuñados (Juan y Carolina), a Cristinne y Bastián. Gracias por todo.

A Loreto y Gabriel por su amistad. Loreto gracias por los buenos momentos y por tú apoyo en los momentos de crisis. Gracias por tu paciencia y apoyo. Gracias por todo, amiga.

A Tatiana por su amistad y apoyo; gracias por escucharme y por tu paciencia. A Andrés, Cristián y Coto; gracias por estar cuando los necesité y por los buenos momentos. Gracias amigos, junto a Loreto siempre seremos el “Grupo1”.

A Fabián Venegas, mi casi cuñado, por su amistad, cariño y ayuda. Gracias por todo.

A Fidel por su apoyo y amistad. Tú apoyo técnico es invaluable. Gracias por ayudarme con las tareas diarias en el laboratorio, por cuidarme y por ser mi amigo.

A Clarita, Alfredo, Verónica, Anita, Pancho, Dago, Jimena A., Jimena C., Maritza y Valentina. Gracias por su amistad y los buenos y malos momentos compartidos. A Mario por su amistad y apoyo; gracias por el soporte técnico y tus sabios consejos pediátricos.

A las secretarias de Postgrado y a Héctor. Gracias por su buena disposición y su cariño.

A Rosemary, las Paolas, Rodrigo V., Rodrigo T., Ariel, Hernán, Miguel, Dn. Jaime, Carlos, Jessica, Karen, Barbra y a todos los que de alguna manera estuvieron conmigo en esta etapa de mi vida. Gracias a todos.

Gracias a Dios.

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, Centro FONDAP Estudios Moleculares de la Célula, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

Proyecto FONDAP 15010006

Proyecto FONDECYT 1010246

Investigador Responsable: Dr. Sergio Lavandero G.

Proyectos Postgrado y postítulo de la Universidad de Chile:

PG 78/2001

PG 107/2002

Investigador responsable: Carola Maldonado V.

Proyecto De Investigadores Jóvenes Sociedad Chilena de Cardiología y Cirugía Cardiovascular 2002

Investigador responsable: Carola Maldonado V.

Beca CONICYT: 2001-2003

Beca Término de Tesis CONICYT: 2004

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Apoptosis del cardiomiocito.....	1
1.2. Señales reguladoras de la apoptosis.....	6
1.3. Estrés hiperosmótico: un potente agente inductor del proceso apoptótico y apoptosis del cardiomiocito.....	7
1.4. IGF-1: un agente que previene la apoptosis del cardiomiocito.....	8
1.5. Vías transduccionales pro y antiapoptóticas en el cardiomiocito.....	9
1.5.1. Sistema transduccional de la calmodulina kinasa (CaMK).....	13
1.5.2. Sistema transduccional de la calcineurina.....	14
1.6. Factor transcripcional CREB.....	16
1.6.1 Factor transcripcional CREB y apoptosis.....	19
1.6.2. Factor transcripcional CREB en el cardiomiocito.....	19
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Materiales.....	24
5.2. Material biológico.....	24
5.3. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas.....	25
5.4. Determinación de los niveles intracelulares de Ca ²⁺	25
5.5. Determinación de la actividad de CaMKII.....	27
5.5.1. Preparación de los extractos celulares.....	27

5.5.2. Ensayo de actividad de calmodulina kinasa.....	27
5.6. Determinación de la actividad de calcineurina.....	28
5.6.1. Preparación de los extractos celulares.....	28
5.6.2. Remoción del fosfato libre de los extractos.....	28
5.6.3. Ensayo de actividad de Cn.....	29
5.7. Transducción adenoviral.....	29
5.8. Determinación de la apoptosis en los cardiomiocitos.....	30
5.8.1. Evaluación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán.....	30
5.8.2. Determinación de la fragmentación del DNA en geles de agarosa.....	30
5.8.3. Determinación de la actividad de caspasas-3 y -9.....	31
5.8.4. Determinación de la externalización de fosfatidilserina en la membrana.	32
5.9. Determinación del grado de fosforilación de CREB.....	33
5.9.1. Preparación de los extractos celulares.....	33
5.9.2. Western blot.....	33
5.10. Determinación de la distribución subcelular de CREB.....	34
5.10.1. Preparación de fracciones citosólicas y nucleares.....	34
5.10.2. Western blot.....	35
5.11. Ensayos de retardo electroforético (EMSA y Supershift).....	36
5.11.1. Radiomarcación, separación y extracción de los oligonucleótidos.....	36
5.11.2. Geles de retardo electroforético (EMSA).....	37
5.11.3. Supershift.....	37
5.12. Expresión de los resultados y análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1. Participación de CREB en la regulación de la apoptosis del cardiomiocito.....	39
6.1.1. Efecto de la sobreexpresión de CREB mutado sobre las caspasas 3 y 9.....	39
6.1.2. Efecto de la sobreexpresión de CREB mutado sobre la fragmentación del DNA.....	40
6.1.3. Efecto de la sobreexpresión de CREB mutado en la viabilidad del DNA.....	40
6.2. Estudio de la activación de estrés hiperosmótico y/o IGF-1 sobre el factor transcripcional CREB.....	46

6.2.1. Efecto del estrés hiperosmótico sobre el factor transcripcional CREB.....	46
6.2.2. Efectos del IGF-1 sobre el factor transcripcional CREB.....	51
6.2.3. Efecto del estrés hiperosmótico en la activación de CREB dependiente de IGF-1.....	55
6.3. Regulación transduccional de la activación de CREB	58
6.4. Caracterización de los cambios temporo-espaciales en los niveles intracelulares de Ca ²⁺ inducidos por estrés hiperosmótico.....	63
6.5. Caracterización del origen del Ca ²⁺ intracelular movilizado por estrés hiperosmótico.....	66
6.6. Efecto de inhibidores de la vía del IP ₃ en la señal de Ca ²⁺ inducida por estrés hiperosmótico.....	70
6.7. Efecto del sorbitol sobre la actividad de CaMKII en cardiomiocitos en cultivo.....	72
6.8. Efecto del sorbitol sobre la actividad de Cn en cardiomiocitos en cultivo.....	74
6.9. Regulación transduccional de la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico.....	76
6.9.1. Activación de caspasa 3 y 9.....	76
6.9.2. Determinación de Anexina V.....	79
6.9.3. Fragmentación del DNA.....	81
6.9.4. Viabilidad celular.....	83
7. DISCUSIÓN.....	85
7.1. IGF-1 inhibe la apoptosis del cardiomiocito por estrés hiperosmótico a través de un mecanismo dependiente de CREB.....	87
7.2. CREB es activado por estímulos pro y antiapoptóticos.....	90
7.3. La regulación transduccional de CREB es dependiente de la naturaleza del estímulo.....	91
7.4. El estrés hiperosmótico aumenta los niveles intracelulares del Ca ²⁺	94
7.5. El estrés hiperosmótico y calmodulina quinasa.....	98
7.6. Estrés hiperosmótico y calcineurina.....	99
7.7. Participación de Ca ²⁺ , CaMKII y Cn en la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico.....	100

8. CONCLUSIONES.....	102
9. BIBLIOGRAFÍA.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Vías de activación del proceso apoptótico.....	5
Figura 2: Regulación de la apoptosis.....	12
Figura 3: Estructura de CREB.....	17
Figura 4: Activación de CREB.....	18
Figura 5: Modelo propuesto para participación de CREB en la apoptosis de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico	22
Figura 6: Aproximaciones experimentales para determinar la regulación de la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico.....	23
Figura 7: Expresión de una forma dominante negativa de CREB en Cardiomiocito.....	41
Figura 8: Efecto de la sobreexpresión de una forma mutada de CREB en la activación de caspasa-3.....	42
Figura 9: Efecto de la sobreexpresión de una forma mutada de CREB en La activación de caspasa-9.....	43
Figura 10: Efecto del dominante negativo de CREB en la fragmentación del DNA.....	44
Figura 11: Efecto de la sobreexpresión de una forma mutada de CREB en la viabilidad del cardiomiocito.....	45
Figura 12: Efectos del estrés hiperosmótico en la activación de CREB por fosforilación.....	48
Figura 13: Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de CREB.....	49
Figura 14: Efecto del estrés hiperosmótico en la unión de CREB a secuencia de consenso en ensayos de retardo electroforético (EMSA) y Supershift.....	50
Figura 15: Efecto del IGF-1 en la fosforilación de CREB.....	52
Figura 16: Efecto de IGF-1 en la distribución subcelular de CREB.....	53
Figura 17: Efecto del IGF-1 en la unión de CREB a su secuencia de consenso.....	54
Figura 18: Efecto del IGF-1 en la fosforilación de CREB inducida por estrés hiperosmótico.....	56

Figura 19:	Efecto del IGF-1 en la unión de CREB a su secuencia de consenso inducida por estrés hiperosmótico.....	57
Figura 20:	Efecto de inhibidores de vías transduccionales en la fosforilación de CREB estimulada por estrés hiperosmótico por sorbitol en el cardiomiocito.....	59
Figura 21:	Ca ²⁺ y vías dependientes de Ca ²⁺ /CaM en la fosforilación de CREB estimulada por estrés hiperosmótico por sorbitol en el cardiomiocito.....	60
Figura 22:	Efecto de inhibición de vías transduccionales activadas por IGF-1 en la fosforilación de CREB.....	61
Figura 23:	Ca ²⁺ y vías dependientes de Ca ²⁺ /CaM en la fosforilación de CREB inducida por IGF-1.....	62
Figura 24:	Efecto del estrés hiperosmótico en los niveles intracelulares de calcio en cardiomiocitos cultivados en medio que contenía calcio.....	64
Figura 25:	Efecto del estrés hiperosmótico en los niveles intracelulares de calcio en cardiomiocitos cultivados en medio libre de calcio...	65
Figura 26:	Efecto del BAPTA en los aumentos del calcio intracelular inducidos por el estrés hiperosmótico.....	67
Figura 27:	Efecto del nifedipino en el aumento de los niveles de Ca ²⁺ inducido por estrés hiperosmótico.....	68
Figura 28:	Efecto de rianodina en el aumento de los niveles de Ca ²⁺ inducido por estrés hiperosmótico.....	69
Figura 29:	Efecto de inhibidores de la vía del IP3 sobre la señal de Ca ²⁺ inducida por estrés hiperosmótico.....	71
Figura 30:	Actividad de la CaMKII en cardiomiocitos estimulados con estrés hiperosmótico.....	73
Figura 31:	Actividad de calcineurina en cardiomiocitos estimulados con estrés hiperosmótico.....	75
Figura 32:	Efecto de CsA, KN62 y BAPTA-AM en la activación de caspasa-3 inducida por estrés hiperosmótico.....	77
Figura 33:	Efecto de CsA, KN62 y BAPTA-AM en la activación de caspasa-9 inducida por estrés hiperosmótico.....	78
Figura 34:	Efecto de Efecto de CsA, KN62 y BAPTA-AM en la	

	externalización de fosfatidilserina inducida por estrés hiperosmótico.....	80
Figura 35:	Efecto de KN62 y CsA en la fragmentación del DNA inducida por estrés hiperosmótico.....	82
Figura 36:	Efecto de KN62, CsA y BAPTA-AM en la viabilidad de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.....	84
Figura 37:	Esquema hipotético de la señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico dependiente de sorbitol.....	89
Figura 38:	Esquema hipotético de la activación de CREB por estrés hiperosmótico.....	92
Figura 39:	Esquema hipotético de la activación de CREB por IGF-1.....	93
Figura 40:	Esquema hipotético del aumento del Ca^{2+}_i inducido por estrés hiperosmótico.....	97

ABREVIATURAS

Ad	: Adenovirus
AIP	: Péptido inhibidor de autocamtide-2
Ala	: Alanina
ANF	: Factor natriurético atrial
AIF	: factor inductor de apoptosis
Apaf-1	: factor 1 activador de proteasas apoptóticas
Arg	: Arginina
Asp	: Ácido aspártico
ATP	: Adenosina trifosfato
β -MHC	: Cadena pesada de miosina β
BAPTA-AM	: BAPTA-acetometil éster
BMK	: Gran proteína quinasa activada por mitógenos
BSA	: Albúmina de suero de bovino
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoxiuridina
°C	: Grado Celsius
Ca ²⁺	: Calcio
Ca ²⁺ i	: Calcio intracelular
Ca ²⁺ /CaM	: Calcio/calmodulina
cAMP	: Adenosina monofosfato cíclico
CBP	: Proteína de unión a CREB
CaM	: Calmodulina
CaMK	: Calmodulina quinasa
CaMKK	: Calmodulina quinasa quinasa
Cn	: Calcineurina
CRE	: elemento de respuesta a cAMP
CREB	: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico
CsA	: Ciclosporina A (inhibidor químico de calcineurina)
DD	: Dominio de muerte
DED	: Dominio efector de muerte
DME	: Medio Eagle's modificado Dulbecco
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DNA	: Acido desoxirribonucleico
DNAse I	: Desoxirribonucleasa I
EDTA	: Ácido etilen diaminotetraacético
EGTA	: Ácido etilén glicol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
EMSA	: Ensayo de movilidad electroforética
ERK	: Proteína quinasa regulada extracelularmente
ET-1	: Endotelina-1
FADD	: dominio de muerte asociado a Fas
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero de ternero
FITC	: Iso-tiocianato de fluoresceína
FT	: Factor transcripcional
g	: Gravedad
GH	: Hormona de crecimiento
Gln	: Glutamina
Glu	: Ácido glutámico
h	: Hora

HDACs II	: Histonas deacetilasas clase II
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
IAP	: Proteína inhibitoria de la apoptosis
IGF-1	: Factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1
IGF-1R	: Factor de crecimiento
iNOS	: Oxido nítrico sintasa inducible
JNK	: Kinasa n-terminal c-jun
Kda	: Kilo dalton
KN62	: Inhibidor químico de calmodulina kinasa II
Leu	: Leucina
LIF	: Factor inhibitorio de leucemia
LPS	: Lipopolisacárido
LTCC	: canales de Ca ²⁺ tipo L
Lys	: Lisina
MAPK	: Proteína kinasa activada por mitógenos
MEF2	: Factor activador del miocito tipo 2
MOI	: Multiplicidad de infección
MPTP	: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
min	: Minuto
mg	: Miligramo
μCi	: Microcurie
μg	: Microgramo
mL	: Mililitro
μL	: Microlitro
mM	: Milimolar
mm	: Milímetro
mOsm	: Miliosmolar
NE	: Norepinefrina
NFAT	: Factores nucleares de células T activadas
NO	: Oxido nítrico
nM	: Nanomolar
nm	: Nanómetro
NP-40	: Nodidet P-40
OA	: Acido okadaico
P	: Fosfato
PBS	: Tampón fosfato salino
PI	: Yoduro de propidio
PI3-K	: Fosfatidilinositol 3-kinasa
PIPES	: Ácido 1,4-piperazinadiethanosulfónico
PLB	: Fosfolambano B
PLC	: Fosfolipasa C
pmoles	: Picomoles
PMSF	: Fenilmetilsulfonifluoruro
PKA	: Proteína kinasa A
PKB	: Proteína kinasa B
PS	: Fosfatidil serina
RNAse A	: Ribonucleasa A
rpm	: Revoluciones por minuto
ROI	: Región óptica de interés
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
RyR	: Receptor de rianodina

s	: Segundos
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SEM	: Error estándar de la media
SOR	: Sorbitol
SRE	: Elemento de respuesta al suero
TBE	: Tampón Tris-Borato-EDTA
TCA	: Acido tricloro acético
TE	: Tampón Tris-EDTA
TES	: Tampón Tris-EDTA-NaCl
TFIIB	: Factor de transcripción de tipo II B
Thr	: Treonina
TNF	: Factor de Necrosis Tumoral
TNFR1	: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral tipo I
TRADD	: Dominio de muerte asociado a TNFR1
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
tRNA	: Acido rribonucleico de transferencia
UV	: Ultravioleta
V	: Volt
Val	: Valina
VSRM	: Mecanismo de liberación sensible a voltaje
vs	: Versus
WB	: Western blot

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todos los países desarrollados, incluyendo Chile. En los últimos años se ha sugerido que la pérdida de cardiomiocitos debido a muerte celular es un factor importante en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, no existe claridad acerca del mecanismo por el cual se produce la muerte de los cardiomiocitos y de su desaparición del tejido cardíaco. En el corazón se produce estrés hiperosmótico durante eventos de isquemia/reperfusión cardíaca. Existe un pobre conocimiento acerca de las vías de señalización cardíaca que conllevan a la muerte celular como una consecuencia del estrés osmótico. Nosotros hemos demostrado que el estrés hiperosmótico (sorbitol 600 mOsm) induce una rápida apoptosis en cardiomiocitos en cultivo. El futuro desarrollo de esta área requiere la identificación de moléculas que protejan a los cardiomiocitos de la muerte celular. En este aspecto, el agente más promisorio corresponde al factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1).

Algunas células poseen eficientes mecanismos reguladores involucrados en la mantención de la homeostasis, sin embargo el cardiomiocito es especialmente vulnerable a la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico debido a que regula su volumen muy lentamente. Aunque existe cierta caracterización molecular de los eventos desencadenados en la apoptosis inducida por sorbitol, se desconoce la participación del Ca^{2+} y de factores transcripcionales en este proceso.

El propósito de esta tesis fue estudiar los mecanismos de señalización que regulan la apoptosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. Con este objetivo, se estudió la actividad y regulación transduccional del factor transcripcional CREB en respuesta a IGF-1 y/o estrés hiperosmótico. CREB es un importante mediador de la supervivencia celular promovida por IGF-1 en otros tipos celulares. Por lo tanto se investigó la participación de CREB en la señalización antiapoptótica gatillada por IGF-1 en este modelo de estrés hiperosmótico. Además, se estudiaron los efectos del estrés hiperosmótico en cultivos primarios de cardiomiocitos, en términos de cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y en las actividades enzimáticas de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /CaM (Calmodulina quinasa II, CaMKII) y la proteína fosfatasa Calcineurina (Cn).

Los resultados presentados en este estudio demostraron que tanto el estrés hiperosmótico como IGF-1 conllevan a la activación de CREB, a través de su fosforilación, aunque probablemente por vías distintas. La activación de CREB por estrés hiperosmótico dependió de Ca^{2+}_i y las vías MAPK, ya que BAPTA-AM e inhibidores de las vías p38-MAPK y ERK impidieron el aumento de su fosforilación. Por otro lado, la preincubación de cardiomiocitos con BAPTA-AM o inhibidores de las vías p38-MAPK, ERK, PI3-K, Cn and CaMKII disminuyeron significativamente la fosforilación de CREB inducida por IGF-1. El estrés hiperosmótico bloqueó la activación de CREB inducida por IGF-1, con un patrón de activación similar al de el estímulo apoptótico. Finalmente, los resultados indicaron que CREB participa en la señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, pero no en la respuesta de sobrevivencia celular frente al estímulo osmótico. El efecto protector de IGF-1 frente a estrés hiperosmótico fue bloqueado por la expresión de una forma inactiva de CREB, como se demuestra con la mayoría de los parámetros apoptóticos evaluados en este estudio; sin embargo, la apoptosis inducida con este modelo experimental no presentó cambios significativos tras la sobreexpresión de CREB inactivo.

Los resultados, además, demostraron que el estrés hiperosmótico llevó a aumentos rápidos y transitorios de los niveles de Ca^{2+}_i , como resultado tanto del influjo de este ión desde el medio extracelular como de su liberación desde depósitos intracelulares. Este aumento del Ca^{2+}_i estuvo mediado al menos, por entrada de Ca^{2+} por canales de Ca^{2+} de tipo L y la liberación desde reservorios de Ca^{2+} activada por IP_3 . Los resultados también mostraron que la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares inducida por el estrés hiperosmótico depende de la activación de Fosfolipasa C (PLC).

El estrés hiperosmótico no produjo un aumento de las actividades enzimáticas CaMKII y Cn. El pretratamiento de los cardiomiocitos con KN62 (inhibidor de CaMKII) y CsA (inhibidor de Cn) no modificó significativamente la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico, evaluada en términos de viabilidad celular, fragmentación del DNA, activación de caspasa-3 y -9 y externalización de fosfatidilserina. Estos resultados sugieren que dichas vías de señalización probablemente no estarían involucradas en la regulación de la apoptosis desencadenada por el estrés hiperosmótico inducido por sorbitol.

De este trabajo de tesis se puede concluir que: 1) CREB participaría en la señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, pero no en la muerte inducida por este tipo de estrés; 2) el estrés hiperosmótico produce un aumento de los niveles Ca^{2+}_i como consecuencia del influjo de este ión desde el medio extracelular y de su liberación desde depósitos intracelulares; y finalmente, 3) CaMKII y Cn no participarían en la apoptosis inducida por el estímulo osmótico.

“CREB PARTICIPATION IN THE ANTIAPOPTOTIC IGF-1 SIGNALING PATHWAY IN CARDIOMIOCITES EXPOSE TO HIPEROSMOTIC STRESS”

SUMMARY

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in all developed countries, including Chile. In recent years, it has been suggested that loss of cardiomyocytes due to cell death is an important causative factor in the development of heart failure. However, the mechanism by which cardiomyocytes die and then disappear from the tissue is not clear. In the heart, osmotic stress occurs during myocardial ischemia/reperfusion. Cardiac signaling pathways leading to cell death as a consequence of osmotic stress remain poorly understood. We have shown that hyperosmotic stress (sorbitol 600 mOsm) rapidly induces apoptosis in cultured cardiomyocytes. Future development in this area will require the identification of molecules that protect cardiac cells from cell death. The most promising agent is insulin like growth factor-1 (IGF-1).

Several cells display efficient regulatory mechanisms involved in maintaining homeostasis, however cardiomyocyte is especially vulnerable to hyperosmotic stress-induced apoptosis since its volume is regulated very slowly. Although there is some molecular characterization of the events engaged in estrés hiperosmótico-induced apoptosis, the involvement of Ca^{2+} and transcription factors remains unknown.

The aim of this thesis was to study of the signaling mechanisms regulating hyperosmotic stress-induced apoptosis of cardiomyocyte. With that purpose, the activity and transductional regulation of transcriptional factor CREB in the response to IGF-1 and/or hyperosmotic stress were studied. Since CREB is an important mediator of IGF-1 promotion of cell survival in other cell types, the participation of CREB in the IGF-1-induced antiapoptotic signaling pathway during hyperosmotic stress was also investigated. In addition effects of sorbitol-induced hyperosmotic stress on primary cardiomyocyte cultures were studied, in terms of changes in Ca^{2+} intracellular levels, Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase (Calmodulin kinase II, CaMKII) and the protein phosphatase Calcineurin (Cn) enzymatic activities.

Data presented in this study showed that CREB activation (phosphorylation) was induced by both hyperosmotic stress and IGF-1, although most likely by different pathways. CREB activation by hyperosmotic stress depended on Ca^{2+}_i and MAPK pathways since BAPTA-AM and p38-MAPK and ERK pathway inhibitors prevented its phosphorylation. In the other hand, pretreatment of cardiomyocytes with BAPTA-AM or p38-MAPK, ERK, PI3-K, Cn and CaMKII pathway inhibitors significantly decreased CREB phosphorylation induced by IGF-1. Hyperosmotic stress prevented CREB activation IGF-1-induced, maintaining the activation pattern of DNA affinity displayed after the apoptotic stimulus. Finally, the results indicated that CREB participates in the IGF-1 antiapoptotic signaling in cardiomyocytes treated with hyperosmotic stress, but not in the cell survival response. The protective effect of IGF-1 towards sorbitol was overridden by the overexpression of an inactive form of CREB, as shown by most of the apoptotic parameters evaluated in this study; however, stress-induced apoptosis with this experimental model remained unchanged by overexpression of inactive CREB.

The results also showed that hyperosmotic stress led to fast and transient increases in intracellular Ca^{2+} levels, which were the result of both Ca^{2+} influx from the extracellular milieu and the release from intracellular stores. This Ca^{2+}_i increase was mediated in part by Ca^{2+} inward by L-type Ca^{2+} channels and release from stores by IP_3 receptors. Results also showed that hyperosmotic stress-induced Ca^{2+} release from intracellular stores was also dependent on PLC activation.

Hyperosmotic stress did not induce CaMKII and Cn enzymatic activities. Pretreatment of cardiomyocytes with KN62 (CaMKII inhibitor) and CsA (Cn inhibitor) did not modified significantly hyperosmotic stress-induced apoptosis, evaluated in terms of cell viability, DNA fragmentation, caspases-3 and -9 activation and phosphatidylserine externalization. These results suggested that these two signaling pathways were not likely implicated in the regulation of apoptosis triggered by sorbitol-induced hyperosmotic stress.

Conclusions drawn from this thesis work are: 1) CREB most likely is involved in IGF-1 antiapoptotic signal in cardiomyocytes subjected to hyperosmotic stress but not in this type of stress-induced cell death; 2) hyperosmotic stress leads to an increase in intracellular Ca^{2+}

levels due to both influx from the extracellular milieu and release from intracellular stores; and finally, 3) CaMKII and Cn are not likely to be involved in this osmotic stimulus-induced apoptosis.

1. INTRODUCCION

El corazón es una bomba mecánica compuesta por diversos tipos celulares. Los cardiomiocitos y los fibroblastos dan cuenta del 33 y 66% del total de las células cardíacas, respectivamente (1). Los cardiomiocitos, protagonistas centrales en el proceso de contracción cardíaca, son células especializadas que cesan de dividirse casi inmediatamente después del nacimiento (2). Esta restricción evolutiva hace del tejido cardíaco un órgano particularmente vulnerable a eventos isquémicos, tóxicos e inflamatorios.

1.1. Apoptosis del cardiomiocito

La apoptosis junto a la paraptosis, autofagia y necrosis constituyen las formas de muerte celular conocidas hasta la fecha (3). La apoptosis se definió inicialmente por criterios morfológicos tales como disminución del volumen celular, fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. En las células apoptóticas, a diferencia de las necróticas, la membrana plasmática mantiene completamente su integridad hasta su remoción, evitando así el vaciamiento de su contenido intracelular y el desarrollo de un estado inflamatorio. La apoptosis o muerte celular programada se define como un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución, regulado genéticamente y dependiente de energía, en el que la propia célula decide y ejecuta su autodestrucción, conduciendo a su eliminación selectiva sin daño alguno en las células vecinas (4, 5).

La eliminación controlada de células es vital para el desarrollo de los distintos órganos y supervivencia bajo condiciones de estrés. Sin embargo, cuando la apoptosis no está balanceada con el proceso de proliferación celular como en el miocardio, hay alteraciones en la homeostasis tisular. Los cardiomiocitos experimentan muerte celular programada en respuesta a una amplia variedad de estímulos nocivos, pudiendo conducir directamente al desarrollo de diversas cardiomiopatías y muerte (6, 7). La función cardíaca normal requiere una estrecha interacción entre metabolismo, función contráctil y expresión génica. La interdependencia entre los aspectos mencionados se realiza a través de señales, sensores, transductores y efectores específicos.

La insuficiencia cardíaca es la fase final de varias enfermedades cardíacas. La disfunción mecánica del corazón puede ser causada por variados factores como son acumulación en el espacio extracelular de constituyentes de la matriz extracelular, alteración

en el acoplamiento excitación-contracción, alteración en el mecanismo de almacenaje de energía, disminuida expresión de proteínas contráctiles, enzimas metabólicas y bombas iónicas. El papel de la apoptosis en la génesis y desarrollo de enfermedades cardíacas y en especial de la insuficiencia cardíaca e infarto al miocardio ha motivado investigaciones dado que es una causa potencialmente irreversible del deterioro cardíaco funcional (8-10).

Entre los estímulos inductores apoptóticos en el cardiomiocito están radicales del oxígeno, óxido nítrico), factores de crecimiento, citoquinas (Fas-ligando y TNF- α), estrés mecánico inducido por estiramiento, estrés hiperosmótico, doxorubicina, metabolitos de esfingolípidos (ceramidas) y diversos péptidos (ej. angiotensina II) (11-15). Dado que la apoptosis de los cardiomiocitos contribuye a una progresiva falla en la actividad contráctil del miocardio, a arritmias y remodelamiento cardíaco; el conocimiento de los mecanismos y blancos moleculares asociados a la apoptosis puede entregar nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades cardíacas. Los cardiomiocitos poseen toda la maquinaria bioquímica necesaria para su suicidio celular y activación de este proceso en respuesta a una amplia gama de estímulos.

Las etapas iniciales del proceso apoptótico en los cardiomiocitos (Figura 1), ocurren principalmente a través de dos vías transduccionales independientes:

- **Vía extrínseca o mediada a través de receptores de muerte.** Esta ruta transduccional se activa por ligandos externos que se unen a integrantes de la superfamilia de receptores de muerte, de los cuales Fas (también conocido como APO-1/CD95) y TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1) son los mejores ejemplos. Estos receptores de transmembrana interactúan físicamente en forma directa con otros elementos transduccionales formando el complejo denominado DISC, a través de los dominios de muerte DD, DED y CARD, secuencias específicas indispensables para la interacción con otras proteínas apoptóticas que conducen al reclutamiento de proteasas intracelulares específicas conocidas como caspasas (5, 9, 16). La unión de Fas ligando (FasL) o del TNF- α a sus receptores induce la trimerización y agregación de estos últimos, conduciendo a la activación de la caspasa-8, la cual a su vez activa a la caspasa-3. Después de la unión al receptor, los dominios de muerte actúan como sitios de anclaje para la interacción con proteínas citoplasmáticas que contienen dominios FADD (Fas-associated death

domain protein) y TRADD (TNFR1-associated death domain protein). FADD se une directamente a Fas y también es reclutada a TNFR1 y posiblemente, a otros receptores relacionados. El dominio efector de muerte en el N-terminal interactúa luego con un motivo relacionado en el prodominio de las caspasas 8 y 10. La activación de estas proteasas por proximidad, gatilla una cascada proteolítica para llevar a cabo la ejecución de la apoptosis (16). Tanto Fas como TNFR-1 se expresan en los cardiomiocitos y se inducen por estrés oxidativo producido en la hipoxia, reoxigenación. Sin embargo, los antecedentes actuales sugerirían que esta vía no juega un papel crítico en la decisión de activar la apoptosis del cardiomiocito (16).

- **Vía intrínseca o mitocondrial.** Diversos estudios sugieren que los principales cambios en este proceso ocurren en la mitocondria. La mitocondria contiene un vasto arsenal de sustancias, altamente letales, que inician la apoptosis cuando se liberan al citosol. Entre ellas se cuentan al citocromo c, factor inductor de la apoptosis (AIF), endonucleasa G y las proteínas Smac/Diablo. El citocromo c junto a la procaspasa-9, ATP y la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de proteasas apoptóticas) forman el apoptosoma que por proximidad física conduce al procesamiento de la procaspasa-9 a caspasa-9 y la posterior activación de la caspasa-3, proteasa crítica en la ejecución de las etapas tardías del proceso apoptótico (5,9). La vía apoptótica tipo II se activa en el cardiomiocito en respuesta a privación de suero y glucosa, estrés redox y activación constitutiva de $G\alpha_q$. Esta mayor vulnerabilidad del cardiomiocito, no es extendible a todo músculo rico en mitocondria ya que los miocitos esqueléticos no poseen APAF-1 y no experimentan muerte celular dependiente del citocromo c (17, 18).

Durante la apoptosis, la mitocondria sufre cambios importantes en la integridad de sus membranas externa e interna, este proceso eventualmente conduce a la pérdida de potencial interno y a la liberación de proteínas proapoptóticas. Dado que en especial la salida del citocromo c es un paso crítico en la formación del apoptosoma, existen diversos mecanismos regulatorios de su liberación desde la mitocondria. Existen evidencias que la liberación del citocromo c podría estar asociada a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP); un gran canal no selectivo localizado en la membrana externa mitocondrial. La apertura de este poro resulta en una rápida pérdida de potencial de membrana,

hinchamiento de la mitocondria, liberación del citocromo c y muerte celular por apoptosis. Los inhibidores farmacológicos del MPTP actúan como potentes bloqueadores de la liberación del citocromo c y, a su vez, previenen la apoptosis. Sin embargo, hay antecedentes que la salida del citocromo c puede ocurrir en ausencia de pérdida del potencial de membrana, es decir cuando el poro está cerrado, lo cual ha sugerido que el MPTP no es el único regulador de la liberación de citocromo c desde la mitocondria (19,20). Las proteínas de la familia Bcl2 son importantes reguladores de la apoptosis a nivel de la mitocondria, controlando la integridad de su membrana. Se subdividen en tres subfamilias, una antiapoptótica y otras dos proapoptóticas. Algunas proteínas Bcl-2 se asocian a proteínas del poro MPTP y regulan la liberación del citocromo c. Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl2 se asocian y neutralizan entre sí, de manera que el balance relativo entre estos efectores determina la decisión entre la vida y la muerte celular (21, 22). En el cardiomiocito, algunas proteínas Bcl-2 son reguladas a nivel transcripcional, mientras que otras son moduladas post-transduccionalmente ya sea por fosforilación, ubiquitinación, etc. que pueden conducir a su degradación y/o cambios en su distribución subcelular (9). En diferentes formas de estrés miocárdico tales como exposición al óxido nítrico, LPS, sobrecarga hemodinámica, estiramiento mecánico e hipoxia-reoxigenación, los niveles de las proteínas Bcl-2 experimentan complejas alteraciones. Diversos estudios han mostrado que los niveles de estas proteínas aumentan en respuesta al estrés y que sólo bajo algunas condiciones participarían en la liberación del citocromo c. El potencial terapéutico de las proteínas de esta familia está, hoy en día, siendo investigado y se espera que a través de su regulación, se atenúe el proceso apoptótico en diversas enfermedades cardíacas.

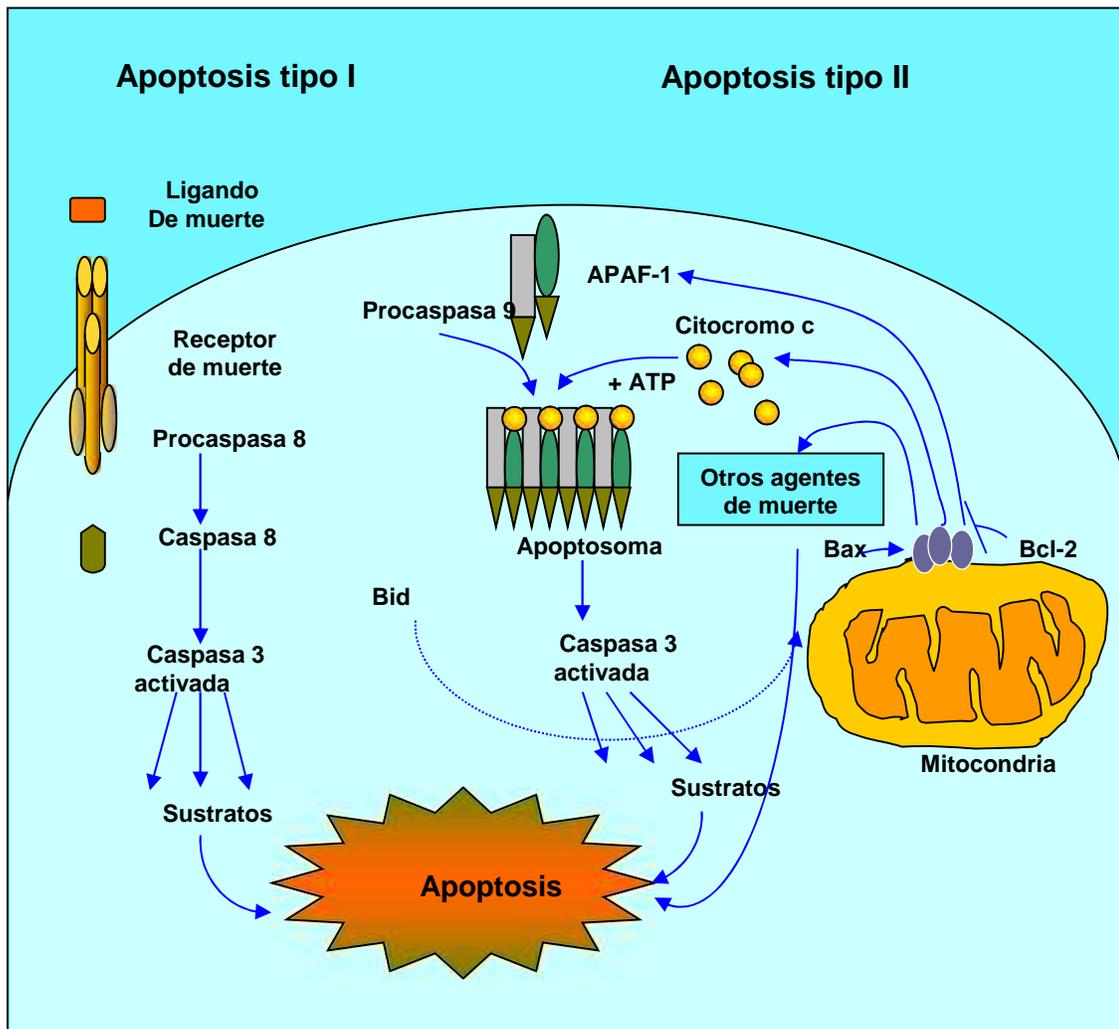


Figura 1. Vías de activación del proceso apoptótico. La apoptosis de cardiomiocito se activa por dos vías: la de tipo I, conocida también como vía extrínseca o mediada por receptores de muerte; y la de tipo II, denominada también como intrínseca o mitocondrial. Aunque la activación de las dos vías es diferente, ambas convergen en un efector final, la caspasa-3.

1.2. Señales reguladoras de la apoptosis

En varios tipos celulares, los factores de crecimiento median tanto las respuestas de proliferación como las de supervivencia celular. En los cardiomiocitos, existe ambigüedad en los factores de crecimiento que promueven su supervivencia o muerte. La carga hemodinámica es, probablemente, la señal reguladora más importante del crecimiento del cardiomiocito y, paradójicamente, puede activar o inhibir la apoptosis (23).

Ciertas neurohormonas y citoquinas; cuyos sistemas de transducción de señales están asociados a receptores acoplados a la proteína G (agonistas α_1 - y β_1 -adrenérgicos, angiotensina II y endotelina-1) activan el crecimiento hipertrófico del cardiomiocito. Sin embargo, se sabe que la sobreactivación de estos receptores produce más bien el desarrollo de un proceso apoptótico más que hipertrófico. La capacidad de algunos agentes hipertróficos, tales como el factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1) y la cardiotrofina-1, para promover la supervivencia celular se ha correlacionado con la activación de la vía de la fosfatidilinositol 3-kinasa/proteína quinasa B (PI3K/PKB). De esta manera se pueden discriminar en estímulos anti o proapoptóticos, según las vías de transducción que estos agentes activen durante su señalización (24, 25).

En los pacientes con insuficiencia cardíaca hay una actividad aumentada del sistema nervioso simpático. La norepinefrina (NE), el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático, actúa sobre los receptores α y β adrenérgicos. Estudios farmacológicos *in vitro* en cultivos de cardiomiocitos han mostrado que los receptores β -adrenérgicos regulan la apoptosis, estimulándola o inhibiéndola (26, 27). Por otra parte, cardiomiocitos de ratas adultas expuestos a NE por 24 h muestran cambios asociados a la apoptosis. Los efectos apoptóticos de NE son imitados por agonistas β -adrenérgicos y mediados por activación de la proteína quinasa A, requiriéndose además la entrada de Ca^{2+} a través del canal de calcio dependiente de voltaje (28). Sin embargo, la participación de la estimulación β -adrenérgica en la apoptosis del cardiomiocito es controversial. Mientras unos afirman que la estimulación β -adrenérgica estimula la apoptosis, otros indican que ella la inhibe. Hay evidencias que los receptores β_1 -adrenérgicos estimulan la apoptosis y que los β_2 estimulan o inhiben este proceso (29). En cambio, los receptores β_3 -adrenérgicos miocárdicos se han relacionado más con estímulos apoptóticos que con los antiapoptóticos (30).

El NO, un mensajero producido por un desbalance redox intracelular, es letal para los cardiomiocitos neonatos y adultos; así, algunas citoquinas ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN\gamma$) son proapoptóticas debido a que inducen la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la subsecuente producción del NO. La cogeneración del NO y del anión superóxido en la mitocondria conduce a la producción localizada de peroxinitrito y liberación de citocromo c, generando como efecto neto un aumento de la apoptosis. Sin embargo, el papel del NO en la apoptosis es aún controversial ya que a altas concentraciones se considera un anti-apoptótico (a través de la inhibición de caspasas por nitrosilación) o un pro-apoptótico (activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa) (31).

1.3. Estrés hiperosmótico: un potente agente inductor del proceso apoptótico en el cardiomiocito

Una característica propia de estados patológicos tales como isquemia, shock séptico y coma diabético son los cambios osmóticos del medio extracelular. Para tolerar los cambios en osmolaridad, las células han desarrollado mecanismos regulatorios de volumen celular, los cuales son activados por cambios osmóticos y cuya finalidad es normalizar el volumen celular y mantener la función normal. En primera instancia, la regulación del volumen se lleva a cabo modulando el contenido iónico intracelular y en el largo plazo, la regulación cursa vía metabolismo y crecimiento (32). Durante un período en la isquemia del miocardio se ha visto que el corazón sufre estrés hiperosmótico, y que en otros tipos celulares este tipo de estrés induce apoptosis.

La isquemia del miocardio es un proceso patológico que presenta diferentes formas de estrés extremo en el cardiomiocito que resulta en una muerte celular extensiva. Durante el proceso isquemia-reperfusión, los metabolitos se acumulan en el medio externo, generando un medio extracelular hiperosmótico que causa apoptosis. Este medio hiperosmótico debe ser rápidamente reemplazado por sangre normosmótica después de la perfusión, causando rápidos cambios en la osmolaridad del medio que rodea a las células cardíacas (33). En nuestro laboratorio se demostró que el estrés hiperosmótico dependiente de sorbitol induce apoptosis del cardiomiocito, la cual es dependiente del osmolito utilizado y es atenuada por el factor de crecimiento IGF-1 (34-36). La importancia fisiopatológica y las vías de señalización intracelulares que detectan y transducen las señales de volumen durante el proceso de regulación del volumen celular en el corazón se presentan como un nuevo e

importante campo de investigación y, los avances que se puedan hacer en este evento celular pueden llegar a ser de vital importancia en el entendimiento de la fisiopatología cardíaca, específicamente, en la isquemia-reperfusión. Los cardiomiocitos no recuperan su volumen normal tan rápido como lo hacen otros tipos celulares (carecen de un aumento de volumen regulatorio) cuando son expuestos a estrés hiperosmótico o en respuesta a reintroducción de un medio isosmótico seguido a un cambio hiposmótico (33). En esta evidencia yace la importancia de estudiar los eventos moleculares que llevan al cardiomiocito a morir por apoptosis frente al estrés hiperosmótico y cuáles son los blancos moleculares que pueden revertir la inevitable pérdida celular que ocurre como consecuencia de la isquemia.

1.4. IGF-1 : un agente que previene la apoptosis del cardiomiocito

El factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1) es un péptido de 70 aminoácidos con gran similitud estructural a la insulina y producido en forma endocrina por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento (GH), secretada desde la adenohipófisis (37). Sin embargo, IGF-1 también puede ser generado localmente por mecanismos auto y/o paracrinos en varios tipos celulares en forma autónoma a GH (38).

El IGF-1 ejerce sus acciones biológicas a través de su interacción con receptor de membrana denominado IGF-1R, los cuales tiene gran homología estructural con el receptor de insulina. Ambos receptores son heterodímero $\alpha_2\beta_2$, en la que la subunidad α participa en el reconocimiento del ligando mientras que la subunidad β , que posee actividad catalítica tirosina kinasa intrínseca, esencial en la activación de una compleja red de señalización intracelular conformada por las vías MAPKs (ERKs, JNK y p38-MAPK), PLC-PKC y PI3K/PKB (39,40).

Este péptido y su receptor están presentes en el miocardio de rata, donde regula en forma autocrina y paracrina el crecimiento por hipertrofia de los cardiomiocitos (41). Además, diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, han mostrado que IGF-1 atenúa la apoptosis del cardiomiocito inducida por diversos estímulos extracelulares (privación de suero, exposición a doxorubicina, angiotensina II, hipoxia, estiramiento mecánico y exposición a estrés hiperosmótico) (34,42). Nuestro laboratorio ha descrito que IGF-1 protege al cardiomiocito de la apoptosis estimulada por estrés hiperosmótico a través

de la activación de, al menos, las vías de las ERK, PI3-K/PKB y p38-MAPK (43,44). Por otra parte, existen antecedentes recientes que calcio es un importante segundo mensajero de la acción del IGF-1. Se ha documentado que este factor de crecimiento aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} en el cardiomiocito, ya sea estimulando la actividad de canales de Ca^{2+} cardíacos (45) y/o su liberación desde reservorios intracelulares por un mecanismo dependiente de PLC-IP3 (46)

Se desconocen los factores transcripcionales blancos de las vías de transducción del IGF-1 en el cardiomiocito, pero investigaciones realizadas en otros tipos celulares han descrito la participación de algunos que, tal vez, también podrían funcionar en los cardiomiocitos. CREB ha sido uno de los principales factores de transcripción involucrado en neuronas, donde se ha estudiado extensamente el efecto antiapoptótico de IGF-1.

1.5. Vías transduccionales pro y anti-apoptóticas en el cardiomiocito

Las células responden a varios estímulos activando una o más vías de señalización intracelular (Figura 2); una de las vías que ha sido más ampliamente estudiada por su participación en la apoptosis es la vía de las MAPKs. Estas kinasas corresponden a una serie de proteínas que regulan por fosforilación a un conjunto diverso de sustratos que controlan la transcripción de genes y la síntesis de proteínas. Las MAPKs se dividen en tres subfamilias: las proteínas kinasas activadas extracelularmente (ERK), las proteínas activadas por estrés (JNK) y las proteínas kinasas p38 (p38-MAPK) (47). Recientes estudios relacionan a las MAPKs con la apoptosis, pero los papeles precisos de las tres principales vías en la regulación de la apoptosis no están claros y dependen del tipo celular específico (48-50).

Las MAPKs cardíacas, especialmente en el cardiomiocito, se activan por diversos estímulos tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, el papel que cumple cada una de ellas en la apoptosis del cardiomiocito aún no está del todo claro (50). La subfamilia ERK, que comprende a las ERK1/2 y ERK5, es necesaria para la señalización antiapoptótica e hipertrófica del cardiomiocito. Su papel en la hipertrofia es más controversial que en la apoptosis. Este sistema transduccional protege al cardiomiocito de la apoptosis, inhibiendo a los componentes de la maquinaria de muerte celular y/o aumentando la transcripción de genes antiapoptóticos (50, 51). Las acciones cardioprotectoras del IGF-1 se transducen

parcialmente a través de esta vía, donde su activación controla a diversos factores transcripcionales que regulan la expresión de proteínas antiapoptóticas (52).

Las proteínas p38-MAPK y JNK responden a estímulos de estrés tales como calor, agentes químicos, estrés oxidativo y osmótico, pH, hipoxia, privación de factores de crecimiento y radiación UV. Las vías reguladas por estas proteínas kinasas contribuyen de manera importante a la apoptosis, pero claramente dependen del estímulo y tipo celular. El papel de p38-MAPK en la apoptosis del cardiomiocito es un rompecabezas ya que esta proteína kinasa puede mediar también la hipertrofia por IGF-1. Su participación en la regulación de la apoptosis es dual y depende de la isoforma implicada en la señalización de un estímulo extracelular (53). Bajo estímulos hipertroáficos en los cardiomiocitos se activan las dos isoformas de p38-MAPK y el balance entre la señalización de cada una podría determinar si estas células se hipertrofian o mueren por apoptosis (54). En la glándula mamaria de rata p38-MAPK media los efectos apoptóticos del estrés hiperosmótico (55), mientras en neuronas, la activación de la vía p38-MAPK se presenta como una señal antiapoptótica (56). Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que esta vía se activa tanto por IGF-1 como por estrés hiperosmótico, pero la vía JNK sólo se activa en respuesta al este último estímulo. Se ha descrito que la apoptosis en respuesta a privación de factores de crecimiento activa más a p38-MAPK que a JNK (49, 57, 58) y que la activación específica de la vía JNK en el cardiomiocito induce características típicas de hipertrofia, mientras la co-activación de las vías JNK y p38-MAPK inducen alteraciones fenotípicas características de la apoptosis (57). La activación de la vía JNK, por sí sola, no es suficiente para inducir la apoptosis en el cardiomiocito. El mecanismo por el cual JNK induce apoptosis aún no ha sido aclarado pero su activación por hipoxia se asocia con el factor transcripcional p53 y apoptosis. Sin embargo, otros investigadores sostienen que p53 no participa relevantemente en la muerte celular inducida por hipoxia (51,58).

En varios tipos celulares se ha demostrado que las señales de supervivencia y antiapoptóticas son mediados por la vía de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-K)-proteína kinasa B (PKB). La PI3-K activa a la PKB vía PDK1, la cual suprime la apoptosis a través de la fosforilación de BAD, inducción de proteínas de la familia Bcl-2, inhibición de la liberación del citocromo c desde la mitocondria y fosforilación e inactivación de la caspasa-9 y del factor transcripcional FHRL, etc (59-62). La señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión cursa a través de la vía PI3-K/PKB,

bloqueando la apoptosis mediante la inhibición de la liberación del citocromo c desde la mitocondria e impidiendo la activación de la caspasa-3 (61). Interesantemente, en neuronas, la señalización antiapoptótica del IGF-1 cursa a través de la vía PI3-K /PKB/ factor transcripcional CREB, el cual induce la transcripción del gen bcl-2 (59).

El Ca^{2+} es un transductor crítico en la señalización celular ya que como segundo mensajero regula diversas funciones, entre las que se incluyen contracción de los músculos cardiaco, esquelético y liso, liberación de hormonas y neurotransmisores, proliferación y sobrevivencia celular (63). Su participación como mensajero intracelular depende de la intensidad, frecuencia, fuente y localización de la señal de Ca^{2+} en la vía transduccional específica en la que participa. Las células sólo controlan las concentraciones de este ión ya que generan dichas señales, utilizando tanto el Ca^{2+} externo como el almacenado en los reservorios intracelulares (64).

La desregulación de la homeostasis del calcio intracelular conduce a una pérdida del mecanismo de control fisiológico y, por lo tanto, a cambios patológicos en el crecimiento celular (65). En el músculo cardiaco, calcio tiene un papel central en la regulación de la contracción, expresión génica, hipertrofia y apoptosis (66). Su participación en la apoptosis cardiaca lo relaciona directamente con la mitocondria; uno de los eventos más importantes en la apoptosis, en general, es la activación de las caspasas la cual es dependiente de los cambios mitocondriales, específicamente la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) (67). Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la mitocondria y el retículo sarcoplásmico (principal reservorio de Ca^{2+}) en cardiomiocitos (67). En estas células la integridad y componentes mitocondriales son sutilmente controlados por los niveles de Ca^{2+} ; altas concentraciones de este ión inducen la apertura del PTP, disipación del potencial de la membrana mitocondrial, disminución de la producción de ATP y salida del citocromo c, el cual junto a otros factores citosólicos promueve la activación de las caspasas (67,68).

La calmodulina (CaM) es uno de los sensores intracelulares de Ca^{2+} más importante y media los cambios en la expresión de genes, regulando las actividades de diversos efectores transduccionales, principalmente a las proteínas kinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM (CaMKs) y la fosfatasa calcineurina (Cn) (69).

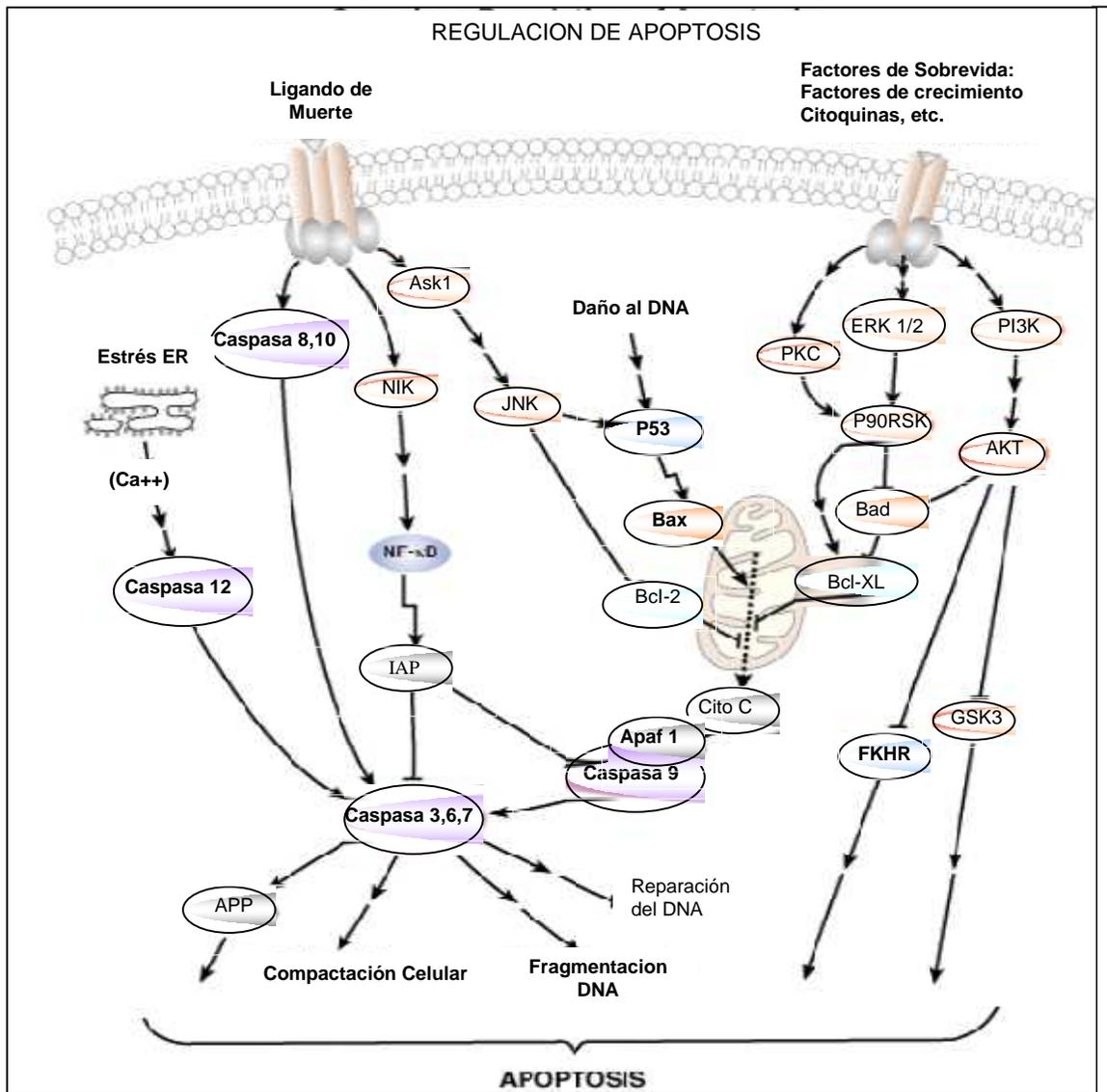


Figura 2. Regulación de la apoptosis. La activación de la apoptosis vía los receptores de muerte activa a la caspasa-8 y a una serie de proteínas quinasas. Algunas formas de estrés, por ejemplo daño al DNA inducen al factor transcripcional p53 que controla la expresión de proteínas proapoptóticas. Los factores de supervivencia celular, como IGF-1 y cardiotropinas, activan una serie diferente de proteínas quinasas, lo que se traduce en un aumento de la expresión de proteínas antiapoptóticas. El balance neto de entre las señales inductoras de la apoptosis y cardioprotectoras, controlará finalmente la activación de las caspasas ejecutoras de la apoptosis. RE: retículo endoplásmico.

1.5.1. Sistema transduccional de la calmodulina kinasa (CaMK)

Las CaMKs que pertenecen a la familia de las serina-treonina kinasas multifuncionales activadas por aumentos en los niveles del Ca^{2+} intracelular en presencia de calmodulina, están constituidas por una región catalítica, un dominio regulatorio central que contiene un dominio autoinhibitorio, una región con motivos de unión a Ca^{2+} y CaM, una región variable y un dominio de asociación carboxilo terminal. En contraste a CaMKI y CaMKIV, que comparten entre sí una estructura similar, la ubicuamente expresada CaMKII es una holoenzima constituida por proteínas oligoméricas de 12 subunidades (50-60 KDa), distribuidas en 2 anillos hexaméricos como (70-73). Para lograr su activación máxima, las CaMKs, requieren ser fosforiladas por la calmodulina kinasa kinasa (CaMKK), una vez activadas, fosforilan a distintos factores transcripcionales y participan en eventos tan variados como contracción, reordenamiento de la cromatina, transmisión sináptica, apoptosis e hipertrofia (72,74,75). La regulación de las CaMK involucra además, desfosforilación e inactivación por diferentes proteínas fosfatasas (71).

CaMKs en cardiomiocitos, se colocan con los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCC) unidos a la membrana celular y el receptor de rianodina (RyR), coordinando la interacción de estos dos componentes durante la excitación. CaMKs participa en la regulación del mecanismo de liberación sensible a voltaje (VSRM) en cardiomiocitos ventriculares y es un switch molecular en el acoplamiento excitación-contracción cardíaca (76). El papel de CaMKs está más claro en el proceso hipertrófico; se ha demostrado que las CaMKs I y IV inducen respuesta hipertrófica independiente de cual sea el estímulo que produzca el aumento de Ca^{2+} en los cardiomiocitos, en cambio CaMKII puede inducir o silenciar la expresión de genes hipertróficos dependiendo del estímulo que active las vías transduccionales dependientes de Ca^{2+} (77).

Las vías de señalización de CaMKs en la apoptosis han sido principalmente estudiadas en células neuronales y no se conoce acerca de su participación en la apoptosis de otros tipos celulares. En un estudio se describe un mecanismo neuroprotector donde participa la CaMKIV; la entrada en apoptosis de células neuronales se ha asociado a la degradación de CaMKIV por caspasa-3 y calpaina. El flujo de Ca^{2+} previene este efecto y promueve la supervivencia neuronal, manteniendo un nivel constitutivo de expresión génica dependiente de CaMKIV/CREB (78).

CaMKII en fibroblastos es necesaria para la progresión del ciclo celular a través de G1 y opera en un sitio común en las señales transduccionales de crecimiento y supervivencia, lo cual hace pensar que estos componentes participarían en distintas vías (convergencia de diversas vías) y los eventos y blancos posteriores y los efectos de la cascada en particular dependerían del estímulo que está recibiendo la célula en ese momento (74). Por otra parte, Wei-Zhong Zhu y cols han estudiado la relación entre el receptor β_1 -adrenérgico y CaMK, descubriendo que CaMKII induce apoptosis en el cardiomiocito a través del receptor β_1 -adrenérgico y su activación es independiente de la vía clásica a través de proteína kinasa A (PKA) y AMP cíclico (cAMP) (73).

Los antecedentes recopilados, muestran a las CaMKs como importantes reguladores en la apoptosis, generalmente, como inhibidores de este evento celular. Tal vez y dependiendo del tipo celular, estas proteínas regulan positivamente la apoptosis, es decir, su activación induce la expresión de genes apoptóticos y/o activación de vías proapoptóticas.

1.5.2. Sistema transduccional de la calcineurina

Calcineurina (Cn), también conocida como proteína fosfatasa 2B, es una serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y CaM y a diferencia de otras fosfatasas, en linfocitos por ejemplo se activa por aumentos sostenidos, y no transitorios, de los niveles intracelulares de Ca^{2+} de baja frecuencia. La holoenzima activa está constituida por la subunidad catalítica (CnA), una proteína ligante denominada calcineurina B (CnB) y la CaM (79).

Las acciones de Cn dependen de una variedad de proteínas efectoras que influyen su actividad enzimática, distribución subcelular y estabilidad (61). Aunque Cn regula una amplia variedad de respuestas biológicas y expresión génica en diversos tipos celulares y sus sustratos son ubicuos, particularmente en el músculo cardíaco y esquelético tiene funciones diferentes (80). Los mecanismos a través de los cuales Cn regula la homeostasis celular se describieron originalmente en los sistemas inmune y nervioso, y se atribuyeron a su acción sobre la familia de factores transcripcionales denominados NFATs (81). En respuesta a aumentos sostenidos de calcio, Cn activa una variedad de blancos distintos de NFAT, los que incluyen al factor apoptótico Bad y los factores transcripcionales MEF2 y NF- κ B (82).

En el corazón, Cn es un transductor crítico de las señales de Ca^{2+} que gobiernan el

crecimiento cardiaco durante el desarrollo y en enfermedades (80). En los cardiomiocitos esta bien documentada su participación en el proceso hipertrófico (83). La actividad de Cn aumenta en respuesta a estímulos hipertróficos como son la infusión β -adrenérgica, sobrecarga de presión y ejercicio (82,84). La conexión entre Cn y otras vías transduccionales (PKC y JNK) que gobiernan el crecimiento del cardiomiocito también contribuyen a los efectos de esta fosfatasa en el crecimiento (85,86).

En los últimos años se ha relacionado a Cn con la apoptosis en distintos tipos celulares, entre ellos el cardiomiocito. Estudios en neuronas, linfocitos y líneas celulares provenientes de células cancerígenas, demostraron que calcineurina participa en vías de señalización tanto pro como anti-apoptóticas. (86).

La participación de Cn en la apoptosis del cardiomiocito es un tanto controversial, mientras algunos investigadores apoyan su papel apoptótico, otros defienden sus efectos antiapoptóticos (87). Un ejemplo de esto último son las investigaciones que muestran que Cn promueve la apoptosis del cardiomiocito por desfosforilación de la proteína apoptótica BAD, desestabilizando la membrana mitocondrial (88). Sin embargo, la activación de Cn se asocia a la fosforilación de PKB, la cual estabiliza la membrana mitocondrial por fosforilación de BAD (89). También existen otros estudios que apoyan la hipótesis que la activación de Cn es, generalmente, citoprotectora en los cardiomiocitos (87,89). Si Cn regula directamente la expresión de la maquinaria celular antiapoptótica o si su activación simplemente antagoniza la apoptosis como una consecuencia secundaria del inicio del programa hipertrófico es un asunto que aún requiere de mayor investigación.

A pesar de la creciente literatura que existe sobre la regulación transduccional de la apoptosis en el cardiomiocito, poco es lo que se conoce acerca de su regulación a nivel transcripcional y cuales son los factores involucrados en los procesos de sobrevida y muerte celular. Dentro de los factores descritos que regulan la apoptosis en otros tipos celulares, CREB se presenta como un importante factor transcripcional que se activa frente a estímulos apoptóticos y frente a agentes antiapoptóticos, siempre favoreciendo la sobrevida celular.

1.6. Factor transcripcional CREB

Hasta el momento no se conoce mucho de los factores transcripcionales que regulan la apoptosis del cardiomiocito, especialmente aquellos controlados por Ca^{2+} . Se ha postulado la participación de diversos factores transcripcionales durante el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, desconociendo si ellos participan también en la apoptosis. Un emergente e importante factor transcripcional que regula la apoptosis en diversos tipos celulares y cuya participación en este proceso ha sido ampliamente estudiado en neuronas, es el factor transcripcional CREB (90-93).

La proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB) es una proteína de 43 kDa que se une a un elemento de respuesta a cAMP (CRE), este elemento se puede encontrar en los promotores de numerosos genes eucarióticos y posee una secuencia de consenso palindrómica, 5-TGACGTCA-3. Este factor se aisló inicialmente de cerebro de rata y hoy se sabe que su expresión es ubicua y que pertenece a la familia de factores que poseen estructura de cierres de leucina (91). En general, los factores transcripcionales de la familia CREB contienen tres dominios claves que median su activación transcripcional, unión al DNA y dimerización. El dominio de activación transcripcional de CREB está localizado en la región N-terminal y posee dos dominios hidrofóbicos ricos en glutamina (dominios Q) que flanquean un dominio inducible que posee sitios de fosforilación para varias proteínas kinasas (dominio inducible por kinasa, KID). En el carboxilo terminal, CREB tiene los dominios necesarios para su dimerización y unión al DNA; la unión al DNA es mediada por una región rica en residuos de arginina y lisina (BD), mientras la dimerización es mediada por un dominio que posee un cierre de leucina (LZ) (Figura 3) (91,93).

La activación de CREB inducida por estímulo es mediada por fosforilación; aunque este factor se puede fosforilar en diversos residuos, su principal y más estudiada activación ocurre por fosforilación de la serina 133. Se piensa que la fosforilación en serina 133 estimula su capacidad de activar la transcripción por que afecta su estabilidad, induce la traslocación desde el citoplasma al núcleo, permite su dimerización, promueve su unión al DNA e interacción con proteínas adaptadoras tales como CBP (su principal coactivador) y proteínas de la maquinaria de transcripción basal (94).

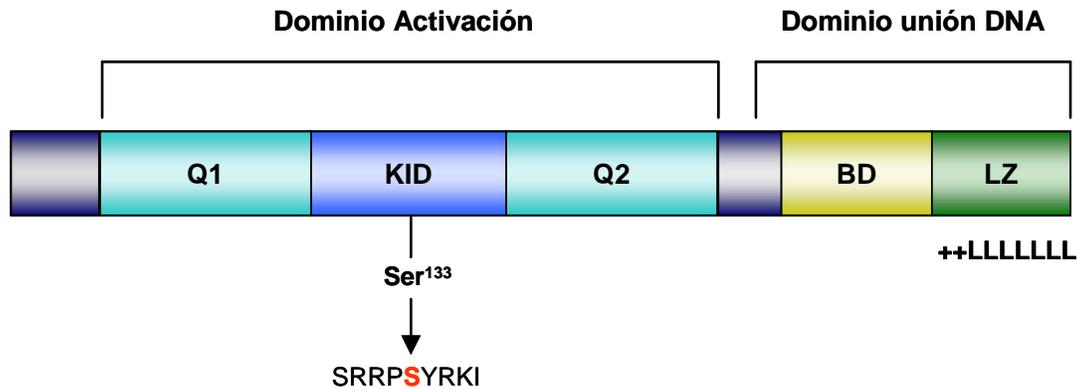


Figura 3. Estructura de CREB. Dominios estructurales y regulatorios de CREB. Q: región rica en glutamina; KID: dominio inducible por kinasas; BD: región de dimerización y unión al DNA; LZ: cierre de leucina. En KID se encuentra la serina 133, importante para la transactivación de CREB.

Los estímulos o vías que activan a CREB se pueden resumir en 3 grupos: i) vías que aumentan el AMPc, ii) vías que aumentan el Ca²⁺, y iii) vías activadas por receptores con actividad tirosina kinasa. Aumentos en el AMPc intracelular activan a la PKA, cuya subunidad catalítica se trasloca pasivamente al núcleo donde fosforila a CREB para inducir la transcripción. La segunda vía que conduce a la activación de CREB es mediada por aumentos en los niveles intracelulares de Ca²⁺, donde las CaMKs son las responsables de fosforilar y activar a CREB. La tercera vía por la cual CREB debe ser activado es una cascada de actividad kinasa que se inicia en un receptor que posee actividad kinasa intrínseca (91,95). Inicialmente, CREB se identificó como un sustrato de la proteína kinasa A (PKA) y un mediador de la expresión génica regulada por cAMP, pero hoy se sabe que este factor transcripcional puede ser fosforilado y activado por múltiples vías de transducción como son ERK, PKC, CaMKs, p38-MAPK y PI3-K/PKB (figura 4) (95-97). Algunas vías que regulan a CREB, controlan la actividad de CBP (su co-activador transcripcional). PKA, CaMKIV y ERK posiblemente regulan a CBP por fosforilación directa. Así, es probable que las múltiples acciones de las diferentes vías contribuyan a la estimulación total de la transcripción dependiente de CREB (91).

CREB es uno de los más caracterizados factores transcripcionales inducidos por estímulos. Se activa, como se mencionó anteriormente, por fosforilación en serina 133 en respuesta a diversos estímulos, y a pesar que la activación es una característica común, el

mecanismo o las vías transduccionales que lo activan dependen del estímulo y del tipo celular en particular.

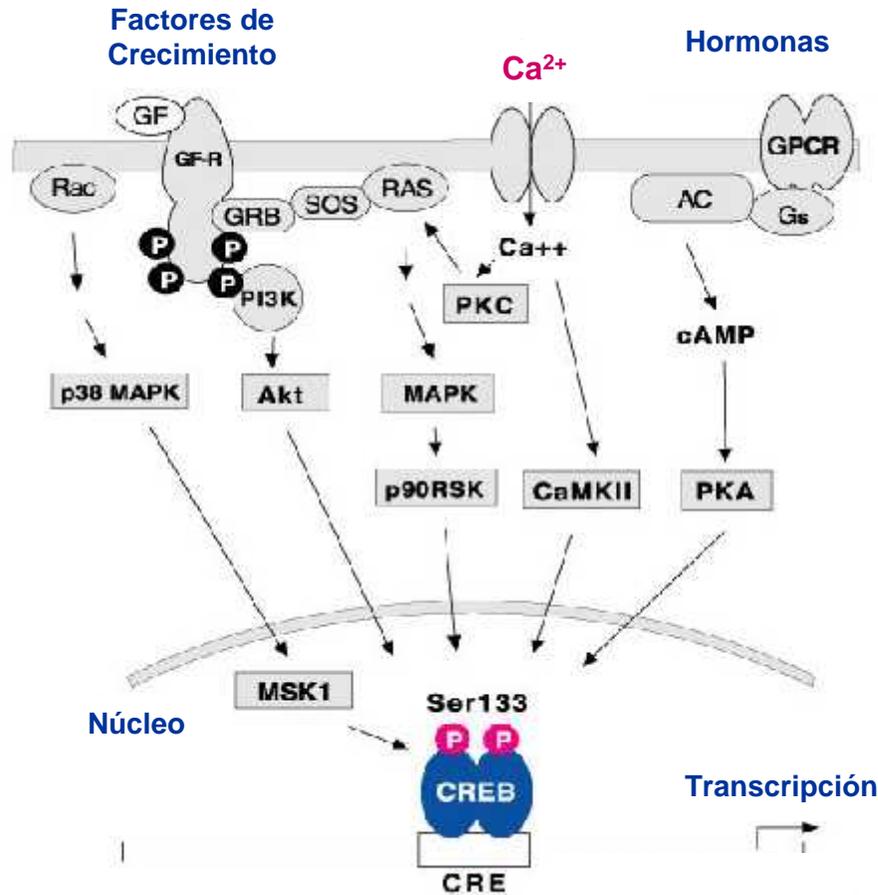


Figura 4. Activación de CREB. Múltiples vías transduccionales activan, por fosforilación en serina 133, al factor transcripcional CREB. Aumentos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} o de AMPc, y activación de receptores con actividad tirosina quinasa (ej. receptores de factores de crecimiento (FC)), se traducen en aumentos en la fosforilación y posterior activación transcripcional de CREB.

CREB funciona como un activador transcripcional inducido por estímulo en organismos que abarcan desde *Drosophila* hasta el hombre. Estudios de sus funciones biológicas, han demostrado que CREB es crítico para una variedad de procesos que incluyen proliferación, diferenciación y respuestas adaptativas (91). CREB participa en la generación del repertorio normal de células T, aprendizaje y memoria y control hormonal de procesos metabólicos

entre otros; se ha demostrado que la ausencia de este factor transcripcional conduce a enanismo y al desarrollo de miopatía cardíaca en el adulto (98). Una de las funciones más ampliamente estudiada y de gran impacto en el área de la salud es su participación en procesos de supervivencia y regulación de la apoptosis (91,92).

1.6.1. Factor transcripcional CREB y apoptosis

CREB participa en la apoptosis en diversos tipos celulares. Se ha demostrado que, en otros tipos celulares, distintos de los cardiomiocitos, este factor puede ser activado por estímulos pro- o anti-apoptóticos y en la literatura está ampliamente descrito su papel como un efector que promueve la supervivencia neuronal (92). Además se conoce que varias de las vías activadoras de CREB pueden ser estimuladas por factores antiapoptóticos, hecho que lo involucra, nuevamente, en la prevención de la apoptosis (97,99).

IGF-1, factor de crecimiento antiapoptótico usado en nuestro modelo, previene la apoptosis en varios tipos celulares a través de vías dependientes de CREB. Se ha demostrado que el eje IGF-1-CREB previene la apoptosis en adipocitos y células β pancreáticas inducida por privación de suero y citoquinas, respectivamente (99); en tanto en neuronas, IGF-1 activa a CREB por tres rutas transduccionales: ERK, PI3-K/PKB y p38-MAPK; se sabe que IGF-1 ejerce sus acciones de diferenciación y supervivencia a través de las vías ERK y PI3-K. La vía ras-raf-MEK-ERK es importante, pero no dominante, para la activación dependiente de IGF-1 mientras que la vía de PI3-K es crítica para la supervivencia neuronal mediada por IGF-1 (90,92). También se ha descrito que la activación de CREB, en neuronas con bajos niveles de oxígeno, cursa a través de la vía p38-MAPK-CREB (92).

1.6.2. Factor transcripcional CREB en el cardiomiocito

El factor transcripcional CREB está presente y se une a sitios CRE en el corazón. La relevancia funcional para la transcripción dependiente de CREB en el corazón deriva de estudios en muestras de corazones insuficientes y sanos, donde se ha demostrado la unión de CREB fosforilado a sitios CRE (100). La regulación por CREB de genes cardíacos específicos debe ser necesaria para la función normal y/o supervivencia de los miocitos cardíacos. CREB debe representar una vía de sintonía fina, regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, que posiblemente es responsable del crecimiento y

destino celular en el miocardio (100).

Se ha demostrado que CREB participa en la regulación de la apoptosis en los cardiomiocitos. CREB media los efectos antiapoptóticos de IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a hipoxia; en ratones transgénicos que sobreexpresan un dominante negativo de CREB específicamente en el corazón, desarrollaron cardiomiopatía dilatada con una función cardíaca dañada, sin embargo no se observaron aumentos significativos de células apoptóticas (101). Además, se ha demostrado que en animales cardiomiopáticos hay una disminución de los niveles proteicos de CREB (98,101).

En el corazón, recientemente se ha relacionado a este factor con hipertrofia, donde se demostró que CREB es esencial en la hipertrofia de cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión (102), y se ha descrito su participación en procesos hipertróficos en otros tipos celulares como son las células de la musculatura lisa vascular (103).

De acuerdo a las evidencias mencionadas, se postula a CREB como un posible factor regulado por las vías transduccionales que median los efectos antiapoptóticos de IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.

En la figura 5 se muestra un modelo propuesto para la participación de CREB en la apoptosis de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol.

En la Figura 6 se muestran las aproximaciones experimentales que se utilizaron para determinar la regulación de la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico y como IGF-1 y/o sorbitol regulan la actividad del factor transcripcional CREB.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

CREB participa en la vía transduccional antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar *in vitro* si CREB media los efectos antiapoptóticos del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1. Evaluar en el cardiomiocito la participación del factor transcripcional CREB en la apoptosis activada por estrés hiperosmótico y prevenida por IGF-1.

Objetivo específico 2. Estudiar el efecto del estrés hiperosmótico y/o IGF-1 en la activación del factor transcripcional CREB.

Objetivo específico 3. Estudiar cómo el factor transcripcional CREB es regulado por las vías transduccionales dependientes o independientes de Ca^{2+} /calmodulina activadas por estrés hiperosmótico e IGF-1.

Objetivo específico 4. Determinar los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en cultivos primarios de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.

Objetivo específico 5. Cuantificar las actividades de dos enzimas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (calcineurina y calmodulina quinasa II) en cultivos de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.

Objetivo específico 6. Determinar la participación del Ca^{2+}_i , calmodulina quinasa II y calcineurina en la apoptosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.

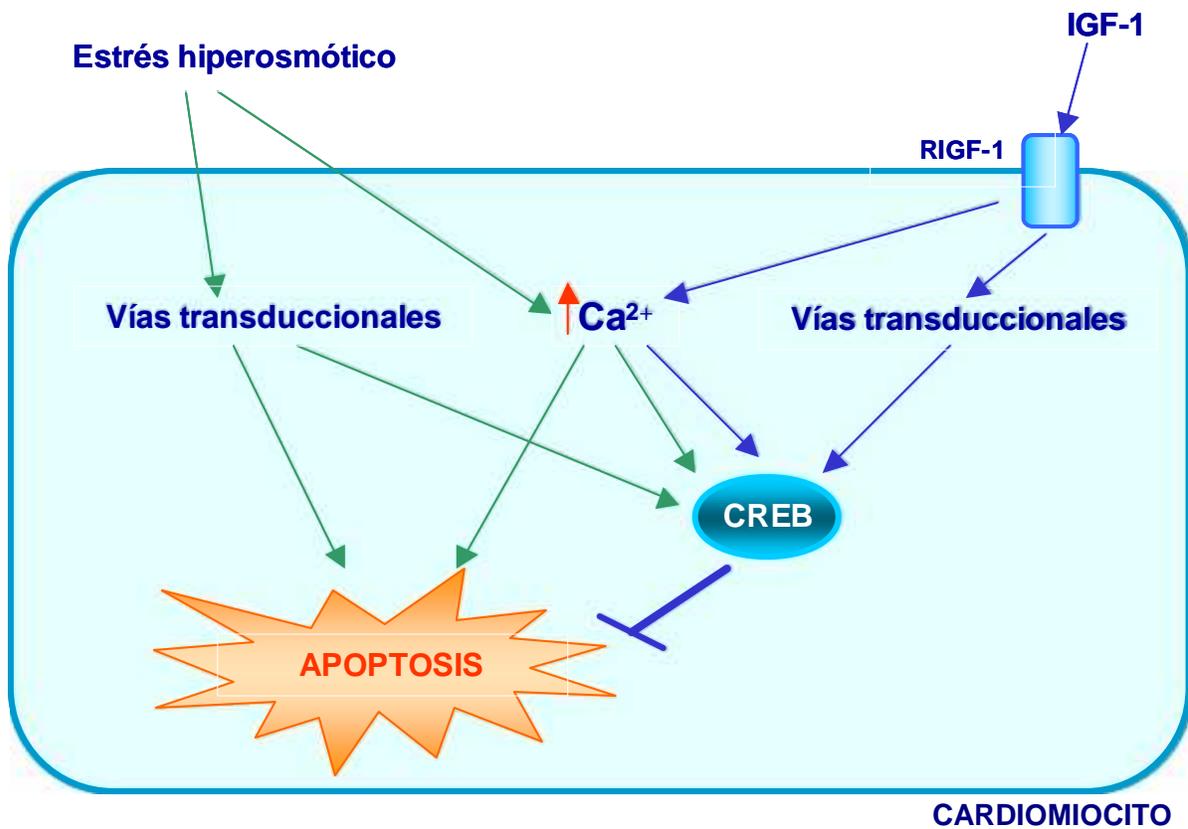


Figura 5. Modelo propuesto para participación de CREB en la apoptosis del cardiomiocito.

El factor transcripcional CREB participa en la señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, donde IGF-1 regula su activación a través de diversas vías transduccionales y Ca^{2+} . El estrés hiperosmótico regula la activación del factor transcripcional CREB mediante la activación de vías transduccionales y la generación de aumentos en los niveles del Ca^{2+}_i .

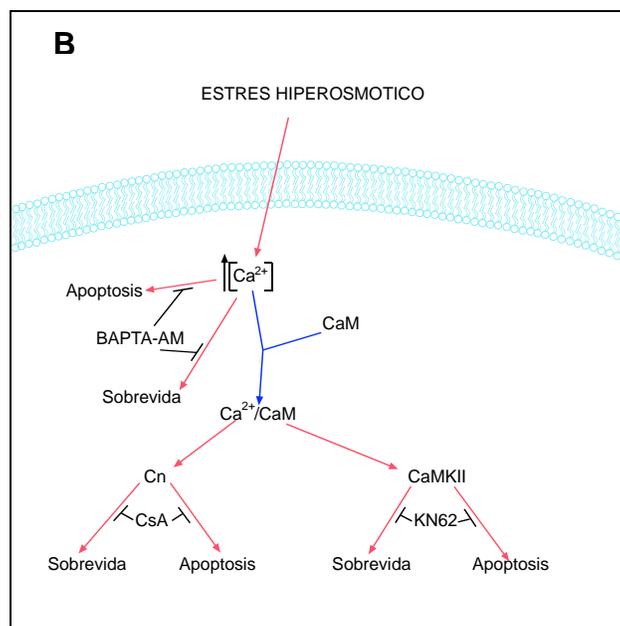
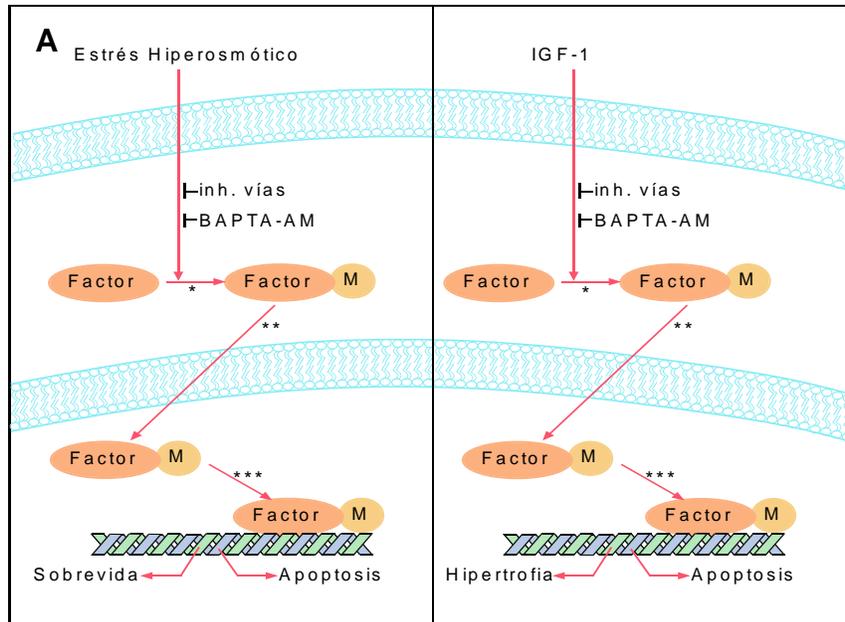


Figura 6. Aproximaciones experimentales para determinar la regulación de la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico. En A se muestra los medios para determinar la participación de CREB (factor) en la regulación de las respuestas hipertróficas, de supervivencia y apoptóticas en el cardiomiocito; uso de inhibidores químicos de vías transduccionales y un quelante del Ca^{2+}_i , y, determinación de fosforilación (*) y distribución subcelular (**) y unión al DNA (***) de los FTs. M:modificación. En B se muestra el efecto de sorbitol sobre diferentes efectores moleculares (rojo); se realizaron determinaciones de los niveles del Ca^{2+}_i , actividad de CaMKII y Cn, además se utilizaron los inhibidores de KN62 y CsA y BAPTA-AM para determinar la participación de CaMKII, Cn y Ca^{2+}_i en la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Los medios de cultivo Dulbecco modified Eagle's (DME), Hank's y M199, pancreatina, bromo deoxiuridina, azul de tripán, EDTA, EGTA, ribonucleasa A (RNAsa A), proteinasa K, bromuro de etidio, autocamtide-2, péptido inhibidor de autocamtide-2, CaM y sorbitol, U-73122, rianodina, toxina pertussis (TPX), IP₃ y otros reactivos bioquímicos se compraron a Sigma Chemical Co (St Louis, USA). La colagenasa y tripsina-EDTA se adquirieron de Invitrogen. [γ^{32}]-ATP se compró a New England Nuclear. Suero fetal bovino (FBS) y de ternero (FCS) se obtuvieron de Hyclone. Agarosa se obtuvo de Winkler. SB203580, (SB), xestospongina C y B, BAPTA-acetometilester (BAPTA-AM), LY-294002 (LY) y PD-98059 (PD), KN62, ciclosporina (CsA), los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se adquirieron a Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, USA). Las placas de cultivo se adquirieron en Falcon. La nitrocelulosa se compró a BioRad y el fluo3-acetometilester (Fluo3-AM) se adquirió a Molecular Probes (Eugene, USA). En Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EEUU), se adquirieron los anticuerpos de IgG de conejo anti p-CREB¹³³ y anti CREB. En Santa Cruz Biotechnology (CA, EEUU) se adquirió el anticuerpo IgG de conejo anti TFIIB. En Sigma-Aldrich se adquirió el anticuerpo IgG de ratón anti β -actina. El reactivo Western Lightning se compró a Perkin Elmer Life Sciences, Inc (Boston, MA). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). El adenovirus AdCREB fue donado por el Dr. Charles Vinson (NIH, Bethesda, USA).

5.2. Material biológico

Se utilizaron ratas neonatas Sprage-Dawley (2-3 días de edad) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios se realizaron con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.3. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols (40). Las ratas neonatas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se les retiraron las aurículas y los ventrículos se cortaron en pequeños pedazos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa. La población de cardiomiocitos se enriqueció por preplaqueo en frascos para cultivo de plástico por 2 h a 37°C, lo cual permitió la remoción de los fibroblastos contaminantes. Finalmente los cardiomiocitos se resuspendieron en medio de mantención (DME-M199 4:1) que contenía bromodeoxiuridina (BrdU, 1 mM), FBS 5% y FCS 10%, penicilina y estreptomicina (100 U/mL). Las placas plásticas de Petri utilizadas se recubrieron previamente con una película de gelatina al 2%.

Para la detección del Ca^{2+} , los cardiomiocitos se plaquearon a una densidad final de $1,0 \times 10^3$ células/ mm^2 en cubreobjetos pretratados con gelatina. Para la determinación de los niveles de IP3, los cardiomiocitos se sembraron a una densidad final de $0,7 \times 10^3$ células/ mm^2 en placas de 60 mm, pretratadas con gelatina. En estas condiciones, los cultivos comenzaron a latir luego de 18 horas. Las células fueron privadas del suero, 24 h antes de ser tratadas con los agonistas (sorbitol y/o IGF-1) en solución de reposo, en presencia o ausencia de Ca^{2+} en el medio externo.

Para medir actividad de CaMKII y fragmentación de DNA las células se sembraron a una densidad de 4×10^6 cardiomiocitos por placa de cultivo de 60 mm. En el caso de los estudios de viabilidad o recuento celular se utilizaron 1×10^6 cardiomiocitos en placas de 35 mm. Las células se incubaron por 18 h a 37°C en estufa de cultivo y luego se privaron de suero 24 h antes de ser estimuladas.

5.4. Determinación de los niveles intracelulares de Ca^{2+}

Las imágenes del Ca^{2+} intracelular se obtuvieron de cardiomiocitos neonatos precargados con Fluo3-AM y utilizando un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss Axiovert 135 M-LSM Microsystem) (104), equipado con una cámara enfriada CCD y un sistema de adquisición de imágenes (Spectra Source MCD 600). Los cardiomiocitos se lavaron tres veces con una solución Krebs (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2,6 mM, MgCl_2 1 mM,

HEPES 10 mM, glucosa 5,6 mM; pH 7,4) para remover el suero y luego incubarlas con Fluo3-AM (5,4 μ M, preparado a partir de un stock al 20% en ácido plurónico-DMSO) por 30 min a 37°C. Posteriormente, los cardiomiocitos se lavaron con solución Krebs y se utilizaron dentro de las siguientes 2 horas. Los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con Fluo3-AM se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 μ L de solución de reposo en presencia o ausencia de Ca^{2+} en el medio, y colocadas en el microscopio para la determinación de la fluorescencia luego de excitar con un rayo láser de argón o bien, con un sistema de filtros, a una longitud de onda de 488 nm. Luego, se agregó directamente el estímulo a la solución de reposo. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron cada 2 seg para las distintas secuencias y luego se analizaron una a una con el programa de adquisición de imágenes del equipo (Spectra Source). El lente objetivo plan Apo 60X (apertura numérica 1,4) fue generalmente utilizado. En la mayoría de las secuencias adquiridas, las dimensiones de las imágenes fueron de 512 x 120 pixeles. Los niveles intracelulares de Ca^{2+} se expresaron como porcentaje de la intensidad de fluorescencia relativa a la fluorescencia basal, un valor estable por al menos 5 min en condiciones de reposo. Los aumentos en la intensidad de la fluorescencia fueron proporcionales a los aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular (104). Para los experimentos con inhibidores, las células se incubaron en medio de reposo Krebs con el inhibidor, por los tiempos indicados (ver leyenda figuras).

La eliminación de la fluorescencia fuera de foco se realizó usando tanto el modelo teórico de algoritmo de deconvolución no-neighbors, como el modelo Castleman' s SPF (point spread function) (105), tal como se ha sido descrito previamente (106). Para determinar la fluorescencia, la suma de la intensidad de pixeles se calculó tanto en la imagen completa como en una sección delimitada por un contorno, preestablecido manualmente (análisis ROI). Como una forma de aumentar la eficiencia de la manipulación de los datos, se generó una secuencia de acciones de forma de obtener valores adimensionales arbitrarios de fluorescencia, los cuales posteriormente se expresaron como porcentaje de fluorescencia relativa. Para eliminar el posible efecto de la adición del estímulo sobre el volumen celular, el área fluorescente de la célula se determinó usando un contorno adaptativo y luego creando una máscara binaria, la cual fue comparada con la imagen de luz transmitida correspondiente a dicha célula.

5.5. Determinación de la actividad de CaMKII

5.5.1. Preparación de los extractos celulares

Placas de cultivo privadas de suero se lavaron dos veces con PBS estéril temperado a 37° C. Posteriormente, se estimularon con sorbitol (300 mM que produce una osmolaridad final de 600 mOsm). Los tiempos de estimulación fueron 0; 1; 5; 10; 15; 30; 45 y 60 min. La muestra a tiempo cero se obtuvo luego de agregar el medio de mantención sin suero y dejarlo por un minuto. Una vez completado el tiempo de estimulación se removió el medio de cultivo, las placas de cultivo se lavaron rápidamente con PBS frío, se mantuvieron en hielo y se drenaron. Luego se agregaron 150 µL de tampón de homogenización (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EGTA 0,5 mM, EDTA 1 mM, leupeptina 1 µg/mL, pirofosfato de sodio 10 mM, molibdato de amonio 0,4 mM, DL- ditiotreitól 2 mM, NP-40 0,1% [v/v]) y se destruyeron mecánicamente con la ayuda de una espátula plástica. El lisado se traspasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4°C para separar la fracción citosólica de la particulada. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (107). Luego se ajustó la concentración de proteínas de las muestras a 0,2 µg/µL.

5.5.2. Ensayo de actividad de calmodulina kinasa

El ensayo enzimático consistió en determinar la incorporación de ³²P al péptido autocamtide-2 en forma dependiente de la presencia de Ca²⁺/CaM. Con el objeto de demostrar que la fosforilación del péptido autocamtide-2 se debía específicamente a la actividad de CaMKII, se ensayó el efecto del péptido inhibidor de autocamtide-2 (AIP); indistintamente del estímulo utilizado, el AIP fue capaz de inhibir más del 84% de la actividad de CaMK, indicando que al menos el 84% de la actividad enzimática medida por el ensayo estandarizado corresponde específicamente a la actividad de CaMKII. Para la determinación de la actividad de CaMKII se realizaron dos ensayos por condición experimental: a) en presencia de Ca²⁺/CaM (mezcla A) y b) en presencia de un quelante de Ca²⁺ (mezcla B). La mezcla A consistió en PIPES 375 mM, MgCl₂ 75 mM, CaCl₂ 3,75 mM, CaM 5 µg/mL, BSA 0,1 µg/mL, autocamtide-2 20 µM, EGTA 1 mM. La mezcla B consistió en PIPES 375 mM, MgCl₂ 75 mM, CaCl₂ 3,75 mM, BSA 0,1 µg/mL, autocamtide-2 20 µM, EGTA 1 mM. A cada condición experimental se le agregaron 5 µL de proteínas (1 µg total) se preincubaron a 30°C

por 5 min y las reacciones se iniciaron añadiendo 10 μL de ATP radiactivo (1 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP en 10 μL de ATP 0,5 mM). Las mezclas de reacción se incubaron por 5 min a 30°C. Las reacciones se detuvieron con TCA al 50% (p/v). Después de centrifugar a 12.000 x g por 15 min a 4°C, 20 μL de los sobrenadantes se agregaron sobre papel de fosfocelulosa P-81 (trozos 1 x 2,5 cm). Los papeles se lavaron dos veces con ácido fosfórico 75 mM, durante 5 min por cada lavado, y una vez con etanol, durante 5 min. Finalmente, se procedió a secar los papeles. A los papeles secos se les midió la radioactividad en un contador de centelleo β . La actividad de la CaMK se calculó restando la radioactividad determinada en los ensayos con $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ con la radioactividad determinada en los ensayos con quelante de Ca^{2+} , corregida por la radioactividad específica del [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP, el tiempo de ensayo (5 min) y la proteína añadida al ensayo (1 μg de proteína). La actividad de la CaMKII se expresó como pmoles de fosfato incorporado/min/mg proteína, o veces respecto al control.

5.6. Determinación de la actividad de calcineurina

5.6.1. Preparación de los extractos celulares

Cultivos confluentes de cardiomiocitos de ratas neonatas fueron estimulados con sorbitol (600 mOsm) a distintos tiempos y lisados para determinación de la actividad de calcineurina. Para ello, cada placa de cultivo se lavó dos veces con TBS 1x frío y se agregaron 140 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 100 μM , EGTA 100 μM , NP-40 0,2%, pH 7,5; Na_3VO_4 0,2 mM; leupeptina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; aprotinina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PMSF 0,1mM). Luego los extractos se sonicaron por 1 min en hielo. Una vez obtenidos los extractos se centrifugaron a 200.000 g a 4 °C por 45 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80°C.

5.6.2. Remoción del fosfato libre de los extractos

La remoción de los fosfatos libres se realizó utilizando una resina P6 DG que permite captar los fosfatos presentes en los extractos. Para este procedimiento se usó una columna que contenía la resina, previamente lavada con abundante agua nanopura y equilibrada con tampón de lisis. Las columnas se centrifugaron a 800 g por 3 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante. Las muestras se agregaron sobre la resina y se centrifugaron a 800 g por 3

min a 4°C. Luego las muestras se guardaron a –80°C hasta determinación de la actividad de calcineurina.

5.6.3. Ensayo de actividad de Cn

Previamente a la realización del ensayo enzimático de actividad de calcineurina se determinó la concentración de los extractos totales por el método de Bradford. Se usó un kit comercial no radiactivo para la determinación de la actividad de Cn basado en la detección de fosfato libre por verde malaquita. El ensayo enzimático consistió en determinar la liberación de fosfato desde un sustrato artificial RII (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu), en presencia de Ca²⁺/CaM. Se realizaron dos determinaciones de actividad de Cn: a) en presencia de ácido okadaico (OA) (Tris HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 0,5 mM, NP-40 0,025%, CaCl₂ 0,5 mM, calmodulina 250 nM, ácido okadaico 0,5 µM) y b) en presencia de ácido okadaico/EGTA (OA + EGTA) (Tris HCl 50 mM, pH 7,5; EGTA 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 0,5 mM, NP-40 0,025%, ácido okadaico 0,5 µM), a esta mezcla de reacción se le agregó sustrato (péptido RII) (concentración final 150 µM) y se preincubó a 30°C por 10 min. Luego de agregar los extractos celulares, se incubó a 30°C por 30 min. En esta misma microplaca (96 pocillos) se preparó una curva estándar de fosfato realizando diluciones seriadas de un estándar (80 µM), la cual también se incubó por el mismo periodo de tiempo. La reacción se detuvo por adición de reactivo “GREEN™”, el cual detiene la reacción y permite desarrollo de color.

La actividad de Cn se calculó restando actividad OA+EGTA a la actividad OA corregida por el tiempo (30 min) y la cantidad de proteína presente en cada ensayo. La actividad de Cn se expresó como pmoles de fosfato liberado/min/mg proteína, o veces el control.

5.7. Transducción adenoviral

Las células se sembraron a distintas densidades dependiendo de las necesidades experimentales. Luego de 24 horas, las células fueron transducidas con el adeno-CREB (AdCREB) que contiene una forma mutada de CREB, no sujeta a regulación por fosforilación ya que la serina 133 se reemplazó por alanina, a una multiplicidad de infección (MOI) de 300 partículas virales por célula y mantenidas en esas condiciones alrededor de 24 horas antes

de lavarlas y estimularlas con Sorbitol (600 mOsm) y/o IGF-1 (10 nM). Como control de infección se utilizó el vector adenoviral vacío, a la misma multiplicidad de infección.

5.8. Determinación de la apoptosis en los cardiomiocitos.

La apoptosis se evaluó a través de 4 parámetros: viabilidad celular, fragmentación del DNA en geles de agarosa, activación de caspasas 3 y 9 por Western blot y, finalmente, por la determinación por citometría de flujo del grado de externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática externa por un ensayo anexina V-yoduro de propidio.

5.8.1. Evaluación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán

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

5.8.2. Determinación de la fragmentación del DNA en geles de agarosa

Para extraer el DNA se utilizaron 4×10^6 células en placas de 60 mm. Al término del período de estimulación se removió el medio de cultivo, se lavaron las placas dos veces con PBS frío y el exceso de líquido se drenó completamente antes de agregar 200 µL SDS al 20% (concentración final de 4% [p/v]) y 800 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Las células se dejaron con esta mezcla por 2 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se agregaron 2 µL proteinasa K (10 mg/mL) y se incubaron

a 50°C toda la noche. El DNA se extrajo nuevamente con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se recuperó la fase acuosa. Luego el DNA se precipitó agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 más 2 volúmenes de etanol 100% frío y se mezcló lentamente por inversión dejando la mezcla a -20°C por toda la noche, para posteriormente centrifugarla a 15.000 x g por 15 min a 4°C. Después de descartar el sobrenadante, la pella se lavó dos veces con etanol al 75%, se dejó secar y la pella se resuspendió con 100 µL TE por tubo. Luego se agregaron 40 µL RNasa (10 mg/mL) y dejó incubando con agitación suave a 37°C por 30 min. Posteriormente, se agregaron 10 µL proteinasa K (1 mg/mL) por tubo y se continuó la incubación a 50°C por toda la noche. El DNA se extrajo con un volumen fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló invirtiendo repetidas veces y se centrifugó por 10 min a 12.000 g. La fase superior se extrajo y se repitió la extracción usando sólo cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugando nuevamente 10 min a 12.000 g y se recuperó la fase acuosa. Finalmente, el DNA se precipitó con 1/10 volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol frío al 100% durante toda la noche y se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C, lavando la pella 2 veces con etanol frío al 75% y secándola al aire. La pella se resuspendió en 10 µL de TE y se guardó a 4° C. La concentración del DNA se determinó por la razón de las absorbancias a 260 y 280 nm. La fragmentación del DNA se analizó por electroforesis, agregando 10 µg del DNA extraído a un bolsillo de un gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE 0,5x, conteniendo 5 µg/mL de bromuro de etidio. Luego se observó la fragmentación por medio de radiación UV y se obtuvieron imágenes digitales de los geles y se cuantificaron computacionalmente mediante el programa Un-Scan-It (USI, Silk Scientific Corporation).

5.8.3. Determinación de la actividad de caspasas-3 y -9

Para estudiar la activación de las caspasas 9 y 3, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 2×10^6 células/placa. Una vez estimuladas, las células fueron lavadas tres veces con PBS frío y luego lisadas con 100 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; Tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1 mM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4X, para ser almacenado a -20°C.

Las proteínas obtenidas de los extractos celulares fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% en una cámara Miniprotean (BioRad), y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm (BioRad) por 90 min a 0.45 A utilizando un sistema de transferencia semiseco. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo de leche descremada al 5% en solución salina de TBS-Tween-20 (0.01% v/v) (TTBS). Luego las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales anti-caspasa-9 y anti-caspasa-3 (dil 1:1.000), diluidos en el mismo tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS e incubaron por 2h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (dil 1:5.000) en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectaron las pro-caspasas y caspasas activas por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). Las intensidades de las bandas resultantes se determinaron por densitometría (USI, Silk Scientific Corporation). Los resultados se expresaron como la razón entre las bandas correspondientes a las caspasas activas y caspasa totales (pro-caspasa y caspasa activa) y se comparó cada tiempo con respecto al valor basal (ensayo en ausencia de estímulo).

5.8.4. Determinación de la externalización de fosfatidilserina en la membrana

La externalización de fosfatidil serina (PS) en la membrana plasmática es una señal clave de apoptosis, por lo cual la tinción de PS con anexina V es utilizada como un marcador para determinar la aparición de apoptosis. Los cardiomiocitos neonatos de rata (2×10^6 células/placa de 35mm) en cultivo fueron privados de suero 24 horas antes del comienzo del ensayo y sometidos a los correspondientes estímulos. Las células se lavaron 3 veces con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10,1mM; KH_2PO_4 1,76 mM; pH 7,4) frío y se desprendieron de la placa con 1 mL de tripsina 1x en medio Hank's libre de calcio y magnesio (3 min a 37°C). Posteriormente, la reacción de tripsinización se detuvo agregando 500 μl de FBS y las células se mantuvieron 1 h a 37°C para mantener su integridad. Luego se recogieron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y la pella se resuspendió en 20 mL de una solución tampón de tinción (1 μl de anexina V-FITC (Pharmigen), 1 ng/ μl PI y HEPES). Finalmente, se incubaron en oscuridad por 20 min a temperatura ambiente y se evaluaron por citometría de flujo en un citómetro FacSORT Becton Dickinson. Las células se adquirieron en el programa CELLQuest del

propio citómetro y se analizaron en el programa FCS Express V2. El yoduro de propidio (PI) se utilizó para discriminar el proceso apoptótico del necrótico, este compuesto se intercala en el DNA de células que presentan pérdida de integridad de membrana, condición que es propia de la necrosis. Para ajustar las condiciones de adquisición de los eventos celulares, en cada serie de experimentos se realizaron controles para evaluar la autofluorescencia basal de los cardiomiocitos (células sin tinción) y controles positivos que corresponden a cardiomiocitos tratados con NaN_3 (células sin marcar o marcados con anexina V y PI).

5.9. Determinación del grado de fosforilación de CREB

5.9.1. Preparación de los extractos celulares

Cultivos confluentes de cardiomiocitos tratados con IGF-1 (10 nM) y/o sorbitol (600 mOsm) por distintos períodos de tiempo, se lisaron para determinar los cambios en los patrones de fosforilación del factor transcripcional CREB. Las células se lavaron 3 veces con PBS frío y luego se lisaron con 100 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; Nonidet P-40 1% (v/v); deoxicolato de Na 1% (v/v); EGTA 1 mM; NaCl 150 mM; NaF 1 mM; leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; PMSF 1 mM; pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; benzamidina 1 mM y Na_3VO_4 1 mM). Los homogenizados se sonicaron por 1 min e incubaron por 15 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 15000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante (extracto proteico) se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4X, para ser almacenado a -20°C.

5.9.2. Western blot

Las proteínas obtenidas de los extractos celulares fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% en una cámara Miniprotean (BioRad), y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm (BioRad) utilizando un sistema de transferencia semiseco a 0.4 A por 90 min. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo de leche descremada al 3% en solución salina de Tris (TBS). Luego las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario para la forma fosforilada de CREB: anticuerpo policlonal anti-CREB fosforilado (dil 1:1000, Cell Signaling), diluido en el mismo tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS, luego se incubaron por 2 h a

temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (dil 1:5.000) en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectó las formas fosforiladas por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). Con el fin de normalizar las variaciones en el grado de fosforilación respecto a la cantidad de CREB, las membranas se trataron con una solución de “stripping” (rojo Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3% y ácido sulfosalicílico 3%) por, al menos, 1 h a temperatura ambiente para remover el anticuerpo que reconocen la forma fosforilada e CREB. Luego de exhaustivos lavados, las membranas se bloquearon con leche descremada al 3% en TBS. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario que reconoce a la totalidad de la proteína CREB: anticuerpo policlonal anti-CREB (dil 1:1.000), diluido en el mismo tampón de bloqueo. Luego las membranas se lavaron con TBS y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo (dil 1:5.000) en la misma solución de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectó CREB total por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). Las intensidades de las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría (USI, Silk Scientific Corp). Los resultados se expresaron como la razón entre las bandas correspondientes a CREB fosforilado y las correspondientes a la forma total de CREB y se comparó cada tiempo con respecto al valor basal (ensayo en ausencia de estímulo).

5.10. Determinación de la distribución subcelular de CREB

Para determinar la distribución subcelular del factor transcripcional CREB, se realizó Western blot (WB) de fracciones citosólicas y nucleares. Los niveles de CREB en ambos compartimentos se determinaron con un anticuerpo específico que reconoce tanto a CREB fosforilado como a la forma no fosforilada.

5.10.1. Preparación de fracciones citosólicas y nucleares

Los cardiomiocitos neonatos de rata (4×10^6 células / placa 60 mm) en cultivo se privaron de suero 24 h antes del comienzo del ensayo y sometidos a los correspondientes estímulos. Las células se lavaron 3 veces con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10,1 mM; KH_2PO_4 1,76 mM; pH 7,4) frío y luego se lisaron con 100 μL de tampón de lisis A (HEPES 20 mM, pH 8; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM; DTT 1 mM; NaF 5 mM; Na_3VO_4 1 mM;

Na₂MoO₄ 10 mM; inhibidor de tripsina 50 µg/mL; leupeptina 1 µg/mL; aprotinina 0,1 µg/mL y PMSF 0,5 mM). Luego los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf e incubaron en hielo por 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm por 1 min y se traspasaron los sobrenadantes correspondientes a los extractos citosólicos a tubos Eppendorf nuevos. La pella se lavó con 30 µL de tampón A y luego se centrifugó por 1 min a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pella se resuspendió en 40 µL de tampón C (HEPES 20 mM, pH 8; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; NaCl 0,4 M; DTT 1 mM; NaF 5 mM; Na₃VO₄ 1 mM; Na₂MoO₄ 10 mM; leupeptina 1 µg/mL; aprotinina 0,1 µg/mL y PMSF 0,5 mM); luego la solución se sonicó por 1 min a temperatura ambiente y agitó por 30 min a 4°C para luego ser centrifugadas a 13000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes correspondientes a los extractos nucleares se separaron y traspasaron a tubos Eppendorf nuevos. En los extractos citosólicos y nucleares se determinó la concentración de proteínas por Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x y almacenó a -20°C.

5.10.2. Western blot.

Las proteínas obtenidas de las fracciones citosólicas y nucleares se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% en una cámara Miniprotean (BioRad) y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (BioRad) utilizando un sistema de transferencia semiseco a 0.4 A por 90 min. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo de leche descremada al 3% en solución salina de Tris (TBS). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario policlonal anti-CREB (dil 1:1.000, Cell Signaling), diluido en el mismo tampón de bloqueo. Luego, las membranas se lavaron e incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (dil 1:5.000) en la solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectó la proteína CREB por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). A fin de normalizar las variaciones en las cantidades de CREB en cada fracción, las membranas se trataron con una solución de "stripping" por 1 h. Luego de lavar las membranas, éstas se bloquearon con leche descremada al 3% en TBS-T. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los distintos anticuerpos primarios para las proteínas controles: anticuerpo policlonal anti-TFIIB (dil 1:1.000) y anticuerpo monoclonal anti-β-actina (dil 1:1.000), diluidos en el mismo tampón de bloqueo. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se

incubaron por 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo para TFIIB, y un anticuerpo anti IgG de ratón para β -actina (dil 1:5.000) diluidos en la solución de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron y se detectaron las distintas proteínas por quimioluminiscencia, utilizando películas BioMax MR1 (Kodak). Las intensidades de las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría (USI, Silk Scientific Corp). Los resultados se expresaron como la razón entre las bandas correspondientes a CREB y las correspondientes a las proteínas controles (TFIIB y β -actina) y se comparó cada tiempo con respecto al valor basal (en ausencia de estímulo).

5.11. Ensayos de retardo electroforético (EMSA y Supershift)

Se realizaron ensayos de movilidad electroforética y supershift para estudiar la unión del factor transcripcional CREB a su secuencia consenso. La unión de este factor al DNA se determinó, en todos los casos, en las fracciones nucleares de cultivos de cardiomiocitos, utilizando oligonucleótidos consenso de doble hebra: **CREB**: 5'-AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG-3'; y oligonucleótido mutado: **CREB**: 5'-AGA GAT TGC CTG TGG TCA GAG AGC TAG-3'.

5.11.1. Radiomarcación, separación y extracción de los oligonucleótidos

La reacción de radiomarcación se realizó con 10 pmoles de cada oligonucleótido, los cuales fueron marcados en su extremo 5' terminal con 75 μ Ci de [γ - 32 P]ATP (NEN) en presencia de 10U de T4 kinasa (Invitrogen) a 37°C por 30 min. Las sondas marcadas se purificaron desde geles de poliacrilamida. Cada sonda marcada se mezcló con 5 μ L de amortiguador de carga 4X (Glicerol al 50% y azul de bromofenol) y se cargó en un gel de poliacrilamida/bisacrilamida (38/2) al 12% en amortiguador Tris-borato-EDTA (TBE 1X). Posteriormente la muestra se sometió a electroforesis a 250V hasta que el azul de bromofenol alcanzó los $\frac{3}{4}$ del gel antes de llegar final del sistema de vidrios de la cámara de electroforesis. A continuación la electroforesis se detuvo y luego de desmontar uno de los dos vidrios, el gel fue cubierto con Alusaplast y expuesto durante 1 min contra una película Kodak Biomax de 20,3 x 25,4 cm. Luego de revelar la película, se cortó el sector que muestra la banda correspondiente a cada sonda y el resto de la película se utilizó como plantilla para poder cortar el sector del gel que contiene a la sonda marcada. Este sector fue escindido y depositado en un tubo Eppendorf, al cual se agregó 1 mL de solución de

extracción TES (Tris HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, NaCl 1 M) y se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Para precipitar cada sonda, se retiró la fase acuosa y se mezcló con 10 µg de tRNA, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se mantuvo durante 1 h a -20°C. A continuación se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y la pella se lavó 2 veces con etanol al 70% frío. Las sondas se secaron en Speedvac y la radioactividad incorporada a cada oligonucleótido se cuantificó en un contador de centelleo β. Finalmente cada sonda se resuspendió en suficiente agua nanopura estéril para ajustar a 30.000 cuentas/µL.

5.11.2. Geles de retardo electroforético (EMSA)

Para el desarrollo del ensayo de EMSA (**ElectroM**obility **S**hift **A**ssay) se utilizó como protocolo base el descrito en la referencia 108. Extractos nucleares (2 µg) se incubaron por 30 min a 4°C con 30.000 cpm de sonda marcada con P³² en 25 µL de una solución tampón de unión (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; poli dG-dC 500 ng; MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol 12,5% (v/v) y Triton X-100 0,1% (v/v)). Luego la mezcla se cargó directamente en el gel de poliacrilamida pre-corrído. En los experimentos de EMSA se utilizaron geles de baja fuerza iónica, estabilizados con glicerol al 0,5%. El gel se preparó con acrilamida/bisacrilamida (38/2) al 6%, TBE 1x y glicerol al 0,5%, mezcla que se filtró por una membrana de 0,2 µm y se polimerizó con 300 µL de PSA al 10% y 30 µL TEMED. El gel se recorrió a 300V (voltaje constante) hasta que alcanzó los 30 mA por gel. La electroforesis se realizó a 30 mA (corriente constante) por 45 min. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se secó al vacío a 80°C por 4 h y posteriormente se expuso a una película de fotografía Kodak, manteniéndose a -80°C por 1 o más días y finalmente, fué revelado.

5.11.3. Supershift

Los extractos nucleares de cardiomiocitos (5 µg) se incubaron con 2 µg del anticuerpo específico para cada uno de los factores en estudio: anti-NFAT3 y NFAT4, anti-MEF2C y anti-CREB. Después de incubar por 2 h a 4 °C, los complejos proteína-anticuerpo se incubaron con cada oligonucleótido radiomarcado por 20 min. Los complejos proteína(s)-DNA se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones no desnaturantes. Se controló la especificidad de cada oligonucleótido con los siguientes ensayos, extractos nucleares de cardiomiocitos estimulados con sorbitol (600 mOsm) y/o IGF-1 (10 nM) incubados con: a) con sondas que contienen una mutación en la región de

consenso de unión al factor transcripcional (sonda marcada:sonda mutada, 1:1000) y, b) oligonucléotido “frío” en exceso (ensayo de competencia) (sonda marcada:sonda fría, 1:100). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se secaron al vacío a 80°C durante 4 h y posteriormente se expusieron a una película de fotografía Kodak, manteniéndose a -80°C por, al menos, 1 día, para finalmente ser revelados.

5.12. Expresión de los resultados y análisis estadístico

La fluorescencia de los cardiomiocitos se expresó como porcentaje de la fluorescencia relativa, representado como $[(F-F_0)/F_0]*100$, donde F representa el valor de fluorescencia en cada punto y F₀ representa el valor basal de la fluorescencia. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes; *p<0,05 vs control, **p<0,01, ***p<0,001 vs control y #p< 0,05 vs control, ##p<0,01, ###p<0,001 vs sorbitol. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, y la comparación entre grupos se realizó usando el test protegido de Tukey.

6. RESULTADOS

6.1. Participación de CREB en la regulación de la apoptosis del cardiomiocito

En otros tipos celulares, se conoce que factores transcripcionales específicos regulan de la expresión de genes que participan tanto en el inicio y ejecución como en la inhibición de la apoptosis. A fin de contribuir a entender la regulación a nivel transcripcional de la muerte celular en nuestro modelo de estudio, donde hemos demostrado que sorbitol induce apoptosis y que dicho proceso es inhibido por el pretratamiento con IGF-1, se estudió la participación de CREB en la apoptosis inducida por sorbitol y en la prevención por IGF-1.

Para determinar si CREB participa en la regulación de la apoptosis del cardiomiocito estimulada por estrés hiperosmótico, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de una proteína CREB mutada. En primer lugar, se probaron distintas multiplicidades de infección (moi) de modo de tener la máxima expresión de la proteína mutada con la más baja toxicidad posible. Los resultados mostraron que con un moi = 300 se logró un 95% de cardiomiocitos transducidos viables. La sobreexpresión del dominante negativo de CREB en el cardiomiocito se evaluó por Western blot en extractos totales de cardiomiocitos transducidos con el adeno-CREB mutado. Como control de infección se utilizó un adenovirus vacío. La Figura 7 muestra que los niveles de CREB (CREB mutado) aumentaron significativamente a partir de las 24 h post-transducción pero no con el adenovirus vacío utilizado como control (datos no mostrados).

La apoptosis se evaluó a través de la determinación de dos parámetros: activación de caspasas 3 y 9, fragmentación del DNA y además, se determinó muerte celular por el método de exclusión de azul de tripán.

6.1.1. Efecto de la sobreexpresión de CREB mutado sobre las caspasas 3 y 9

Para determinar la activación de las caspasas 3 y 9 se realizaron Western blot con extractos totales y se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen tanto a las pro-caspasas como a las caspasas activas. La activación de cada caspasa se expresó a través de la razón entre la caspasa activa y la caspasa total (caspasa activa y pro-caspasa). El control correspondió a cardiomiocitos no estimulados transducidos con el adenovirus vacío.

La presencia del adenovirus vacío no alteró la activación de las caspasas observada en cardiomiocitos sin infectar (datos no mostrados). Los resultados muestran que la expresión del dominante negativo de CREB (dnCREB) bloqueó la activación de la caspasa-3 en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol (Figura 8). Además, se observa que en los cardiomiocitos que sobreexpresan el dnCREB, IGF-1 no revirtió el efecto apoptótico del estrés hiperosmótico (Figura 8).

La caspasa-9 mostró un comportamiento distinto al observado con la caspasa-3. En cardiomiocitos que sobreexpresaron la forma mutada de CREB y expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol, no se observaron cambios en la activación de esta caspasa respecto a la situación control. Sin embargo, el dnCREB bloqueó el efecto citoprotector del IGF-1 en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico (Figura 9).

6.1.2. Efecto de la sobreexpresión de CREB mutado sobre la fragmentación del DNA

La fragmentación del DNA durante la apoptosis puede ser evaluada, principalmente, por dos técnicas: inmunofluorescencia (TUNEL) o electroforesis (Laddering); al realizar electroforesis en geles de agarosa se observó que las células que sobreexpresan el mutante de CREB, el nivel de fragmentación del DNA no se modificó respecto al control. Sin embargo, el mutante CREB interfirió con el efecto preventivo del IGF-1 en la fragmentación del DNA estimulada por el estrés hiperosmótico por sorbitol observado en aquellas células transducidas con el adenovirus control (Figura 10).

6.1.3. Efecto de la sobreexpresión de CREB mutado en la viabilidad del cardiomiocito

Para evaluar el efecto del dominante negativo de CREB en la viabilidad del cardiomiocito expuesto a IGF-1 y/o estrés hiperosmótico por sorbitol, ésta se determinó por el método de exclusión de Tripán. Para ello, los cardiomiocitos transducidos por 24 h con el adenovirus, se expusieron a IGF-1 (10 nM) y/o estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) por 24 h. El control (100% viabilidad celular) correspondió a cardiomiocitos transducidos con un adenovirus vacío en ausencia de estímulos. La transducción con el adenovirus vacío no afectó significativamente la viabilidad celular con respecto a cardiomiocitos sin infectar (datos no mostrados). La sobreexpresión de la forma mutada de CREB no modificó la magnitud de

muerte de los cardiomiocitos por estrés hiperosmótico ni por IGF-1, pero si la protección de IGF-1 en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico (Figura 11).

Colectivamente estos datos muestran que CREB es un factor activado por IGF-1 y que media parte de sus efectos antiapoptóticos en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol.

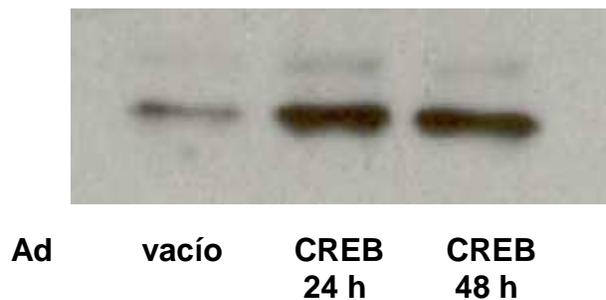


Figura 7. Expresión de una forma dominante negativa de CREB en cardiomiocito

Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con adenovirus CREB mutado o uno vacío. La expresión de CREB mutado se visualizó por Western blot utilizando un anticuerpo específico contra CREB total.

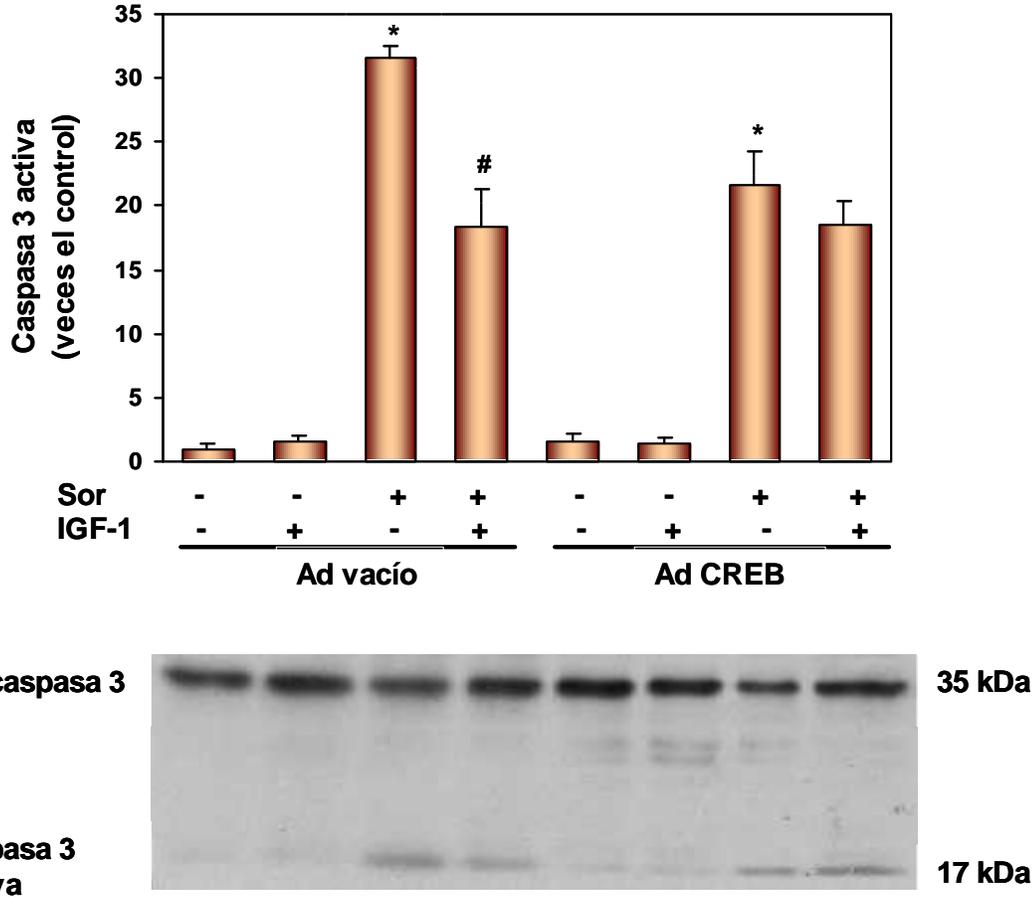


Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de una forma mutada de CREB en la activación de caspasa-3

Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron por 24 h con un adenovirus control o con el que sobreexpresa una forma mutada e inactiva de CREB. Luego los cardiomiocitos se expusieron a IGF-1 (10 nM) y/o estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) por 2 h. Luego se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de procaspasa-3 y caspasa-3 por Western blot. La cuantificación densitométrica de los Western blot se muestra en el panel superior. En el panel inferior se muestra un Western blot representativo. Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SEM (n=3). *p<0,05 vs control y #p<0,05 vs sorbitol.

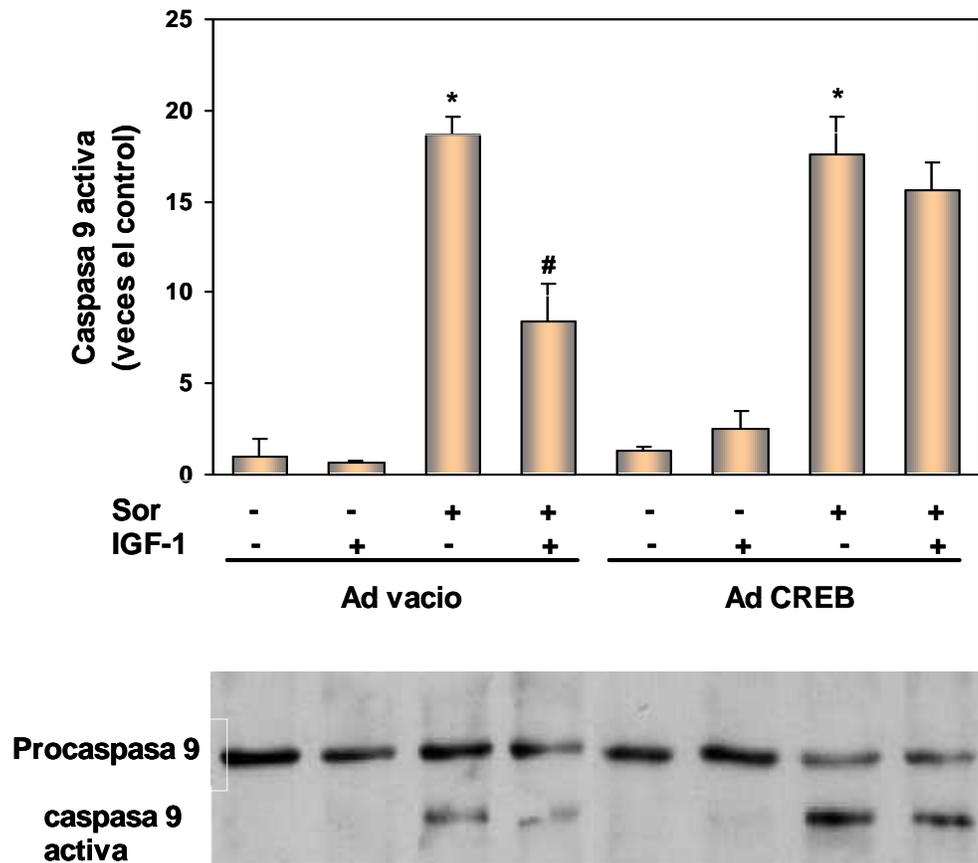


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de una forma mutada de CREB en la activación de caspasa-9

Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron por 24 h con un adenovirus control o con el que sobreexpresa una forma mutada e inactiva de CREB. Luego los cardiomiocitos se expusieron a IGF-1 (10 nM) y/o estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) por 2 h. Luego se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de procaspasa-9 y caspasa-9 por Western blot. La cuantificación densitométrica de los Western blot se muestra en el panel superior. En el panel inferior se muestra un Western blot representativo. Los resultados mostrados corresponden al promedio±SEM (n=3). *p<0,05 vs control y #p<0,05 vs sorbitol.

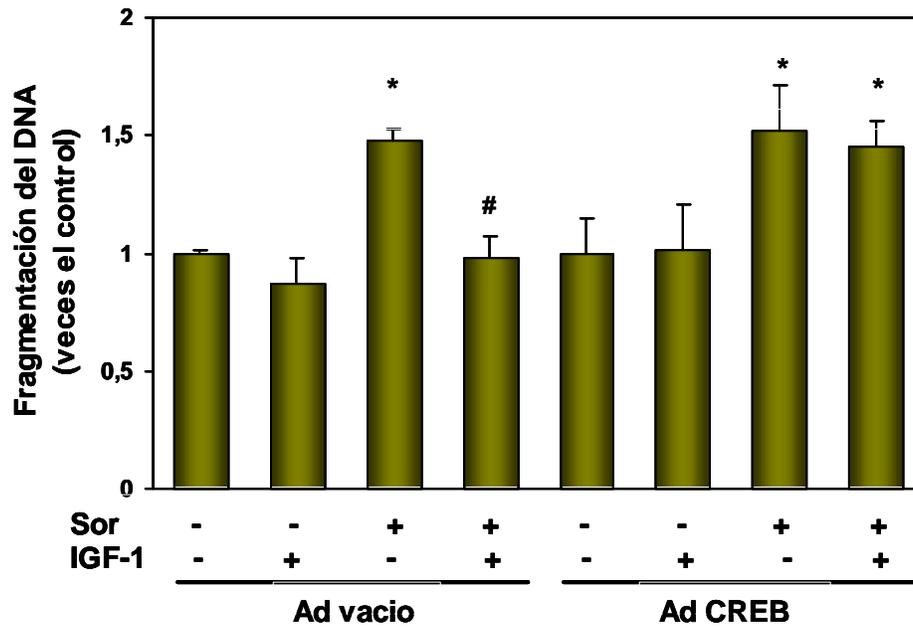


Figura 10. Efecto del dominante negativo de CREB en la fragmentación del DNA

Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron por 24 h con un adenovirus control o con el que sobrexpresas una forma mutada e inactiva de CREB. Luego los cardiomiocitos se expusieron a IGF-1 (10 nM) y/o estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) por 24 h. Luego se aisló el DNA, se analizó su fragmentación en geles de agarosa al 2% y se cuantificó densitométricamente. Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SEM (n=3). *p<0,05 vs control y #p<0,05 vs sorbitol..

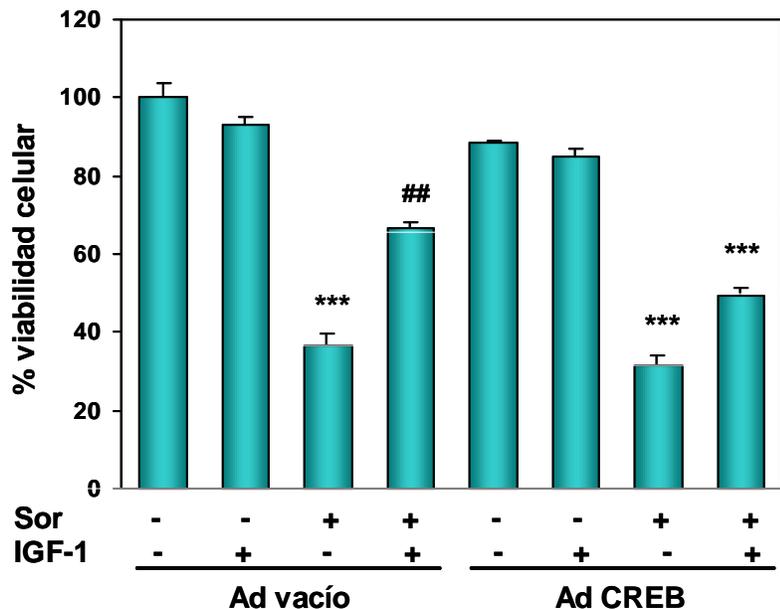


Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de una forma mutada de CREB en la viabilidad del cardiomiocito

Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron por 24 h con un adenovirus control o con el que sobreexpresa una forma mutada e inactiva de CREB. Luego los cardiomiocitos se expusieron a IGF-1 (10 nM) y/o estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) por 24 h. Las células se despegaron de la placa por tripsinización, se incubaron con azul de tripán y las células viables y no viables se contaron en una cámara de Neubauer bajo microscopía. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=4). ***p<0,001 vs control y ##p<0,01 vs sorbitol.

6.2. Estudio de la acción del estrés hiperosmótico y/o IGF-1 sobre el factor transcripcional CREB

La apoptosis es un proceso programado genéticamente, siendo la regulación de la expresión de genes vinculados a este proceso un evento crítico en la decisión entre vida y muerte de una célula cualquiera. Es conocido que factores transcripcionales específicos son activados y participan en eventos apoptóticos regulando la expresión de genes pro o antiapoptóticos. Para entender la activación del factor transcripcional CREB en nuestro modelo de estudio, se investigó el efecto del estrés hiperosmótico por sorbitol y/o IGF-1 sobre el factor transcripcional CREB.

6.2.1. Efecto de estrés hiperosmótico sobre el factor transcripcional CREB

Para determinar el efecto del estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) sobre CREB se utilizaron tres aproximaciones experimentales: fosforilación, distribución subcelular y unión de este factor al DNA.

El grado de fosforilación del factor CREB se estudió utilizando un anticuerpo que reconoce exclusivamente su forma fosforilada (p-CREB) y otro reconoce a CREB total. Los cardiomiocitos se expusieron por diferentes tiempos a sorbitol (600 mOsm) y el estado de fosforilación se determinó por Western blot en extractos proteicos. La fosforilación se expresó como la razón entre p-CREB y CREB (veces el control) después de la cuantificación por densitometría de los Western blots; como control, se utilizó el tiempo 0 que correspondió a cardiomiocitos no estimulados. Los resultados muestran que el estrés hiperosmótico por sorbitol aumentó significativamente la fosforilación de CREB, alcanzando un máximo a los 10 min ($9,6 \pm 0,6$ veces el control), seguido de una disminución gradual que en los tiempos estudiados no alcanzó a llegar al nivel basal (Figura 12).

Para estudiar el efecto de sorbitol en la redistribución subcelular de CREB se utilizó un anticuerpo específico que reconocen a la proteína CREB. Los cardiomiocitos se trataron por diferentes tiempos con sorbitol (600 mOsm) y los niveles de CREB en las fracciones nucleares y citosólicas se determinaron por Western blots. Como control de carga proteica se utilizaron las proteínas β -actina y TFIIB para citoplasma y núcleo, respectivamente. Los niveles de CREB se expresaron como la razón entre CREB y β -actina o entre CREB y TFIIB

para citoplasma y núcleo, respectivamente. Los resultados mostraron que el estrés hiperosmótico por sorbitol tendió a aumentar los niveles de CREB en la fracción nuclear a los 30 min. También a los 60 min de exposición, los niveles de CREB en la fracción citosólica disminuyeron significativamente ($0,4 \pm 0,1$ veces respecto al control) (Figura 13).

El efecto del estrés hiperosmótico por sorbitol en la unión de CREB a su secuencia consenso se estudió por ensayos de unión (EMSA) y “supershift”, donde se utilizó un oligonucleótido comercial que contiene un sitio de unión para CREB y que se marcó radioactivamente con ^{32}P . Los experimentos se realizaron con extractos nucleares de cardiomiocitos estimulados con sorbitol y los cambios en la movilidad electroforética (que indica unión del factor a su sitio consenso) se visualizaron por autorradiografía. La identificación de CREB en el complejo proteico que se unió al oligonucleótido se realizó por ensayos de “supershift”, para tal fin se utilizó un anticuerpo específico anti-CREB y se realizaron controles con extractos nucleares de cardiomiocitos estimulados con sorbitol incubados con: a) con sondas que contienen una mutación en la región de consenso de unión al factor transcripcional y, b) oligonucleótido “frío” en exceso (ensayo de competencia). Al analizar el efecto de estrés hiperosmótico en la unión de CREB a su secuencia consenso, se observó que este estímulo produce un significativo aumento en la unión a las 0,5 y 1 h, observándose un aumento menos marcado en los tiempos tardíos de estimulación: 2 y 4 h (Figura 14).

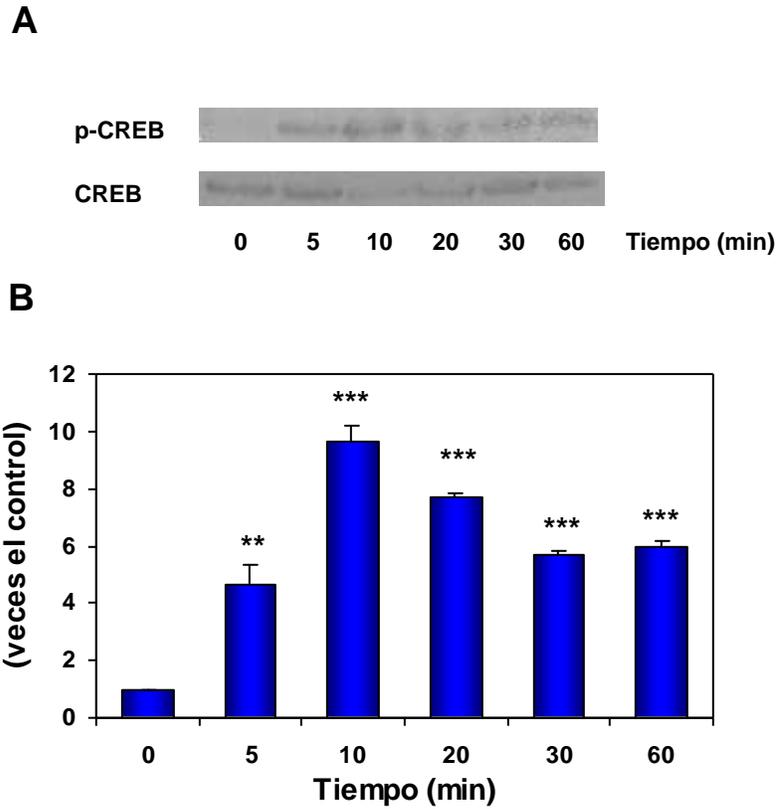


Figura 12. Efectos del estrés hiperosmótico en la activación de CREB por fosforilación

Los cardiomiocitos se expusieron a sorbitol (600 mOsm) por los tiempos indicados, se prepararon extractos proteicos y se determinaron los niveles de CREB total (CREB) y fosforilado (p-CREB) por Western blot (Panel A) tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. En B se muestra la cuantificación densitométrica de la razón p-CREB/CREB total. Los resultados corresponden al promedio ($n=3$) \pm SEM. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs control.

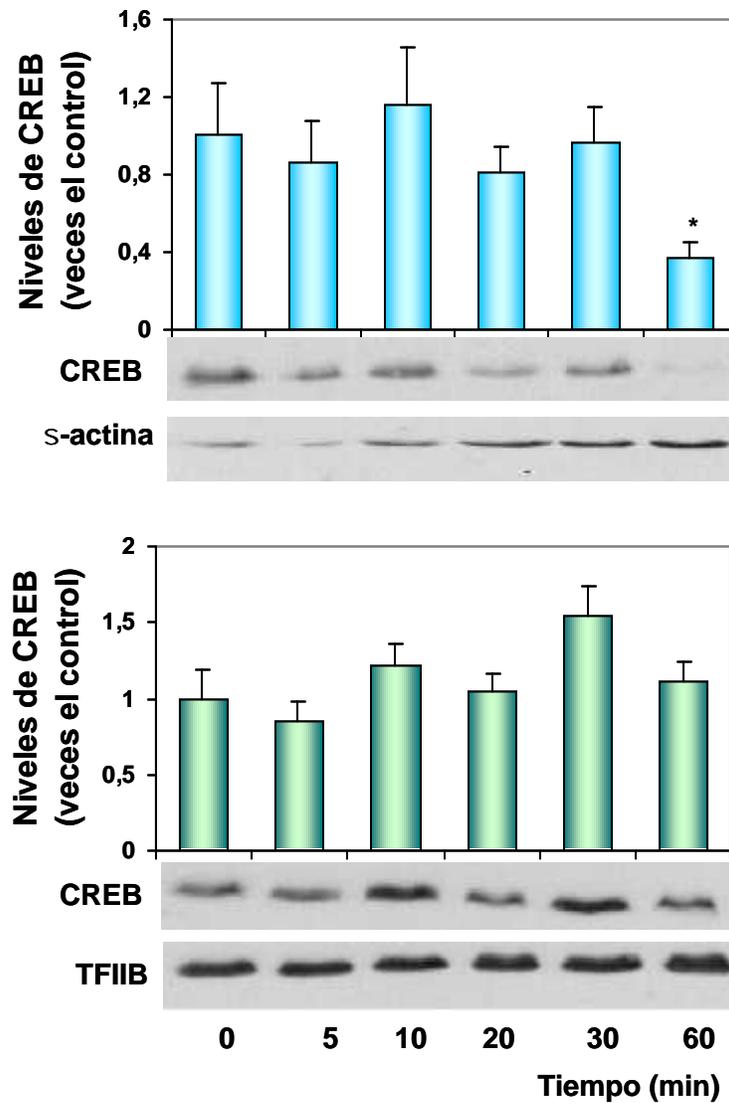


Figura 13. Efecto del estrés hiperosmótico en la distribución subcelular de CREB

Los cardiomiocitos se trataron con sorbitol (600 mOsm) a los tiempos indicados, se prepararon extractos nucleares y citosólicos y se determinaron los niveles de CREB total junto con los de β -actina y TFIIB por Western blot (panel superior e inferior, respectivamente). En cada panel se muestra gráfico de la cuantificación densitométrica de la razón entre CREB y la proteína control de carga (veces el control). Los resultados corresponden al promedio ($n=5$) \pm SEM. * $p<0,05$ vs control.

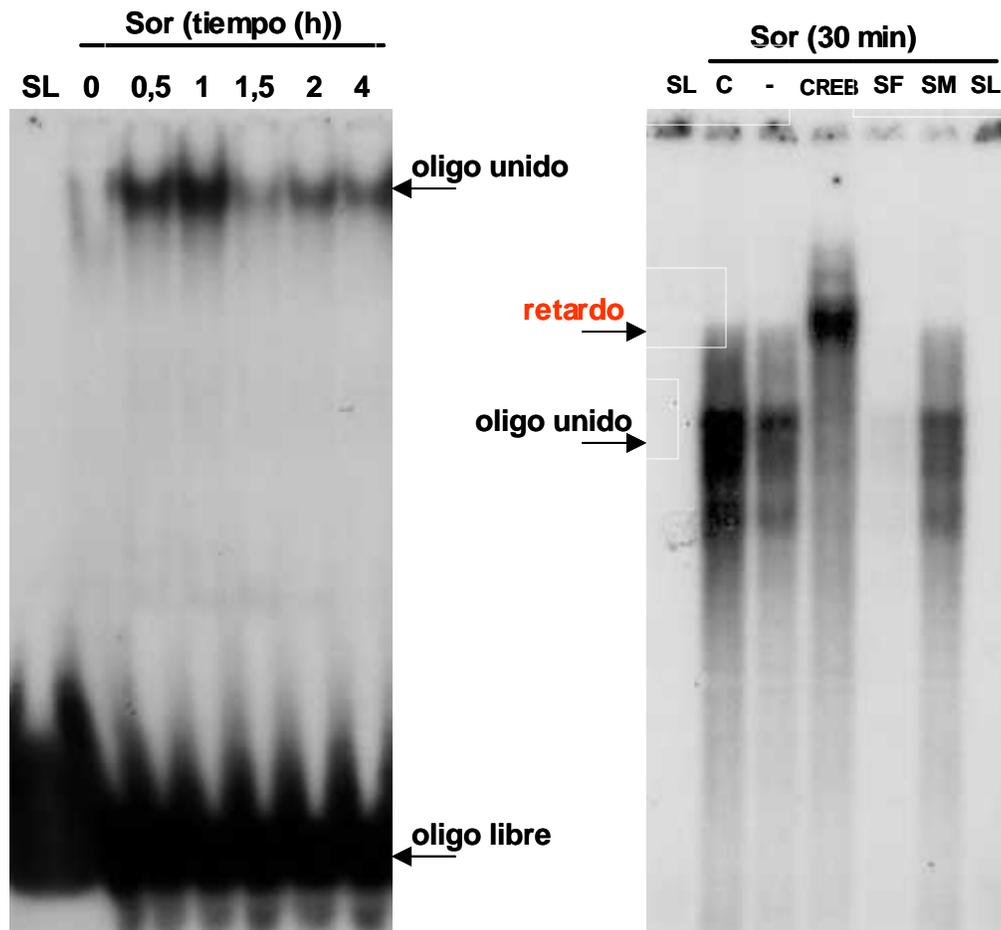


Figura 14. Efecto del estrés hiperosmótico en la unión de CREB a secuencia de consenso en ensayos de retardo electroforético (EMSA) y Supershift.

Los cardiomiocitos se expusieron a sorbitol (600 mOsm) por distintos tiempos, se prepararon extractos nucleares que se incubaron con un oligonucleótido marcado con ^{32}P que contiene el sitio de unión a CREB. Los complejos se resolvieron en geles de poliacrilamida y se autoradiografiaron. Para los ensayos de supershift, los extractos nucleares se preincubaron con un oligonucleótido que contiene el sitio de unión a CREB frío (SF), o con una sonda mutada (SM) o con un anticuerpo anti-CREB (CREB). Posteriormente, los extractos se incubaron con el oligonucleótido- ^{32}P , se resolvieron en geles de poliacrilamida y se autoradiografiaron. Como control se utilizó extractos de cardiomiocitos sin estimular (C) e incubación de la sonda sin extracto nuclear (SL).

6.2.2. Efectos del IGF-1 sobre el factor transcripcional CREB en el cardiomiocito

Para determinar si IGF-1 activa a CREB se estudiaron los cambios de distribución subcelular de CREB entre las fracciones citosólicas y nucleares, su grado de fosforilación y su unión a su secuencia de consenso entre 0 y 90 min.

Como se mencionó anteriormente, el grado de fosforilación de CREB se determinó a través de los niveles de la forma fosforilada de CREB en serina-133 (p-CREB) y CREB total por Western blot. El grado de fosforilación se expresó como la razón entre p-CREB y CREB (veces el control) obtenida a partir de la cuantificación densitométrica de los Western blots. La Figura 15 muestra que IGF-1 aumentó la fosforilación de CREB a $6,5 \pm 1,0$ y $4,8 \pm 0,5$ a los 5 y 10 min, respectivamente, seguido de una disminución progresiva que fue evidente a los 30 min. Sin embargo, a los 60 min se observó un nuevo incremento en la fosforilación de CREB ($3,2 \pm 0,5$).

Para investigar si IGF-1 cambió la distribución subcelular de CREB, se determinaron sus niveles citosólicos y nucleares por Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce a CREB. Para normalizar la cantidad de CREB con respecto a las proteínas cargadas, los datos se corrigieron por los niveles de β -actina y TFIIB en las fracciones citosólicas y nucleares, respectivamente. Los resultados mostraron que IGF-1 estimuló la redistribución de CREB (Figura 16). A los 30 min de tratamiento con IGF-1 se detectó una disminución en los niveles de CREB en la fracción citosólica ($0,3 \pm 0,1$) que se acompañó de un aumento concomitante en la fracción nuclear ($2,1 \pm 0,4$), retornando esta redistribución a niveles basales después de 60 min.

Uno de los últimos eventos en la activación de CREB es su unión a una secuencia de consenso presente en los promotores de sus genes blanco; la cual puede ser evidenciada a través de ensayos de movilidad electroforética. Para tal efecto se realizaron EMSAs y "supershift", utilizando un oligonucleótido comercial radiomarcado con ^{32}P que contiene un sitio consenso para CREB y extractos nucleares de cardiomiocitos estimulados con IGF-1 (10 nM). Los cambios de movilidad electroforética se visualizaron por autorradiografía. Los resultados mostrados en la Figura 17 indican que IGF-1 aumentó la unión de CREB a su secuencia consenso a partir de los 15 min, manteniéndose hasta los 90 min. La identidad del complejo proteico que se unió al oligonucleótido marcado se investigó por ensayos de

“supershift”, utilizando un anticuerpo anti-CREB. El retardo adicional observado con el anticuerpo anti-CREB demostró la presencia de CREB en el complejo que se une al oligonucleótido utilizado.

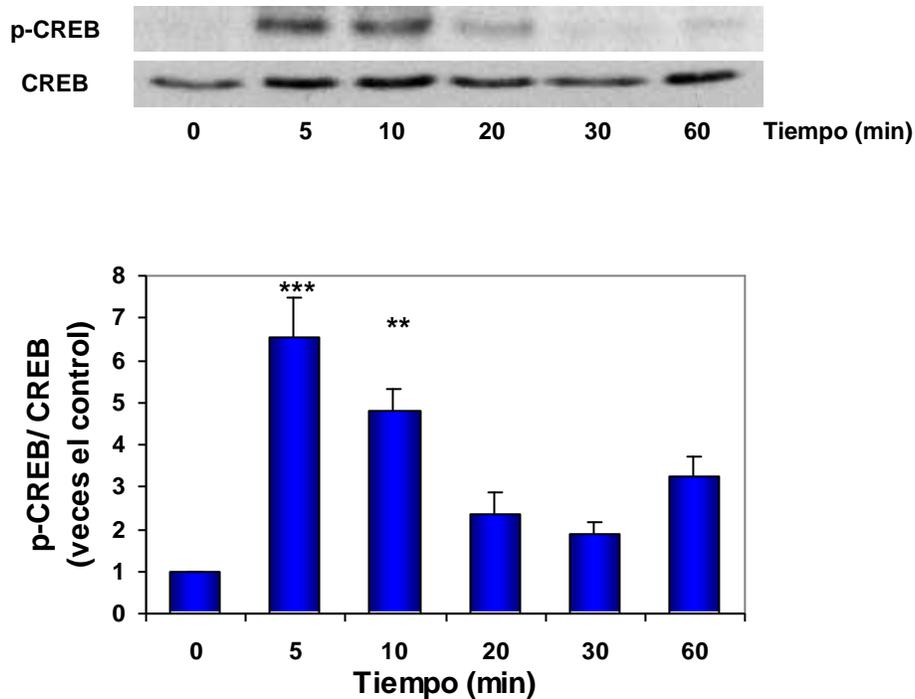


Figura 15. Efecto del IGF-1 en la fosforilación de CREB

Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con IGF-1 (10 nM) a los tiempos indicados. Se prepararon extractos proteicos y se determinaron los niveles de CREB fosforilado (p-CREB) y CREB por Western blot (panel superior). El gráfico representa la cuantificación densitométrica de la razón p-CREB/CREB (panel inferior). Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3). **p<0,01 y ***p<0,001 vs control.

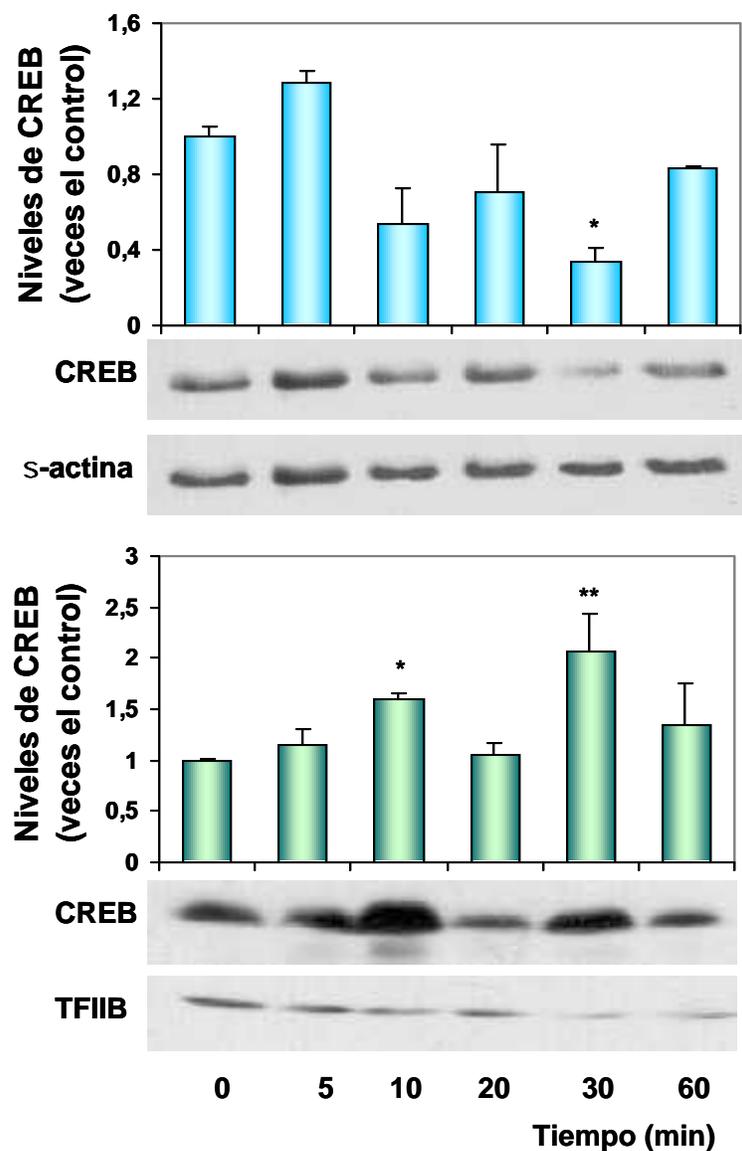


Figura 16. Efecto de IGF-1 en la distribución subcelular de CREB

Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con IGF-1 (10 nM) a los tiempos indicados. Luego se prepararon extractos nucleares y citosólicos y se determinaron los niveles de CREB total, β -actina y TFIIB por Western blot. El gráfico representa la cuantificación densitométrica de la razón entre CREB y la proteína control de carga (veces el control). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs control.

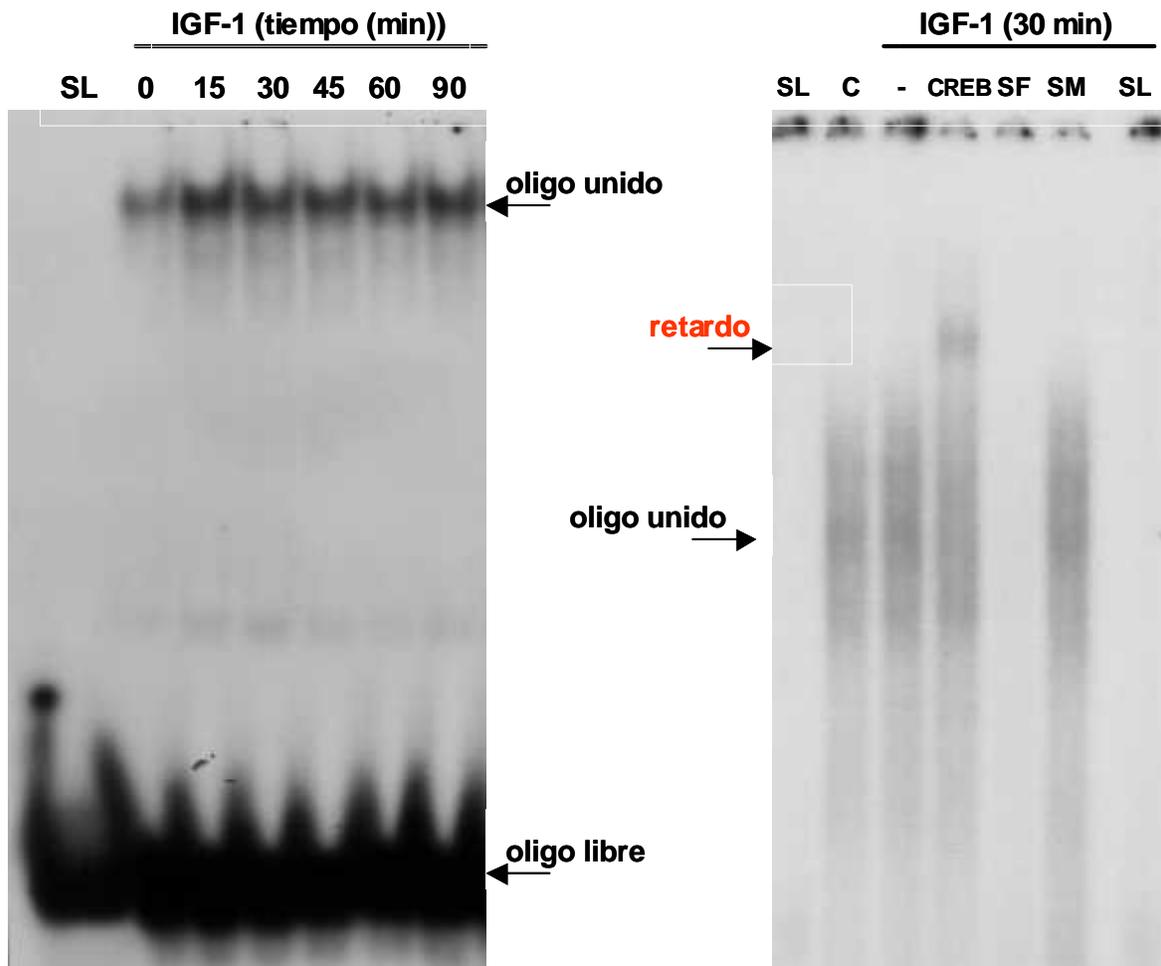


Figura 17. Efecto del IGF-1 en la unión de CREB a su secuencia de consenso

Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con IGF-1 (10 nM) por distintos tiempos. Se prepararon extractos proteicos nucleares y se incubaron con un oligonucleótido marcado con ^{32}P que contiene el sitio de unión para CREB. Los complejos se resolvieron en geles de poliácridamida y se autoradiografiaron (Panel izquierdo). Para los ensayos de supershift (Panel derecho), los extractos nucleares se preincubaron a) con una concentración del mismo oligonucleótido no marcado (SF) 100 veces superior a la del oligonucleótido marcado, b) con una concentración de una sonda fría mutada en la secuencia de reconocimiento (SM) 1000 veces superior a la de la sonda marcada o con un anticuerpo anti-CREB. Posteriormente los extractos se incubados con el oligonucleótido marcado con ^{32}P , se resolvieron en geles de poliácridamida y se autoradiografiaron. Como control se utilizó extractos de cardiomiocitos sin estímulo (C) o sonda marcada sin extracto nuclear (SL).

6.2.3. Efecto del pretratamiento de IGF-1 en la activación de CREB dependiente del estrés hiperosmótico

Los resultados descritos en las secciones anteriores mostraron que tanto IGF-1 como el estrés hiperosmótico por sorbitol activaron al factor transcripcional CREB. La pregunta lógica que surgió fue evaluar cuál sería el efecto conjunto de los estímulos y para ello se evaluaron sus acciones a nivel de la activación de CREB por fosforilación y su unión a una secuencia de DNA.

El grado de fosforilación de CREB se evaluó mediante la determinación de los niveles de CREB fosforilado (p-CREB) y CREB total (CREB) por Western blots, utilizando extractos totales de cardiomiocitos preestimulados con IGF-1 (10 nM, 30 min) y posteriormente expuestos a IGF-1 más sorbitol (600 mOsm). La Figura 18 muestra que el IGF-1 aumentó la fosforilación de CREB después de 30 min de exposición, la cual disminuyó por acción del estrés hiperosmótico y fue evidente a los 10 min ($0,8 \pm 0,3$), a partir del cual se mantuvieron bajos los niveles respecto al control.

Para establecer el efecto que tienen los dos estímulos en estudio en la unión del factor al DNA, se realizaron ensayos de unión (EMSA) utilizando el oligonucléotido comercial antes mencionado. Los experimentos se realizaron con extractos nucleares de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) previa incubación por 30 min con IGF-1 (10 nM). Los cambios en la movilidad electroforética se visualizaron por autorradiografía. La movilidad electroforética de CREB en cardiomiocitos expuestos a sorbitol no se modificó de manera significativa por el pretratamiento con IGF-1 (Figura 19); observándose además que los patrones de unión, en este caso particular, se parecían a los detectados en los cardiomiocitos expuestos sólo a sorbitol (Figura 14). Estos resultados indican que los efectos del estrés hiperosmótico por sorbitol predominarían sobre los del IGF-1 en la afinidad de CREB por su secuencia consenso.

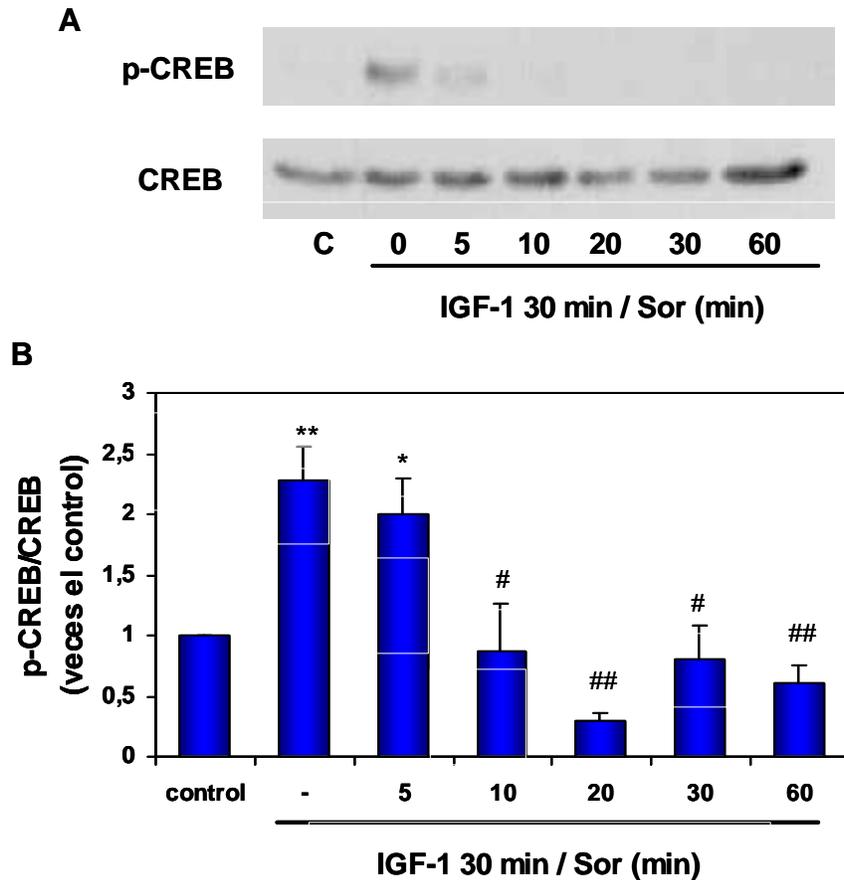


Figura 18. Efecto del IGF-1 en la fosforilación de CREB inducida por estrés hiperosmótico

Cultivos primarios de cardiomiocitos se preincubaron con IGF-1 (10 nM) por 30 min y luego se expusieron a estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) en presencia de IGF-1 por los tiempos indicados. Luego se prepararon los extractos proteicos y se determinaron los niveles de CREB fosforilado (p-CREB) y CREB total por Western blot (Panel A). El gráfico muestra la cuantificación de la razón p-CREB/CREB (Panel B). Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n = 3). *p<0,05, **p<0,01 vs control; #p<0,05 y ##p<0,01 vs sorbitol.

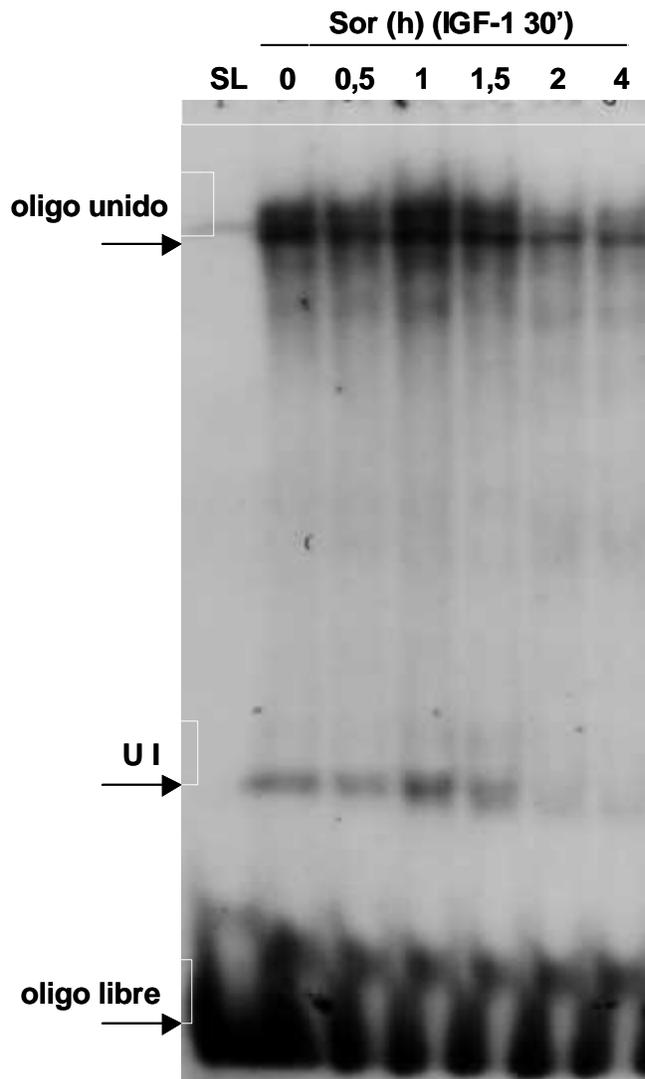


Figura 19. Efecto del IGF-1 en la unión de CREB a su secuencia de consenso inducida por estrés hiperosmótico

Cultivos primarios de cardiomiocitos se pretrataron con IGF-1 (10 nM) por 30 min y luego con la asociación IGF-1 y sorbitol (600 mOsm) por los tiempos indicados. Posteriormente se obtuvieron extractos nucleares y se incubaron con un oligonucleotido marcado con ^{32}P que contenía el sitio de unión a CREB. Los complejos se resolvieron en geles de poliacrilamida y se autorradiografiaron. Como controles se utilizaron extractos de cardiomiocitos no estimulados (C) o sonda radiomarcada no incubada con extracto nuclear (SL). UI: unión inespecífica.

6.3. Regulación transduccional de la activación de CREB

Hemos demostrado que tanto IGF-1 y estrés hiperosmótico, juntos o por separado, activan al factor transcripcional CREB y además, que este factor mediaría los efectos antiapoptóticos del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, pero no conocemos los mecanismos involucrados en la regulación de esta activación.

Debido a que la fosforilación de CREB, como la de otros factores de transcripción, es una etapa determinante en su activación transcripcional y es regulada por la activación de diversas vías de transducción, se evaluó el efecto de inhibidores químicos de rutas transduccionales en la fosforilación de CREB inducida por estrés hiperosmótico e IGF-1.

Para investigar los mecanismos responsables de la fosforilación de CREB estimulada por sorbitol, se estudiaron los efectos de conocidos inhibidores de distintas vías transduccionales. Para ello, los cardiomiocitos se preincubaron por 30 min con inhibidores para las vías p38-MAPK (SB20358), ERK (PD098059), PI3-K (LY294002), calcineurina (CsA) y Calmodulina Kinasa (KN62), o con un quelante del Ca^{2+}_i (BAPTA-AM); y luego se trataron por 10 min con sorbitol (600 mOsm). Los resultados mostraron que los inhibidores de las vías p38-MAPK (SB20358) y ERK (PD098059), pero no de la vía PI3K/PKB (LY294002) bloquearon significativamente la fosforilación de CREB inducida por sorbitol (Figura 20). Al estudiar el Ca^{2+}_i y las vías reguladas por Ca^{2+}/CaM , Cn y CaMKII, se observó que sólo el quelante de Ca^{2+}_i (BAPTA-AM) produjo un bloqueo significativo de dicha fosforilación; CsA, el inhibidor de Cn, bloqueó solo parcialmente y no significativamente la fosforilación de CREB inducida por sorbitol y, además se observó que el inhibidor de la vía de las CaMKs (KN62) no tuvo efecto sobre la fosforilación de CREB inducida por estrés hiperosmótico (Figura 21).

A fin de relacionar algunas vías transduccionales activadas por IGF-1 con el incremento en la fosforilación de CREB, se estudió el efecto de diversos inhibidores químicos específicos de diferentes proteínas de señalización. Para ello, los cardiomiocitos se preincubaron por 30 min con inhibidores de las vías antes mencionadas o BAPTA-AM y luego se trataron por 5 min con IGF-1. Los resultados mostraron que todos los inhibidores y el quelante de Ca^{2+}_i atenuaron la fosforilación de CREB inducida por IGF-1 (Figuras 22 y 23). Estos datos indican que las vías transduccionales estudiadas y Ca^{2+} mediarían el efecto del

IGF-1 sobre la activación por fosforilación de CREB. Los inhibidores por si solos no modificaron la fosforilación basal de CREB en los cardiomiocitos (datos no mostrados).

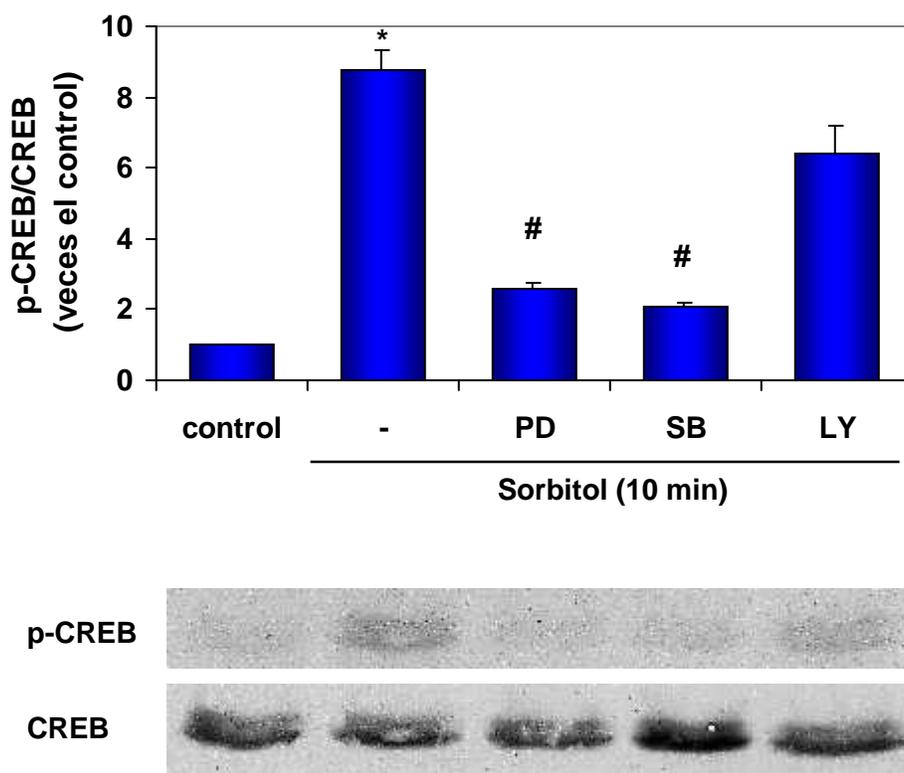


Figura 20. Efecto de inhibidores de vías transduccionales en la fosforilación de CREB estimulada por estrés hiperosmótico por sorbitol en el cardiomiocito

Cultivos primarios de cardiomiocitos se preincubaron por 30 min con alguno de los siguientes compuestos: PD098059 (50 μ M, inhibidor de MEK1), SB20358 (10 μ M, inhibidor de p38-MAPK) o LY294002 (50 μ M, inhibidor de PI3-K). Posteriormente se expusieron por 10 min a estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) y se determinaron los niveles de CREB total y p-CREB por Western blot (panel inferior). Análisis densitométrico de los Western blots (panel superior). Los resultados corresponden al promedio ($n = 3$) \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs sorbitol.

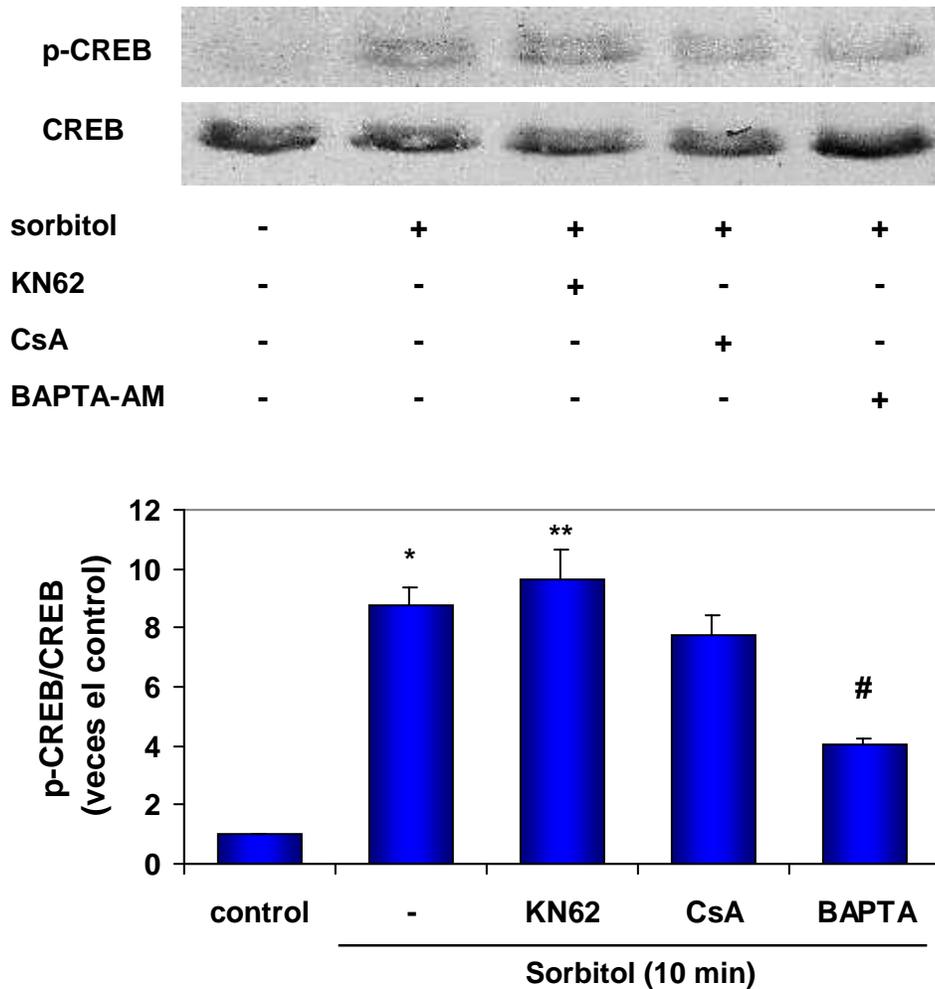


Figura 21. Ca^{2+}_i y vías dependientes de Ca^{2+} /CaM en la fosforilación de CREB estimulada por estrés hiperosmótico por sorbitol en el cardiomiocito

Cultivos primarios de cardiomiocitos se preincubaron por 30 min con alguno de los siguientes compuestos: CsA (0,5 μ M; inhibidor de calcineurina), KN62 (1 μ M, inhibidor de CaMKII) o con BAPTA-AM (un quelante de Ca^{2+} , 100 μ M). Posteriormente se expusieron por 10 min a estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) y se determinaron los niveles de CREB total y p-CREB por Western blot (panel inferior). Análisis densitométrico de los Western blots (panel superior). Los resultados corresponden al promedio ($n = 3$) \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs control, # $p < 0,05$ vs sorbitol.

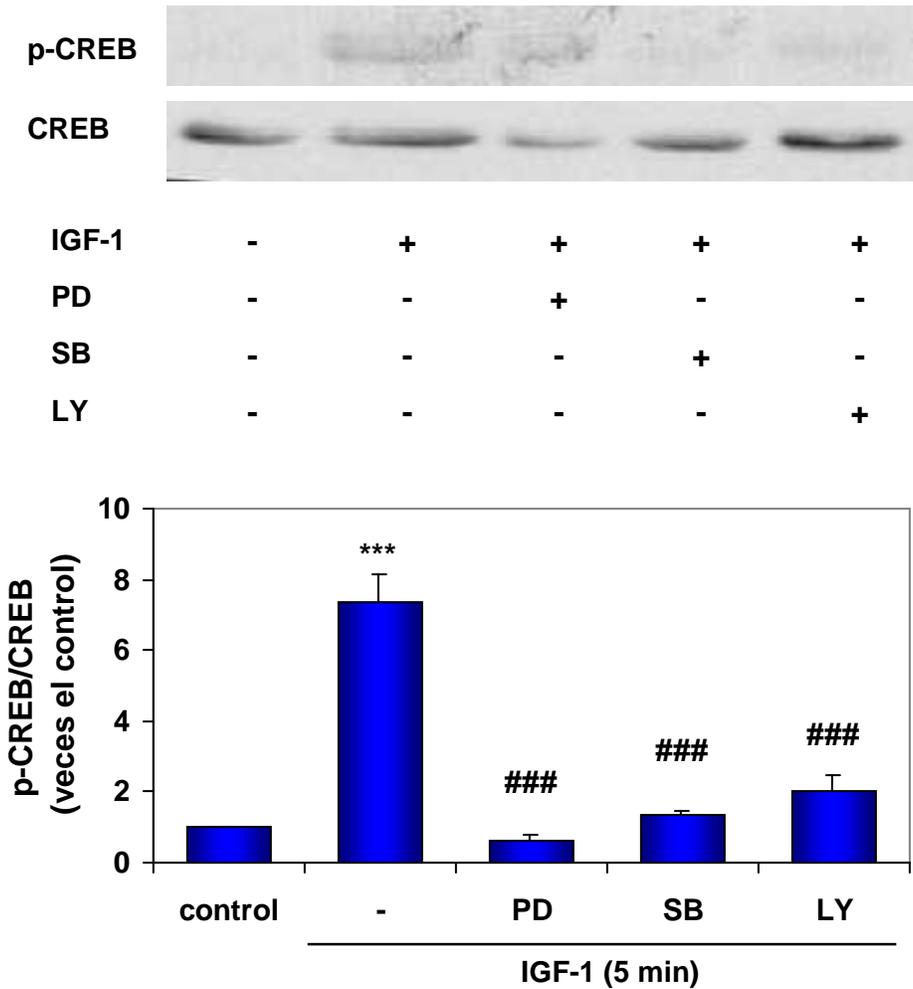


Figura 22. Efecto de inhibición de vías transduccionales activadas por IGF-1 en la fosforilación de CREB

Cultivos primarios de cardiomiocitos se preincubaron durante 5 min con alguno de los siguientes compuestos: PD098059 (50 μ M, inhibidor de MEK-1), SB20358 (10 μ M, inhibidor de p38-MAPK) o LY294002 (50 μ M, inhibidor de PI3-K). Posteriormente, las células se trataron por 5 min con IGF-1 (10 nM), determinándose los niveles de CREB total y fosforilado por western blot. El gráfico corresponde al resultado del análisis densitométrico de los Western blots. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n = 3). ***p<0,001 vs control y ###p<0,001 vs IGF-1.

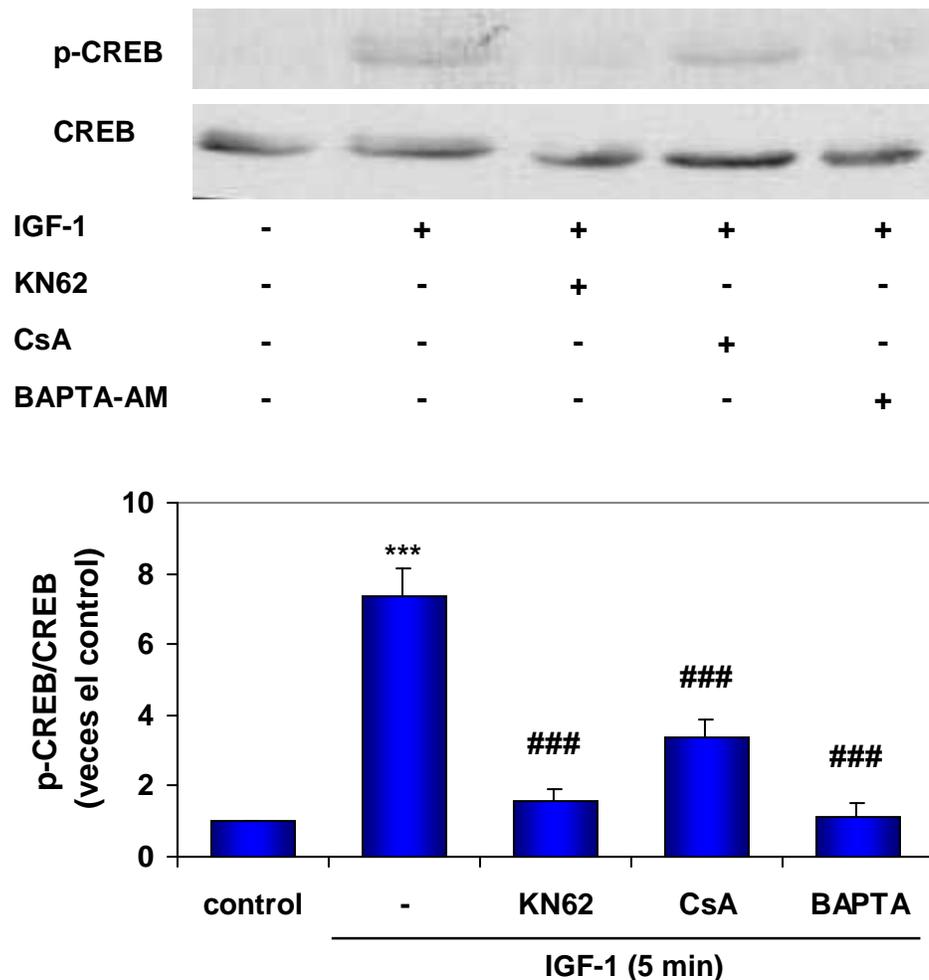


Figura 23. Ca^{2+}_i y vías dependientes de Ca^{2+} /CaM en la fosforilación de CREB inducida por IGF-1

Cultivos primarios de cardiomiocitos se preincubaron durante 5 min con alguno de los siguientes compuestos: CsA (0,5 μ M, inhibidor de calcineurina), KN62 (1 μ M, inhibidor de CaMK II) o BAPTA-AM (100 μ M, quelante del Ca^{2+} intracelular). Posteriormente, las células se trataron por 5 min con IGF-1 (10 nM), determinándose los niveles de CREB total y fosforilado por western blot. El gráfico corresponde al resultado del análisis densitométrico de los Western blots. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n = 3). ***p<0,001 vs control y ###p<0,001 vs IGF-1.

6.4. Caracterización de los cambios temporo-espaciales en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducidos por estrés hiperosmótico

Hasta aquí hemos demostrado que CREB: se activa por IGF-1 y/o estrés hiperosmótico; participa en la señalización antiapoptótica de IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico; y se activa diferencialmente según el estímulo. Debido a que en nuestro laboratorio se ha demostrado que las vías involucradas en la regulación de CREB se activan por IGF-1 y estrés hiperosmótico, y además se conoce que IGF-1 moviliza Ca^{2+} en los cardiomiocitos, pero se desconoce si el estrés hiperosmótico genera señales de Ca^{2+} , se estudió el efecto del estrés hiperosmótico en el Ca^{2+}_i en cardiomiocitos en cultivo expuestos a sorbitol.

Los cambios del Ca^{2+} intracelular del cardiomiocito inducidos por estrés hiperosmótico por sorbitol se estudiaron mediante los cambios de fluorescencia de la sonda fluo-3AM por microscopia de epifluorescencia. El estrés hiperosmótico, en presencia de Ca^{2+} externo, produjo un rápido y significativo aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , con un máximo alrededor de los 26 seg post-estímulo, seguido de una disminución gradual en el tiempo (Figuras 24A y B). Los estudios de los cambios de Ca^{2+} inducidos por sorbitol en regiones precisas de la célula se realizaron mediante los análisis de regiones ópticas de interés (ROI), seleccionándose dos regiones de áreas equivalentes: una en la zona citoplasmática y otra en la nuclear. Dentro de cada contorno se calculó y cuantificó la intensidad de fluorescencia en cada una de las imágenes de la secuencia adquirida. Los cursos temporales de los cambios relativos de fluorescencia, mostraron que los aumentos transitorios de Ca^{2+} se presentaron primero, y con mayor intensidad, a nivel citoplasmático y luego a nivel nuclear (Figura 24C).

Los niveles intracelulares de Ca^{2+} también aumentaron rápida y significativamente en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico en un medio libre de Ca^{2+} externo, observándose un máximo alrededor de los 30 seg, seguido de una disminución gradual que llegó a valores de fluorescencia cercanos a los valores basales (Figuras 25A y B). En estas condiciones, los análisis ROI mostraron que los aumentos de Ca^{2+} se presentaron primero en el citoplasma y posteriormente en el núcleo (Figura 25C).

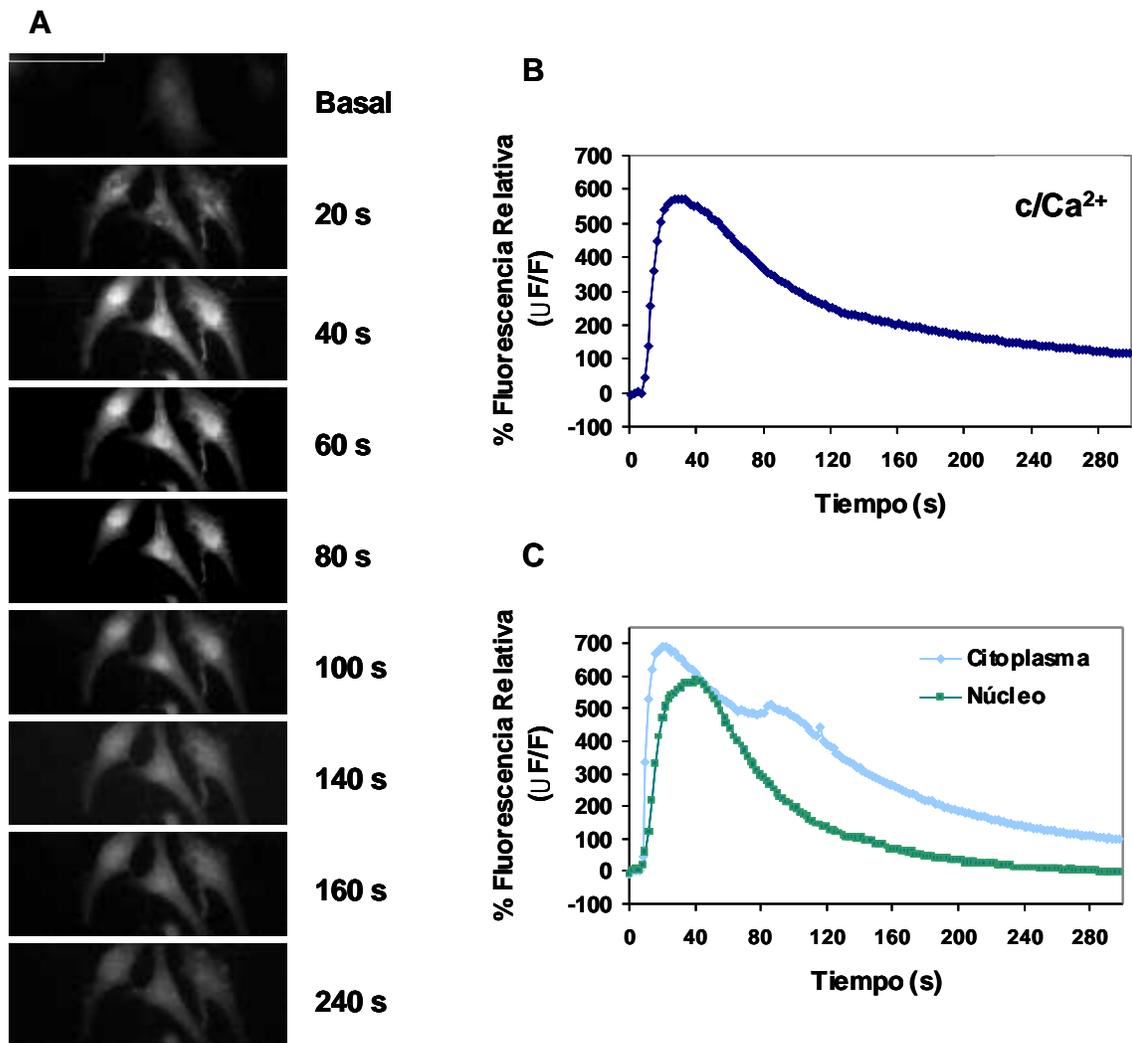


Figura 24. Efecto del estrés hiperosmótico en los niveles intracelulares de calcio en cardiomiocitos cultivados en medio que contenía calcio

Cardiomiocitos se preincubaron con fluo-3AM y luego tratados con sorbitol (600 mOsm) en un medio con Ca^{2+} . Utilizando microscopía de fluorescencia equipada con una cámara CDD, se obtuvieron (A) y registraron (B) imágenes de los cardiomiocitos. Se realizó un análisis de la región de interés (ROI) tanto en el núcleo como en el citoplasma (C).

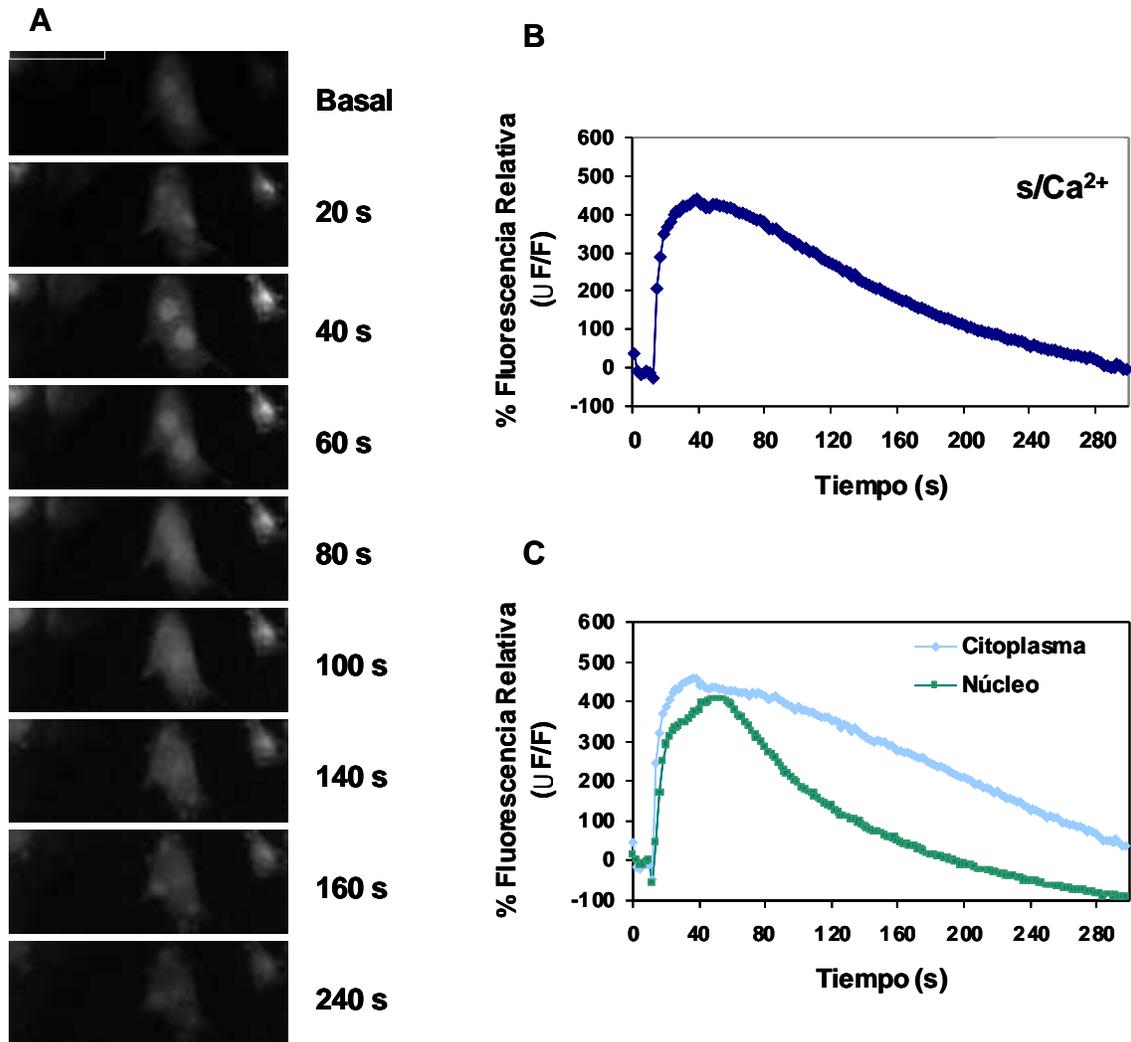


Figura 25. Efecto del estrés hiperosmótico en los niveles intracelulares de calcio en cardiomiocitos cultivados en medio libre de calcio

Cultivos primarios de cardiomiocitos se preincubaron con fluo-3AM y luego expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol (600mOsm) en un medio libre de Ca²⁺ (0,5 mM EGTA). Las imágenes de los cardiomiocitos se obtuvieron (A) y registraron (B), utilizando un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara CDD. Los análisis de la región de interés (ROI) tanto en el núcleo como en el citoplasma se muestran en el panel C.

6.5. Caracterización del origen del Ca^{2+} intracelular movilizado por estrés hiperosmótico

Para determinar el origen del Ca^{2+} movilizado por el estrés hiperosmótico dependiente de sorbitol se utilizó BAPTA-AM, un quelante que captura el Ca^{2+} intracelular e impide su unión al Fluo-3AM. Los cardiomiocitos se preincubaron con BAPTA-AM (100 μM) en un medio de reposo con Ca^{2+} o en un medio libre de Ca^{2+} , y posteriormente se trataron con sorbitol (600 mOsm). En la figura 26A se observa que la presencia de BAPTA, en un medio de reposo libre de Ca^{2+} , bloqueó completamente la señal producida por sorbitol. En cambio, BAPTA en presencia de Ca^{2+} externo no bloqueó, pero modificó la cinética de las transientes de Ca^{2+} inducidas por sorbitol (Figura 26B). Estos resultados, junto con los del punto anterior, muestran que el Ca^{2+} movilizado por el estrés hiperosmótico por sorbitol proviene tanto del medio extracelular como del intracelular.

Para determinar los responsables de la entrada de Ca^{2+} producida por sorbitol, se estudió la participación de los canales de Ca^{2+} tipo L. Para ello se utilizó nifedipino, un bloqueador de los canales de Ca^{2+} tipo L. Los cardiomiocitos se preincubaron por 30 min con nifedipino (10 μM), en un medio de reposo que contenía Ca^{2+} , y posteriormente se trataron con sorbitol (600 mOsm). Nifedipino no bloqueó de manera significativa la señal de Ca^{2+} producida por sorbitol y no cambió las señales a nivel nuclear y citoplasmático (Figura 27A y B). Posteriormente, se estudió el papel de los canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina en el aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} por efecto de sorbitol. Los cardiomiocitos se preincubaron por 30 min con rianodina (20 μM), en un medio de reposo libre de Ca^{2+} , y posteriormente tratados con sorbitol (600 mOsm). Rianodina no produjo cambios significativos en los patrones cinéticos de la señal de calcio dependiente de sorbitol (Figura 28A y B).

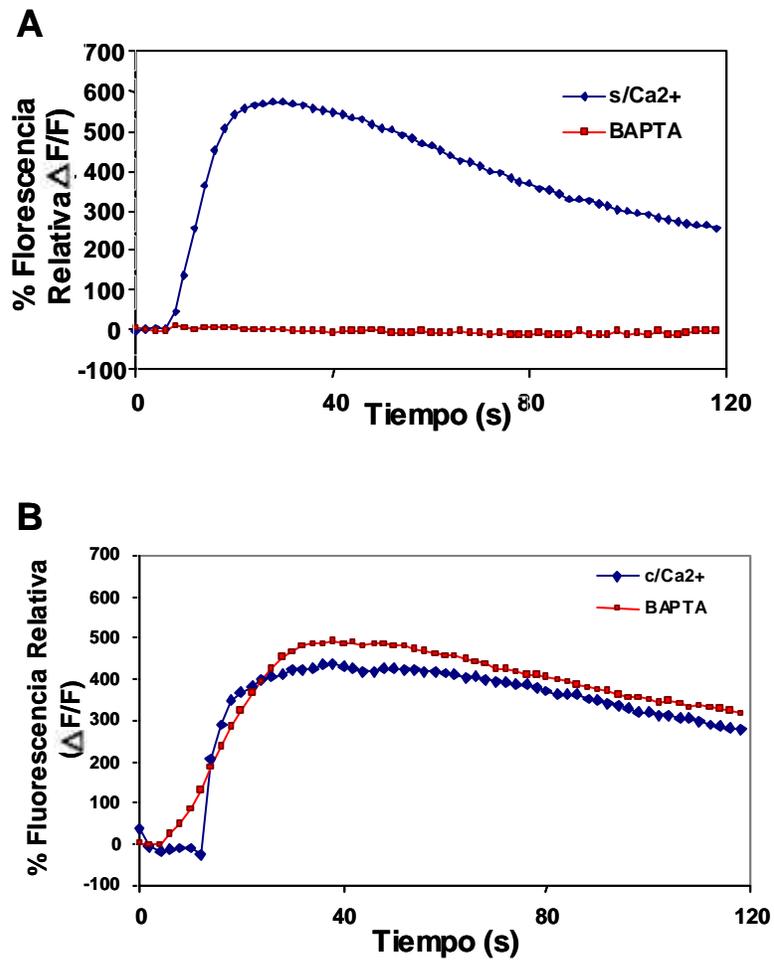


Figura 26. Efecto del BAPTA en los aumentos del calcio intracelular inducidos por el estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos se preincubaron con fluo-3AM y BAPTA-AM (100 μ M) por 30 min y luego se trataron con sorbitol (600 mOsm) en un medio libre de Ca²⁺ (Panel A) o en un medio con Ca²⁺ (Panel B).

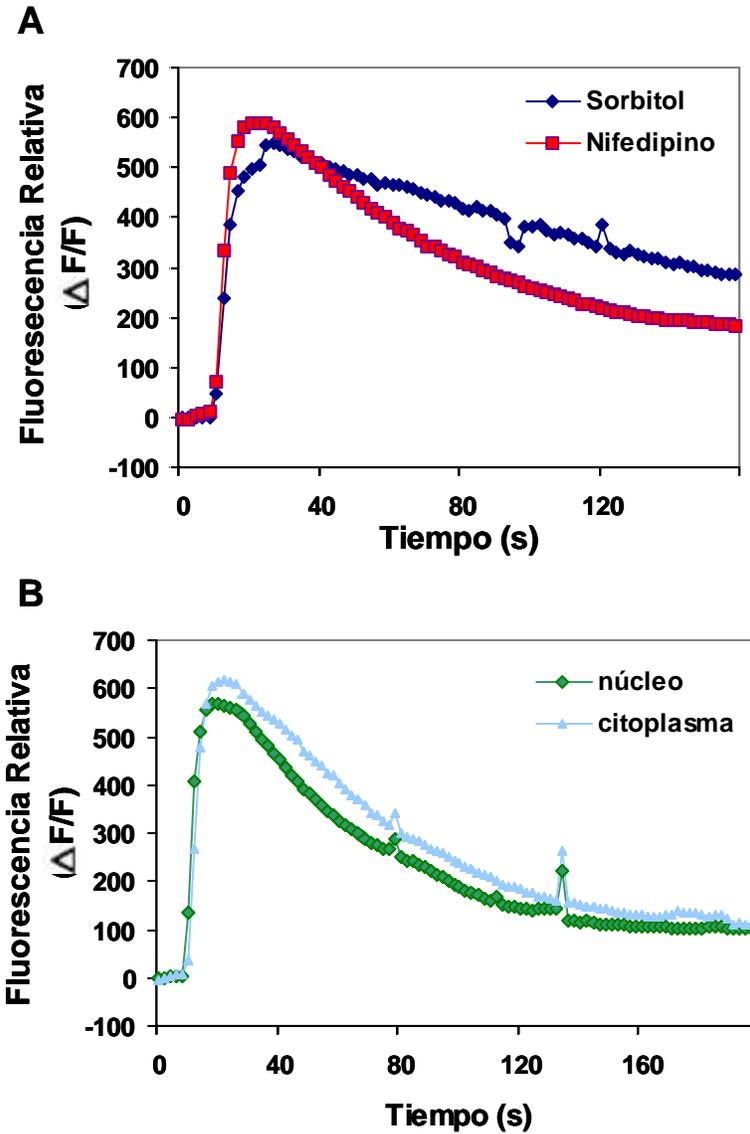


Figura 27. Efecto del nifedipino en el aumento de los niveles de Ca^{2+} inducido por estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos fueron precargados con fluo-3AM, preincubados con nifedipino ($10 \mu\text{M}$) por 30 min y luego tratados con sorbitol (600 mOsm) en un medio con Ca^{2+} (A). Se realizó un análisis de la región de interés (ROI) tanto en el núcleo como en el citoplasma (B).

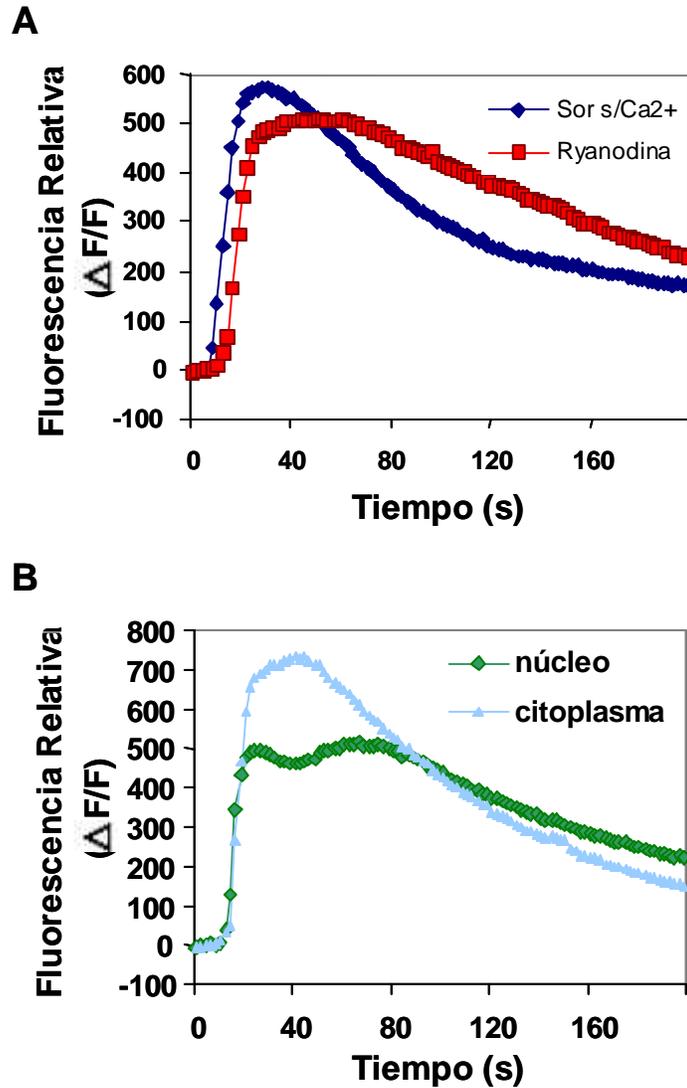


Figura 28. Efecto de rianodina en el aumento de los niveles de Ca²⁺ inducido por estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos fueron precargados con fluo-3AM, preincubados con rianodina (20 μ M) por 30 min y luego tratados con sorbitol (600 mOsm) en un medio libre de Ca²⁺ (A). Se realizó un análisis de la región de interés (ROI) tanto en el núcleo como en el citoplasma (B).

6.6. Efecto de inhibidores de la vía del IP₃ en la señal de Ca²⁺ inducida por estrés hiperosmótico

Para estudiar el mecanismo involucrado en la liberación de Ca²⁺ producida por el estrés hiperosmótico por sorbitol, se investigaron los efectos de inhibidores farmacológicos de la vía transduccional del IP₃. Los cardiomiocitos se incubaron con un inhibidor de PLC, U73122 (10 μM) y luego se estimularon con sorbitol. En estas condiciones se observó que los aumentos intracelulares de calcio fueron completamente bloqueados por U73122 (Figura 29A), indicando que PLC participa en la liberación de calcio inducida por sorbitol.

Posteriormente se estudió el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores de IP₃ sobre la señal de Ca²⁺ producida por sorbitol, utilizando dos antagonistas de los receptores de IP₃: xestospongina C y B. Ambos antagonistas bloquearon parcialmente, pero de manera significativa, los aumentos intracelulares de Ca²⁺ en respuesta al estrés hiperosmótico por sorbitol (Figuras 29B y C). Estos resultados demuestran que los aumentos de Ca²⁺ producidos por sorbitol dependen de la producción de IP₃ y su unión a sus receptores intracelulares.

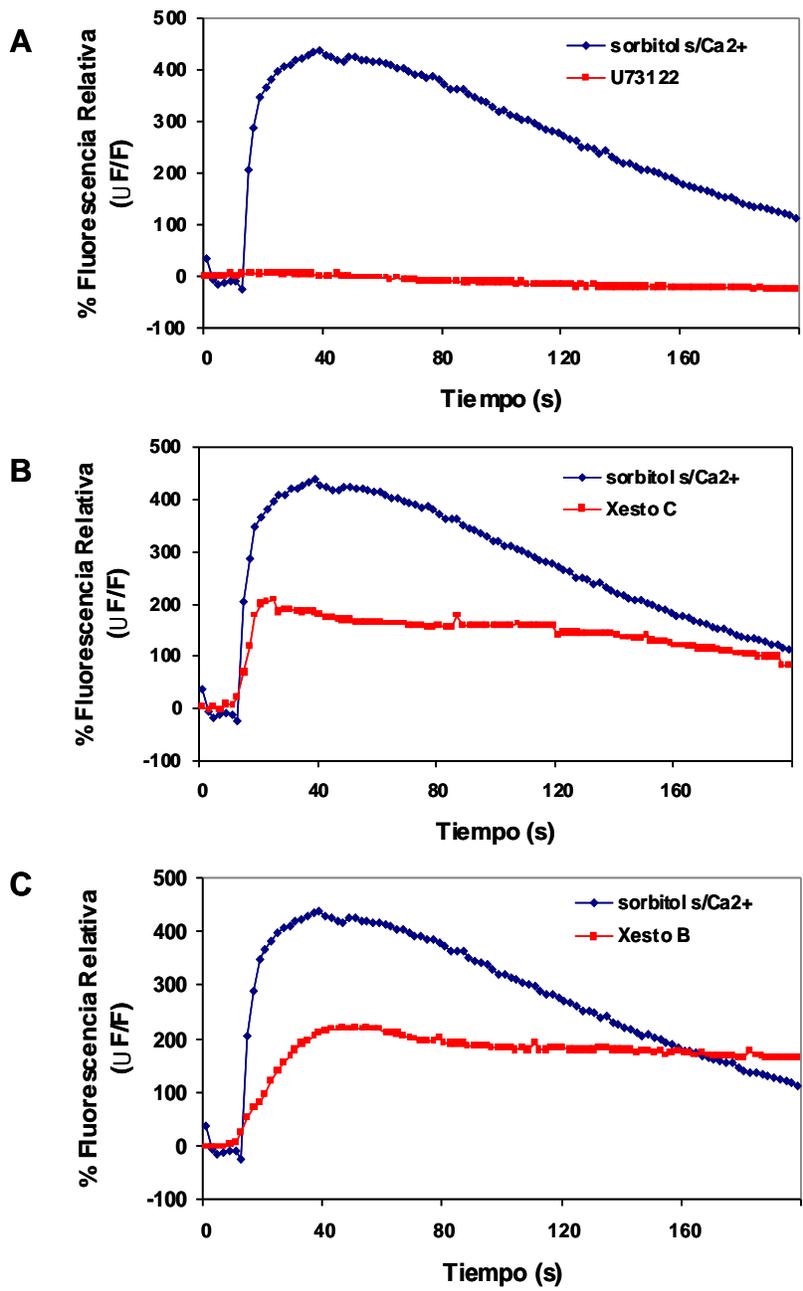


Figura 29. Efecto de inhibidores de la vía del IP₃ sobre la señal de Ca²⁺ inducida por estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos fueron preincubados con fluo-3AM y U73122 (10 μM) (A), Xestospongina C (100 μM) (B) o Xestospongina B (50 μM) (C) por 30 min y luego tratados con sorbitol (600 mOsm) en un medio libre de Ca²⁺.

6.7. Efecto del sorbitol sobre la actividad de CaMKII en cardiomiocitos en cultivo

En primer término se estandarizó un procedimiento para la determinación de la actividad de la CaMKII, utilizando un ensayo de fosforilación del péptido autocamtide-2 (H-Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Thr-Val-Asp-Ala-Leu-OH) por [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP. La actividad específica de CaMK se determinó a través de la diferencia de incorporación de ^{32}P al péptido, en presencia y en ausencia de Ca^{2+} y CaM.

Se determinó el efecto del estrés hiperosmótico por sorbitol sobre la actividad de CaMKII. En todos los tiempos ensayados se observó que el estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) no alteró significativamente la actividad de CaMKII. En la Figura 30A se muestra la actividad enzimática de CaMKII, cuyos valores expresados en pmoles P incorporado/min por mg proteína, oscilaron entre 173 ± 7 (control) y 194 ± 15 (15 min de estimulación), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. En la Figura 30B se muestra la actividad de CaMKII expresada en veces respecto al control. En este caso los valores expresados en veces el control, oscilaron entre $0,9 \pm 0,2$ (45 min de estímulo) y $1,1 \pm 0,1$ (15 min de estímulo). Al igual que en el caso anterior no se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

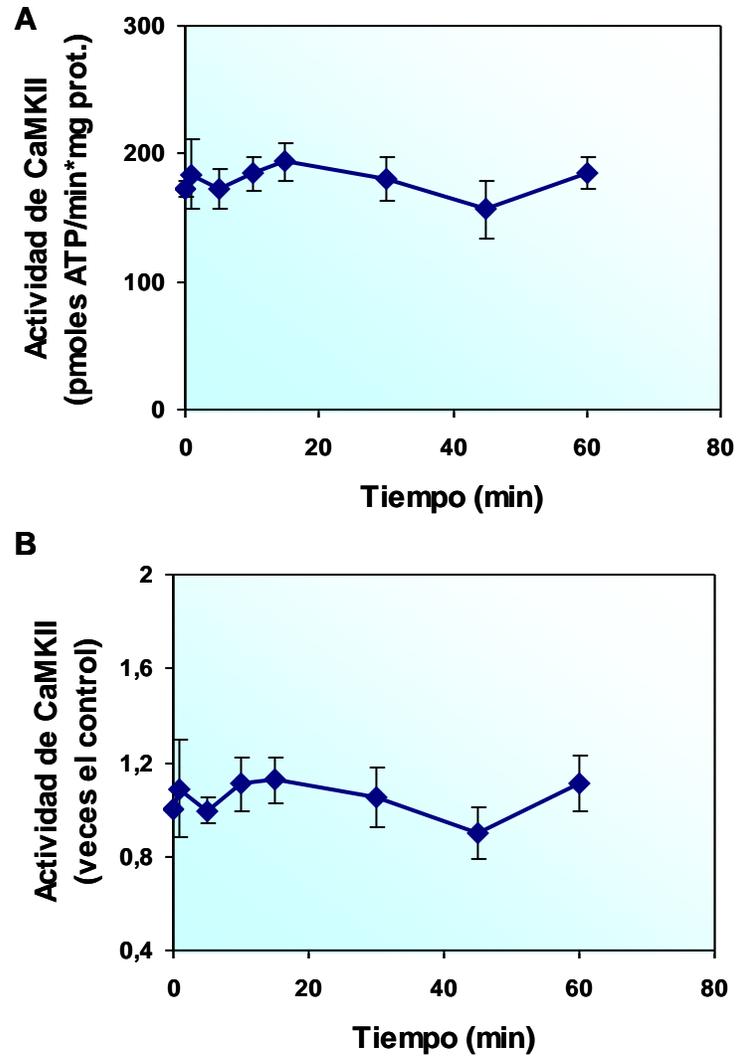


Figura 30. Actividad de la CaMKII en cardiomiocitos estimulados con estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos en cultivo se estimularon con sorbitol (600 mOsm) y a los tiempos indicados se prepararon extractos proteicos. La actividad de CaMKII se determinó como se indicó en Materiales y Métodos. A) Actividad de CaMKII expresado en pmoles P incorporado/min por mg proteína. B) Actividad relativa de CaMKII en veces respecto al control. Los resultados corresponden al promedio ($n = 4$) \pm SEM.

6.8. Efecto del sorbitol sobre la actividad de Cn en cardiomiocitos en cultivo

Como primera etapa, se estandarizó un procedimiento para la determinación de la actividad de la Cn. Para ello se utilizó un kit comercial basado en un ensayo de desfosforilación de un sustrato artificial RII (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu). La actividad específica de Cn se determinó a través de la diferencia de liberación de fosfato desde el sustrato, en presencia y en ausencia de Ca^{2+} .

El efecto del estrés hiperosmótico por sorbitol sobre la actividad de la Cn se realizó en cardiomiocitos estimulados con sorbitol (600 mOsm) por diferentes tiempos. En la Figura 31 se observa que, a todos los tiempos ensayados, el estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm) no alteró significativamente la actividad de Cn. En la Figura 31A se muestra la actividad enzimática de Cn, cuyos valores expresados en pmoles fosfato/min por mg proteína, oscilaron entre $0,10 \pm 0,07$ (5 min de estimulación) y $2,60 \pm 0,08$ (10 min de estimulación), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. En la actividad de CaMKII expresada en veces respecto al control (Figura 31B), al igual que en el caso anterior, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados muestran que el estímulo apoptótico no activó, al menos en los tiempos estudiados, a esta fosfatasa.

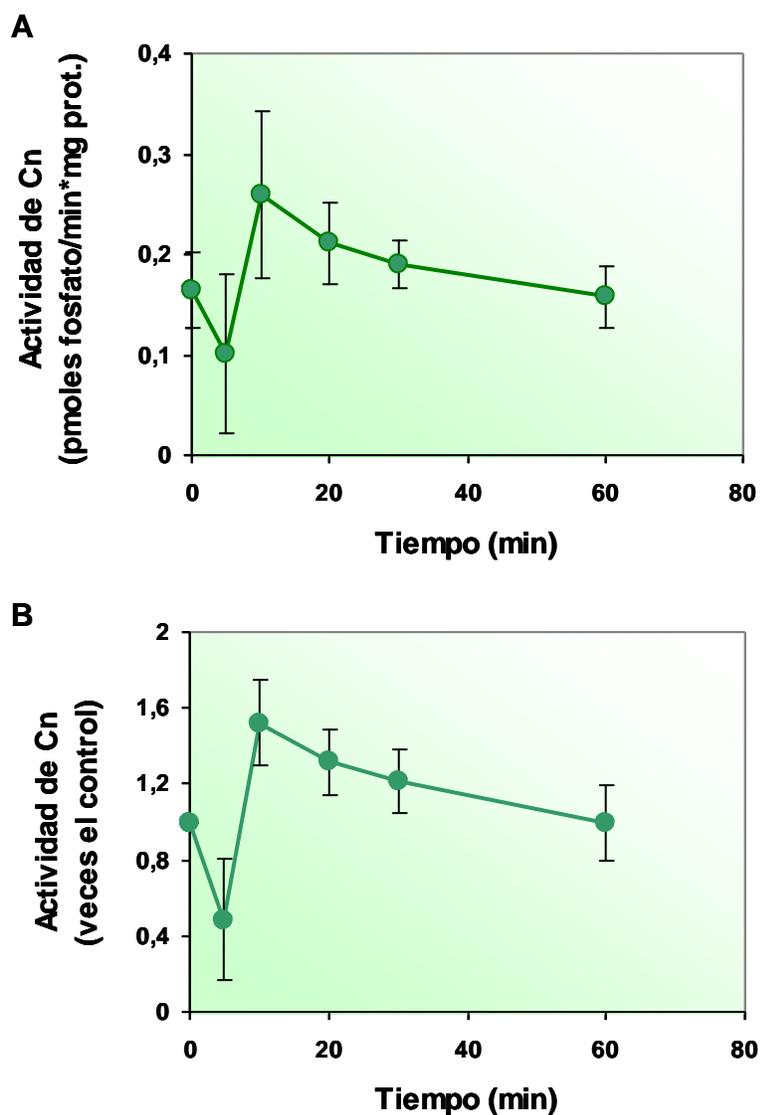


Figura 31. Actividad de calcineurina en cardiomiocitos estimulados con estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos en cultivo se estimularon con sorbitol (600 mOsm) y a los tiempos indicados se prepararon extractos proteicos. La actividad de Cn se determinó como se indicó en Materiales y Métodos. A) Actividad de Cn expresado en pmoles P liberado/min por mg proteína. B) Actividad relativa de Cn en veces respecto al control. Los resultados corresponden al promedio ($n = 3$) \pm SEM.

6.9. Regulación transduccional de la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico

La apoptosis es un evento altamente regulado, sus principales reguladores son efectores transduccionales, dentro de ellos encontramos proteínas pertenecientes a diversas rutas de señalización intracelular (kinasa y fosfatasa) como a segundos mensajeros como son el NO y el Ca^{2+} . Con el objetivo de determinar como se regula el proceso apoptótico inducido por el estrés hiperosmótico en nuestro modelo de estudio, se utilizaron inhibidores químicos de vías transduccionales y un quelante del Ca^{2+} intracelular para determinar la importancia de este ión en la apoptosis inducida por sorbitol. La apoptosis se evaluó a través de activación de caspasas 3 y 9, externalización de fosfatidil serina y fragmentación del DNA; además, se evaluó muerte celular por el método de exclusión de tripán.

6.9.1. Activación de caspasas 3 y 9

Para estudiar la señalización y regulación de proceso apoptótico en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, se evaluó el efecto de distintos inhibidores de vías transduccionales en la apoptosis inducida por sorbitol. Para ello se determinó la activación de dos caspasas, una iniciadora (caspasa-9) y una ejecutora (caspasa-3) del evento apoptótico.

La determinación de la activación de las caspasas 3 y 9 se realizó mediante Western blot de extractos proteicos obtenidos de cardiomiocitos expuestos a distintos tratamientos; para ello se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen tanto a las pro-caspasas como a las caspasas activas. La activación de cada caspasa se expresa como la razón entre la caspasa activa y la caspasa total (caspasa activa y pro-caspasa) veces el control. El control correspondió a cardiomiocitos no estimulados. El quelante de Ca^{2+} y los inhibidores utilizados no modificaron la activación de la caspasa-3 y caspasa-9 con respecto al control (datos no mostrados). El pretratamiento de los cardiomiocitos con los inhibidores de las vías Cn y CaMKII no alteró significativamente la activación de la caspasa-3 inducida por el estrés hiperosmótico. Si bien, con el quelante de Ca^{2+} se observó una disminución de la activación de la caspasa-3, este no fue estadísticamente diferente al observado con sorbitol (Figura 32). Los inhibidores no modificaron la activación de la caspasa-9; el pretratamiento de los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmóticos con el quelante de Ca^{2+} induce un

aumento en la activación de la caspasa-9 respecto a la condición con sorbitol, pero dicho aumento no fue significativo (Figura 33A).

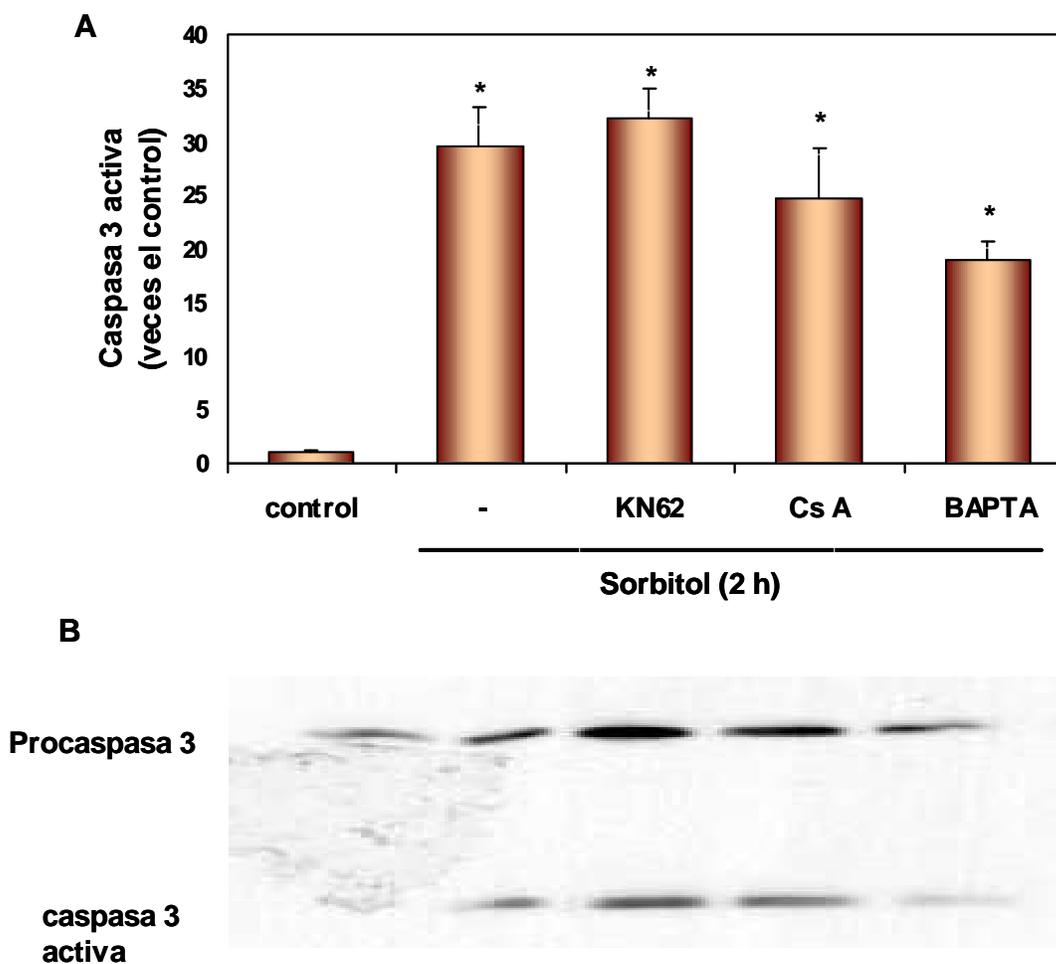


Figura 32. Efecto de CsA, KN62 y BAPTA-AM en la activación de caspasa-3 inducida por estrés hiperosmótico

Los cardiomiocitos fueron estimulados con sorbitol (600 mOsm) por 2 hrs, previa incubación con: CsA (0,5 μ M) y KN62 (1 μ M); o con un quelante de Ca^{2+} , BAPTA-AM (100 μ M). La caspasa 3 se determinó por IWB. A) Cuantificación de los IWBs por densitometría. B) IWB representativo. Los resultados son el promedio \pm SEM (n=4). * $p < 0,05$ vs control.

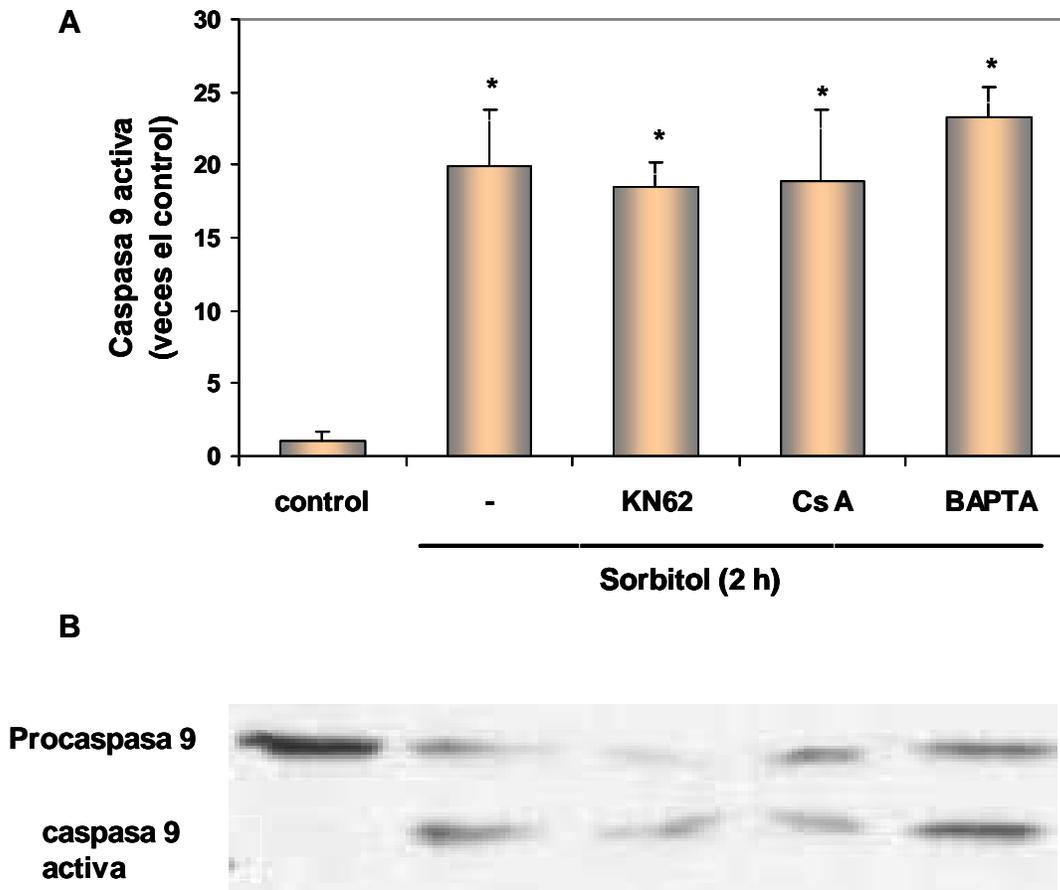


Figura 33. Efecto de CsA, KN62 y BAPTA-AM en la activación de caspasa-9 inducida por estrés hiperosmótico

Los cardiomiocitos fueron estimulados con sorbitol (600 mOsm) por 2 hrs, previa incubación con: CsA (0,5 μ M) y KN62 (1 μ M); o con un quelante de Ca^{2+} , BAPTA-AM (100 μ M). La caspasa 9 se determinó por IWB. A) Cuantificación de los IWBs por densitometría. B) IWB representativo. Los resultados son el promedio \pm SEM (n=4). * $p < 0,05$ vs control.

6.9.2. Determinación de Anexina V

Una de las características y, por lo tanto, un buen índice de muerte celular por apoptosis es la externalización de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática. El estrés hiperosmótico por sorbitol estimula la aparición de PS, alcanzando un máximo a las 6 h de estímulo, a este tiempo se evaluó el efecto de los inhibidores antes mencionados en este parámetro apoptótico. Los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico por sorbitol (600 mOsm), previamente incubados con inhibidores de vías transduccionales o un quelante del Ca^{2+}_i , fueron marcados con Anexina V-FITC (AV) y con ioduro de propidio (PI), éste último discrimina entre las células apoptóticas y necróticas. Las distintas subpoblaciones celulares se analizaron en un citómetro de flujo.

Los resultados expresados como el % de células marcadas con AV o PI, correspondieron a células apoptóticas o necróticas, respectivamente. El control utilizado fue cardiomiocitos no estimulados. En la Figura 34 se observa que el pretratamiento con los inhibidores aumentó la aparición de PS respecto al estímulo apoptótico. Además, el pretratamiento con el quelante de Ca^{2+}_i también aumentó el porcentaje de células apoptóticas, Anexina V positivas, pero no se observaron cambios importantes en las poblaciones de células necróticas.

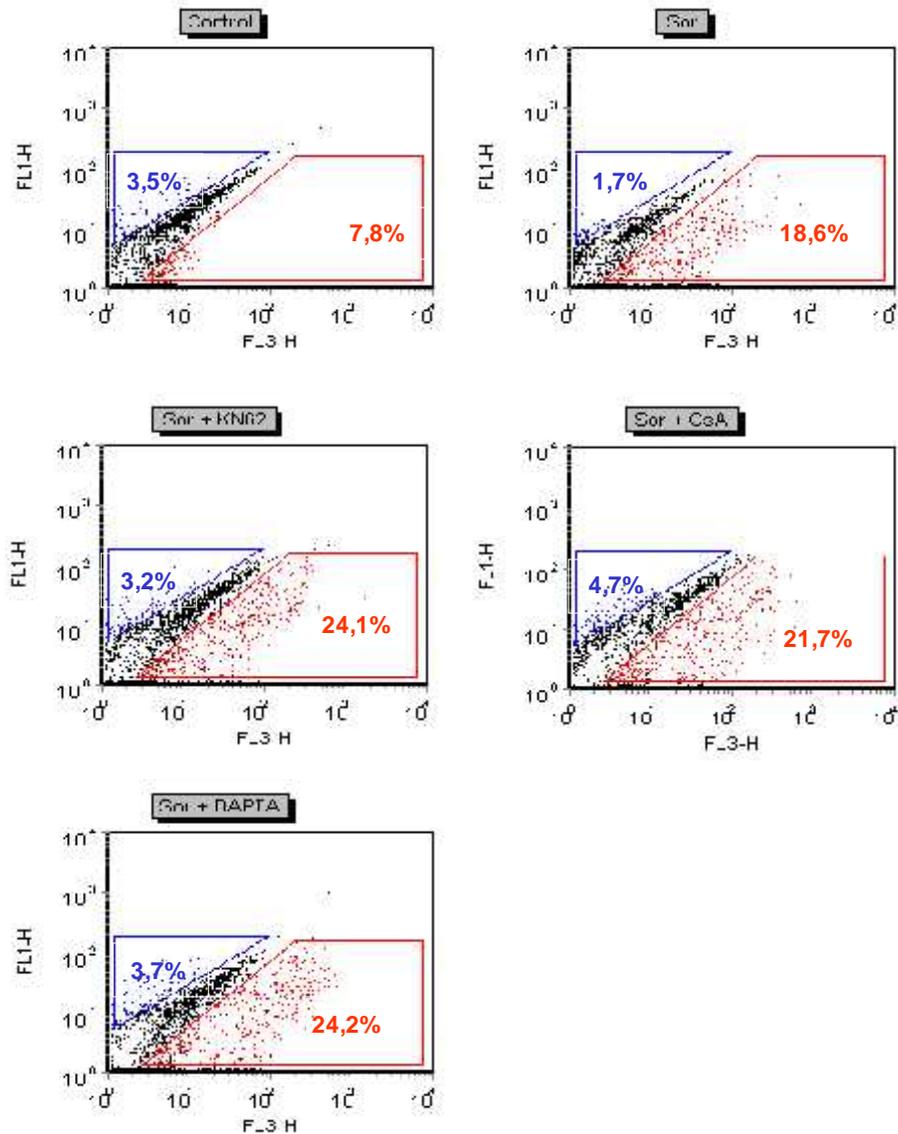


Figura 34. Efecto de CsA, KN62 y BAPTA-AM en la externalización de fosfatidilserina inducida por estrés hiperosmótico

Los cardiomiocitos fueron estimulados con sorbitol (600 mOsm) por 6 h, previa incubación con: CsA (0,5 μ M) y KN62 (1 μ M) o con un quelante de Ca^{2+} , BAPTA-AM (100 μ M). Los cardiomiocitos se marcaron con AnexinaV-FITC y con yoduro de propidio y la externalización de PS se determinó por citometría de flujo. Las poblaciones celulares en rojo corresponden a células Anexina V positivas y las azules a células yoduro de propidio positivas.

6.9.3. Fragmentación del DNA

La fragmentación del DNA se determinó por extracción del DNA con fenol– cloroformo, tratamiento por RNAsa y posterior electroforesis en gel de agarosa 2% y tinción con bromuro de etidio. En la Figura 35A se muestra una fotografía representativa de un gel de agarosa de DNA laddering. La fragmentación o laddering de DNA aumentó por el estrés hiperosmótico dependiente de sorbitol (600 mOsm) $2,0 \pm 0,01$ veces respecto al control (Figura 35B). El pretratamiento de los cardiomiocitos por 30 min con los inhibidores KN62, CsA y la mezcla de ambos inhibidores aumentaron la fragmentación del DNA inducida por sorbitol a $2,6 \pm 0,3$, $2,4 \pm 0,4$ y $2,4 \pm 0,6$ veces respecto al control, respectivamente. Sin embargo, dichos aumentos no fueron estadísticamente diferentes al tratamiento sólo con sorbitol (Figura 35B).

El efecto del quelante de Ca^{2+} , BAPTA-AM (100 μM), en la fragmentación del DNA inducido por estrés hiperosmótico no pudo ser evaluado debido a la alta mortalidad de las células observadas a las 24 h (datos no mostrados).

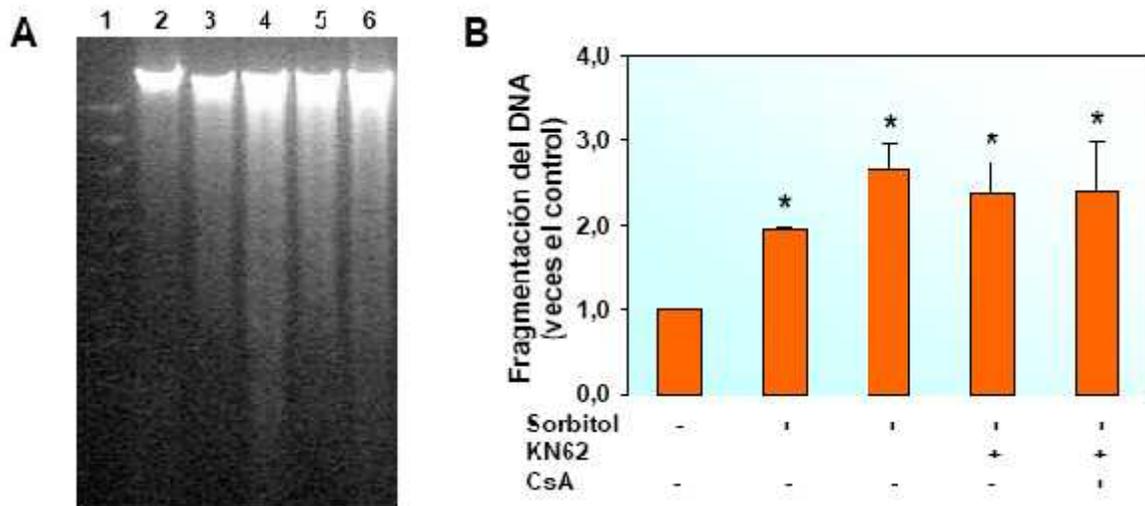


Figura 35. Efecto de KN62 y CsA en la fragmentación del DNA inducida por estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos en cultivo se pretrataron con KN62 (1 μ M), CsA (0,5 μ M), y una mezcla de KN62 (1 μ M) y CsA (0,5 μ M) por 30 min y luego se estimularon por 24 h con sorbitol (600 mOsm). El DNA se extrajo con un tratamiento con fenol – cloroformo y RNAsa. A) Gel de agarosa al 2% en TBE 0,5x teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. 1) Estándar de peso molecular; 2) control; 3) sorbitol; 4) sorbitol+KN62; 5) sorbitol+CsA; 6) sorbitol+KN62+CsA. B) Cuantificación de la fragmentación del DNA. Los resultados representan el promedio (n=3) \pm SEM. *p<0,05 vs control.

6.9.4. Viabilidad celular

En la Figura 36 (superior) se muestran fotografías representativas de los cultivos de cardiomiocitos sometidos a los distintos tratamientos. El pretratamiento de los cardiomiocitos por 30 min con los inhibidores KN62, CsA y la mezcla de ambos inhibidores no previnieron la muerte de las células inducida por estrés hiperosmótico. BAPTA-AM (100 μ M), un quelante del Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i), indujo muerte a la mayoría de las células tratadas a las 24 h de incubación (datos no mostrado). La viabilidad de los cardiomiocitos se cuantificó usando la tinción diferencial de las células vivas y muertas con azul de tripán y posterior conteo en una cámara de Neubauer. El estrés hiperosmótico por sorbitol redujo los cardiomiocitos viables a un $53 \pm 8\%$. El pretratamiento con KN62, CsA y la mezcla de los dos inhibidores mantuvo la viabilidad celular en un $55 \pm 10\%$, $54 \pm 9\%$ y $53 \pm 5\%$, respectivamente (Figura 36, inferior).

Estos resultados indican que KN62 y CsA no inhibieron la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico. La preincubación con BAPTA-AM redujo la viabilidad celular a $30 \pm 11\%$, indicando que este quelante de Ca^{2+} tiene, además, un efecto tóxico sobre las células.

Estos resultados, al igual que los resultados de fragmentación, indican que KN62 y CsA, no bloquearon la apoptosis gatillada por estrés hiperosmótico. Estos resultados en su conjunto, sugieren que las vías dependientes de Ca^{2+} y CaM, CaMK y Cn, no participan en el mecanismo de inducción de la apoptosis por estrés hiperosmótico.

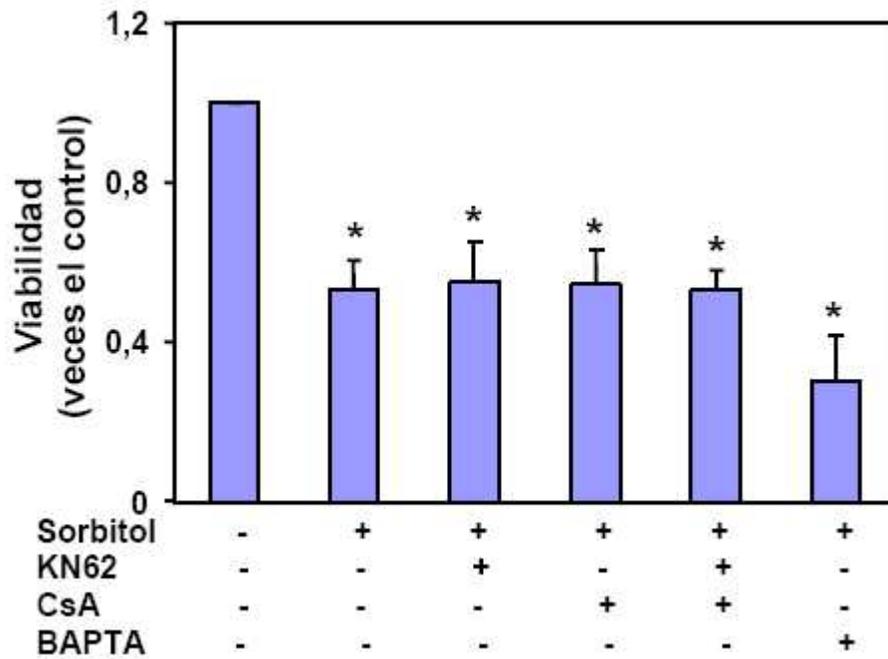
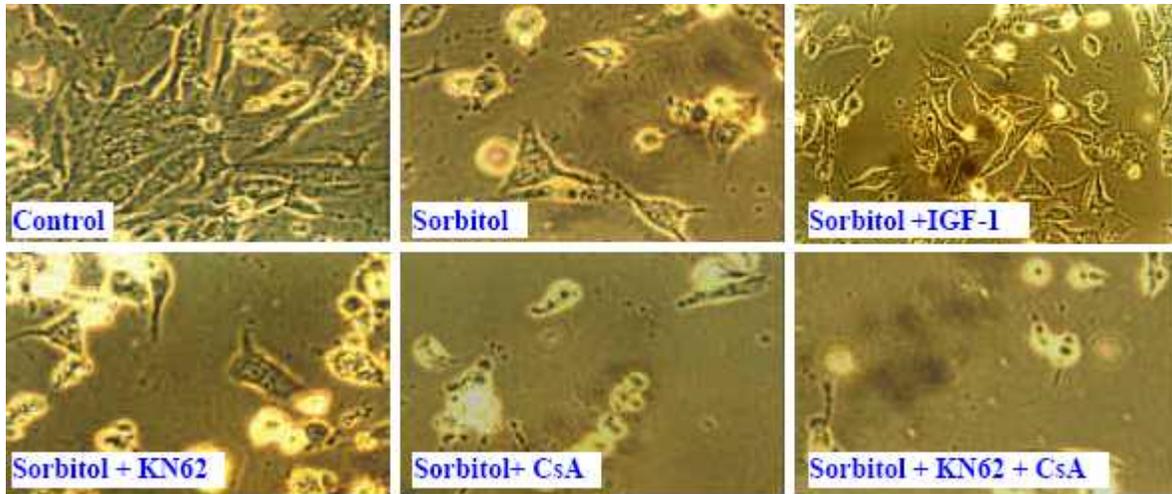


Figura 36. Efecto de KN62, CsA y BAPTA-AM en la viabilidad de cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico

Cardiomiocitos se pretrataron con KN62 (1 μ M), CsA (0,5 μ M), una mezcla de KN62 (1 μ M) y CsA (0,5 μ M), y con BAPTA-AM (10 μ M) por 30 min y luego se estimularon por 24 h con sorbitol (600 mOsm). Fotografías de cardiomiocitos con diferentes tratamientos. Las células se despegaron de la placa por tripsinización y posterior tratamiento con suero fetal bovino. Las células se incubaron con azul de tripán, y las células viables y no viables se contaron en una cámara de Neubauer. Los resultados corresponden al promedio ($n=6$) \pm SEM. * $p<0,05$ versus control.

7. DISCUSION

Esta tesis tuvo por objetivo profundizar el conocimiento de los mecanismos de muerte por apoptosis del cardiomiocito, la cual se activa y ejecuta por diversas condiciones de estrés. En particular nuestro modelo de muerte por estrés hiperosmótico surgió de un estudio realizado hace 7 años atrás cuando se compararon simultáneamente varios estímulos: privación de suero (es decir ausencia de factores protectores), doxorubicina (un antineoplásico con acciones cardiotóxicas), angiotensina II (péptido que en concentraciones elevadas produce muerte celular) y estrés hiperosmótico (109). La comparación simultánea de estos estímulos permitió reconocer a este último estímulo como el más rápido, potente y reproducible (34). Así nuestro Laboratorio comenzó a profundizar el conocimiento de este modelo, caracterizando que este tipo de estrés físico produce cronológicamente los siguientes eventos celulares:

- Rápida disminución del volumen del cardiomiocito y ausencia de mecanismo de recuperación de volumen (RVI) (110)
- Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), principalmente anión superóxido e hidroxilo, concomitante con una caída de los niveles intracelulares de glutatión (111)
- Rápida disminución del potencial de membrana mitocondrial (Valentina Parra, comunicación personal)
- Activación de las vías transduccionales ERK, JNK, p38-MAPK y PKB con distintas cinéticas y magnitudes (110)
- Aumento y disminución de los niveles intracelulares de las proteínas de la familia bcl-2 con propiedades pro- y anti-apoptóticas: bcl-x_S y de bcl-x_L, respectivamente. Ambas proteínas junto a otras controlan la permeabilidad mitocondrial (34,42,110)
- Procesamiento de procaspasa-9 a caspasa-9 entre las 2 y 4 h. Esta proteasa intracelular se activada por señales originadas en la mitocondria, principalmente citocromo c (111)
- Aumento entre las 4-6 h del contenido de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática de los cardiomiocitos apoptóticos, evento clave para el posterior reconocimiento de esta señal por receptores específicos ubicados en la superficie de los macrófagos y que permite la posterior eliminación de estas células por fagocitosis (111)
- Procesamiento de procaspasa-3 a caspasa-3 entre las 4 y 6 h. Esta proteasa intracelular se activada por la acción de diversas caspasas, entre las que se cuenta a caspasa-9 (111).

- Aumento de los niveles de XIAP a partir de las 6 h. Esta proteína es un inhibidor endógeno de las caspasas y por lo tanto constituye un elemento clave de regulación. (111)
- Activación de la vía de los polioles (110,112)
- Aumento de la fragmentación del DNA (34,109,110)
- Disminución significativa del número de cardiomiocitos viables (34,109,110)

Por otro lado, hemos establecido que IGF-1 protege al cardiomiocito de la apoptosis inducida por varios estímulos, entre los que se cuenta el estrés hiperosmótico. Además hemos descrito la participación de vías transduccionales en la señalización antiapoptótica de este factor en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico, pero se desconoce la participación de otros efectores moleculares que se encuentren río abajo de estas rutas de señalización.

Antes de iniciar esta tesis, por lo tanto, se requería aclarar los siguientes puntos:

- Cuáles son los factores de transcripción que son activados por el estrés hiperosmótico y/o IGF-1 y como ellos regulan el balance entre la supervivencia y muerte celular. Al respecto, nuestro Laboratorio se ha focalizado a investigar los factores transcripcionales: a) MEF2, NFAT y CREB (abordado en esta tesis) relacionados directa o indirectamente con Ca^{2+} ; b) $NF\kappa B$, un factor transcripcional que sensa el estado redox intracelular y que se estudió en una tesis de doctorado reciente (111) y c) TonEBP/NFAT5, el único factor transcripcional conocido que sensa los cambios osmóticos en células eucariontes y que está siendo actualmente investigado en otra tesis de doctorado en curso (113)
- Si además de la generación de ROS y un aumento del estrés oxidativo, el estrés hiperosmótico genera cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , ya que en varios tipos celulares se ha observado que el aumento de los niveles de este segundo mensajero para la ejecución de programas de muerte celular (114)

La osmolaridad, a similitud de otros parámetros homeostáticos como son los niveles hormonales, tienen valores fisiológicos sistémicos que no necesariamente reflejan lo que puede ocurrir a una escala local (tisular o celular). De hecho se ha especulado que hay

cambios osmóticos locales en eventos de isquemia-reperfusión como los que tienen lugar en órganos como cerebro y corazón. En diversos tipos celulares como neuronas, fibroblastos timocitos, células endoteliales, células de la musculatura lisa y células renales se han estado estudiando los efectos del estrés osmótico en procesos biológicos tales como: hiperatremia, depleción de amino ácidos, lactancia, etc (113,115,116). Los cardiomiocitos carecen de un mecanismo regulatorio del volumen celular, lo que hace que sean particularmente vulnerables a los cambios osmolares del medio circundante (32,33), por lo que el estudio de mecanismos moleculares implicados podría contribuir aspectos fisiopatológicos cardiacos.

En varios tipos celulares, los factores de crecimiento median tanto las respuestas de proliferación como las de supervivencia celular. En los cardiomiocitos, existe ambigüedad en los factores de crecimiento que promueven su supervivencia o muerte (24,25). La capacidad del factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1), un agente hipertrofico, para promover la supervivencia celular lo ha posicionado como un buen candidato como agente terapéutico en el tratamiento o prevención de la inminente muerte celular que se genera durante el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. En estos antecedentes yace la importancia de estudiar y entender los mecanismos y efectores moleculares que regulan o median los efectos antiapoptóticos de IGF-1 en los cardiomiocitos expuestos a diversos tipos de estrés.

7.1. IGF-1 inhibe la apoptosis del cardiomiocito por estrés hiperosmótico a través de un mecanismo dependiente de CREB

En el corazón, el IGF-1 contrarresta la apoptosis del cardiomiocito activada por varios estímulos (42,44,117). Aunque se ha propuesto a este factor como un posible agente terapéutico para enfermedades cardiovasculares, su aplicación clínica aún no está clara. El conocimiento de las rutas de señalización y efectores moleculares que median la respuesta cardioprotectora de IGF-1 permitirá encontrar blancos farmacológicos que ayuden a contrarrestar la muerte celular durante el desarrollo de cardiomiopatías. CREB es un importante efector durante la señalización antiapoptótica del IGF-1 (60). En nuestro modelo, CREB media la respuesta antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico (Figura 37). La presencia de una forma dominante negativa de CREB bloqueó el efecto protector del IGF-1 en la apoptosis inducida por sorbitol; evaluada a través de ensayos de activación de caspasa-9, fragmentación del DNA y viabilidad celular. La

disminución de la activación de caspasa-9 frente a estímulos apoptóticos, en algunos tipos celulares, se debe a la regulación de la expresión de CREB por PKB (118). Esta proteína kinasa es un importante mediador de supervivencia celular en respuesta a factores de crecimiento e influjo de Ca^{2+} . La fosforilación por PKB reprime la actividad de varias moléculas proapoptóticas como son caspasa-9 y BAD (118). CREB además de regular la expresión de proteínas de rutas transduccionales que gobiernan las respuestas de supervivencia, regula la expresión de Bcl-2, un importante efector antiapoptótico. En neuronas, algunos factores de crecimiento inhiben la apoptosis por activación de CREB, la cual a su vez aumenta la expresión de Bcl2 (60). Futuras investigaciones deberán abordar los mecanismos a nivel de expresión de genes pro y anti-apoptóticos por los cuales CREB media la respuesta antiapoptótica de IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico,.

La apoptosis inducida por el estrés hiperosmótico por sorbitol no se modificó por un dominante negativo de CREB. Los cardiomiocitos que expresaron la forma inactiva de este factor, no modificaron su respuesta apoptótica frente al estrés hiperosmótico dado que no aumentó la activación de caspasa-9, la fragmentación del DNA ni disminuyó la viabilidad celular. En otros tipos celulares, la sobreexpresión de una forma inactiva de CREB induce apoptosis, eliminando las respuestas de supervivencia celular; además se ha demostrado que la apoptosis aumenta frente a estímulos citotóxicos cuando se está en presencia de una forma inactiva de CREB (119). Aunque se observó que CREB se activa frente al estrés hiperosmótico por sorbitol, nuestros resultados indican que CREB no mediaría las respuestas de supervivencia frente al estrés hiperosmótico. Además, el tratamiento de los cardiomiocitos con sorbitol disminuyó los niveles de CREB a nivel citoplasmático, hecho que daría cuenta que a pesar que CREB se activa por este estímulo apoptótico, no media las señales de supervivencia. Interesantemente, estaurosporina induce apoptosis en neuronas, degradando CREB a través de las caspasas (120). Estos antecedentes sugieren que la apoptosis está asociada a una disminución de los niveles de CREB, el cual normalmente protege a las células de este tipo de muerte programada. Durante el proceso apoptótico no solo se activan señales de muerte en respuesta a estímulos citotóxicos, sino que también se activan señales de supervivencia al estrés, el balance entre estas distintas rutas transduccionales dependerá el destino de la célula: supervivencia o muerte. Nuestros resultados indican que CREB no participaría en la señalización de supervivencia en los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.

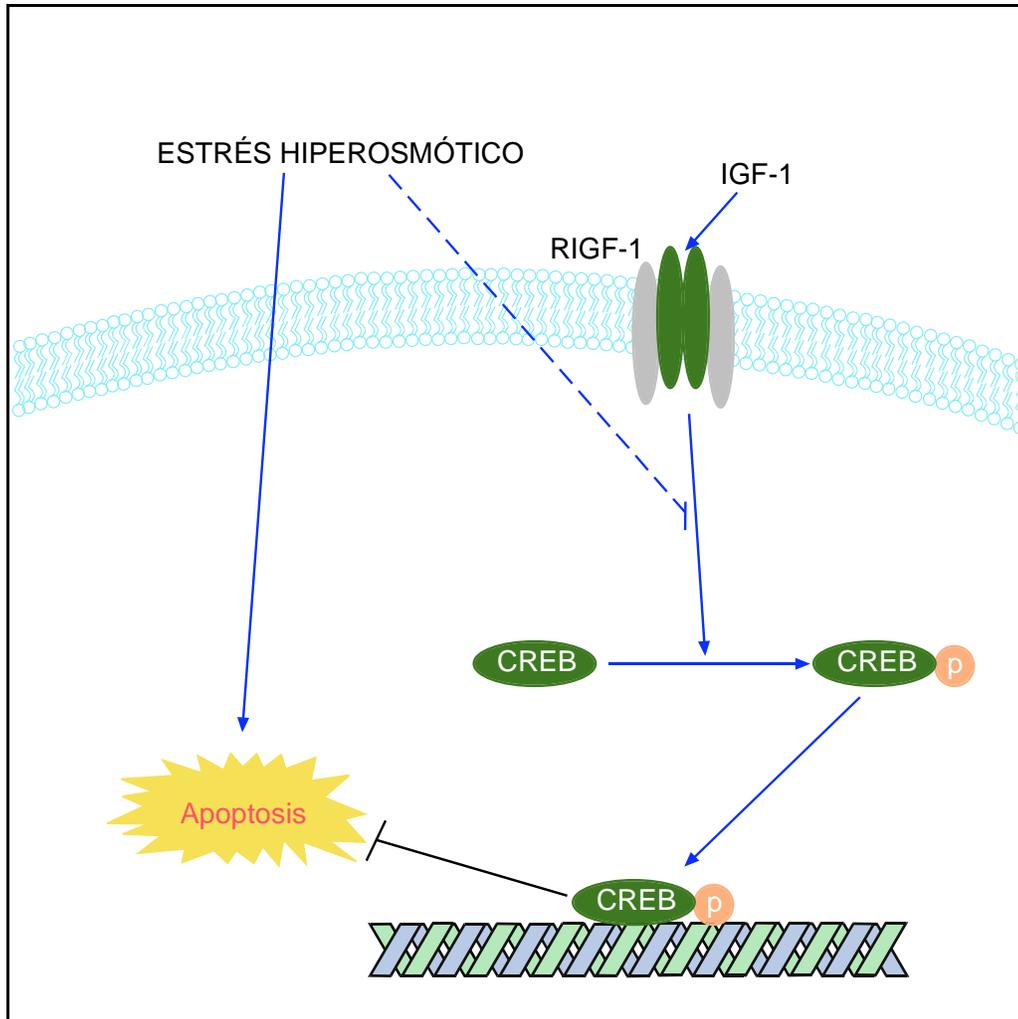


Figura 37. Esquema hipotético de la señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico dependiente de sorbitol

Sorbitol regula la activación del factor transcripcional CREB en respuesta a IGF-1. CREB es activado por IGF-1 y media sus efectos antiapoptóticos en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.

7.2. CREB es activado tanto por estímulos pro como antiapoptóticos

CREB es un conocido modulador de la apoptosis y particularmente se ha posicionado como un efector antiapoptótico que se activa en respuesta a estímulos pro y antiapoptóticos. Por ejemplo en neuronas, CREB media la respuesta antiapoptótica de IGF-1 (60). En resumen habían algunos antecedentes en la literatura que ameritaron su estudio en esta tesis.

Los resultados de esta tesis indican que CREB se activa tanto en respuesta al estrés hiperosmótico por sorbitol como al IGF-1, pero que esta activación es diferencialmente regulada según el estímulo. El estrés hiperosmótico por sorbitol aumentó significativamente la fosforilación de CREB en el cardiomiocito, sin cambios en su distribución subcelular pero con un aumento de la afinidad a su secuencia de consenso en el DNA. CREB es un factor principalmente nuclear y se ha mostrado que algunos estímulos aumentan sus niveles nucleares. En nuestro caso en particular, la distribución subcelular de CREB no se modificó por el estrés hiperosmótico, pero se observó una disminución significativa de sus niveles en el citoplasma. Interesantemente en neuronas, CREB se degrada en respuesta a estímulos apoptóticos por acción de las caspasas (120).

IGF-1 también activó a CREB como se señaló anteriormente. Hubo un aumento significativo en la fosforilación de CREB, la cual se acompañó de una redistribución subcelular y un aumento de su afinidad por el DNA. Aunque se sabe que CREB es casi exclusivamente nuclear, en apoyo a nuestros resultados se ha descrito que existe una variante de este factor que presenta localización citoplasmática que después de ser activada se trasloca al núcleo (91). En neuronas, se ha demostrado que este factor transcripcional es activado y participa en la señalización de supervivencia de IGF-1 (60). Además, recientemente se ha demostrado que CREB participa en la regulación de la hipertrofia (102,103), hecho que apoya nuestros resultados puesto que IGF-1 además de ser un agente antiapoptótico, es un factor hipertrófico.

En los cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico previo tratamiento con IGF-1, la activación de CREB disminuyó y en algunos casos se observó un comportamiento similar al detectado con estrés hiperosmótico. Los resultados indicaron que la activación de CREB por IGF-1 más sorbitol cambió respecto a los resultados obtenidos con los estímulos por

separado. IGF-1 estimula la proliferación celular y también tiene efectos citoprotectores, las vías responsables de cada evento dependen del tipo y condición celular (60,91). En la primera situación, IGF-1 activa vías de señalización que tienen como objetivo activar genes de crecimiento. En cambio, la respuesta citoprotectora cursa a través de vías transduccionales que activan la expresión de proteínas que permiten mantener la integridad celular. El predominio de la señal apoptótica en nuestros resultados se puede sustentar en que la señalización de factores antiapoptóticos es controlada por la señalización de muerte. En general, durante el proceso apoptótico se activan cascadas transduccionales que desequilibran el balance hacia el suicidio celular, eliminando a su paso a los efectores que contrarresten tal proceso.

7.3. La regulación transduccional de CREB es dependiente de la naturaleza del estímulo

En la literatura existen evidencias que la regulación de la activación de CREB por estímulos pro o antiapoptóticos es diferente. Los resultados de esta tesis muestran que la activación de CREB por un estímulo apoptótico es transduccionalmente distinta a la observada frente al IGF-1, un estímulo hipertrófico y antiapoptótico.

Se determinó que las vías transduccionales ERK y p38-MAPK regulan la activación de CREB por estrés hiperosmótico por sorbitol. En otros tipos celulares, ambas vías se activan frente a estímulos apoptóticos (48,50). En neuronas, ellas median la activación de CREB frente a estímulos citotóxicos. La vía PI3K/PKB reconocida ruta efectora de supervivencia celular también se ha vinculado a CREB en neuronas (59). Sin embargo en el cardiomiocito, ella no participa en la activación de CREB en respuesta al estrés hiperosmótico por sorbitol. Al evaluar el efecto de un quelante en la activación de CREB, se observó que el Ca^{2+} es un importante regulador de la activación de CREB en respuesta a estrés hiperosmótico; se ha demostrado que CREB se activa frente a estímulos que aumentan el Ca^{2+}_i (91,92,95). Los resultados obtenidos con los inhibidores de las vías dependientes de Ca^{2+}/CaM , CaMKII y Cn, indican que CREB no es blanco de estas vías de transducción (Figura 38).

Por otro lado se demostró que la activación de CREB por IGF-1 estaría siendo regulada por distintas vías transduccionales basados en nuestros hallazgos con diversos inhibidores

químicos. Previamente hemos encontrado que las vías ERK, p38-MAPK y PKB son activadas por IGF-1 y últimamente, que también hay activación de vías dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. IGF-1 genera transientes de Ca^{2+} por movilización desde los depósitos intracelulares (46). En acuerdo a ello observamos que la activación de CREB por IGF-1 fue bloqueada por el tratamiento de los cardiomiocitos con un quelante del Ca^{2+}_i (Figura 39).

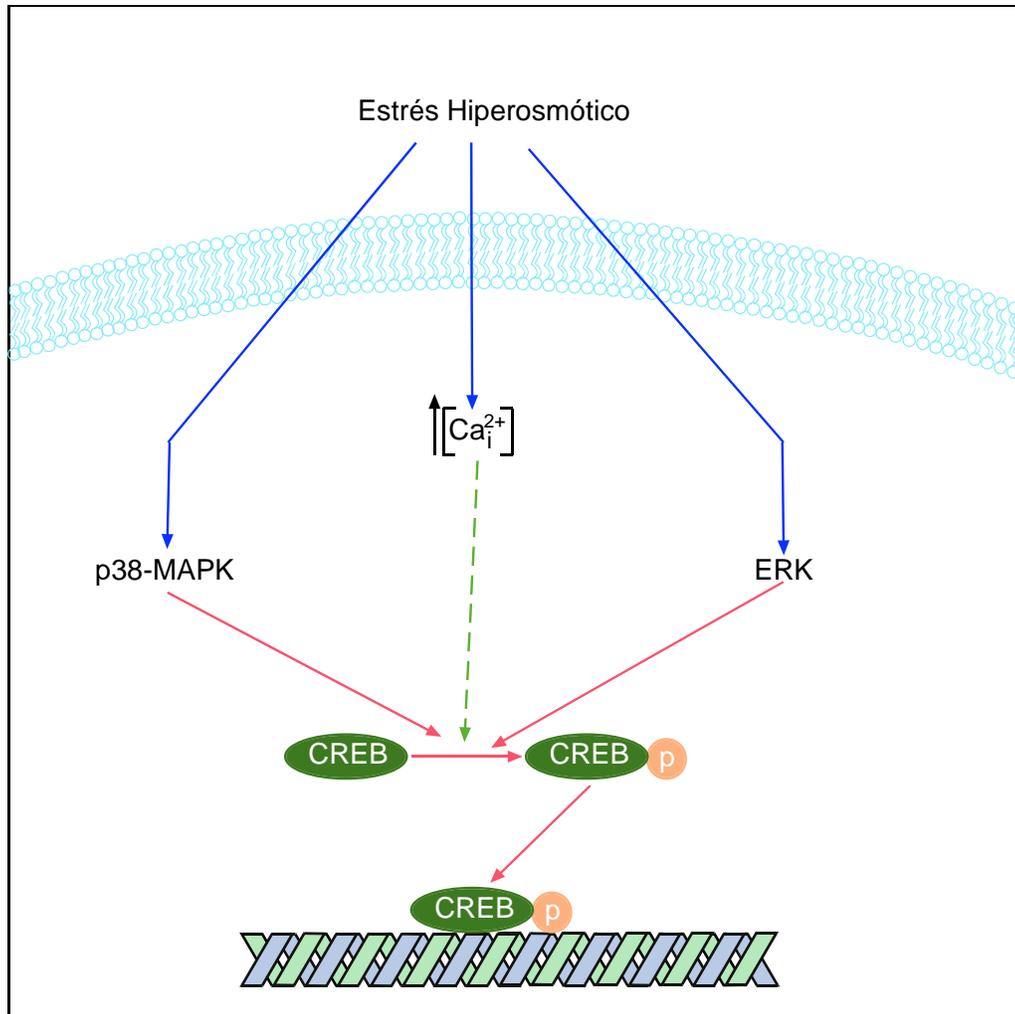


Figura 38. Esquema hipotético de la activación de CREB por estrés hiperosmótico

El estrés hiperosmótico por sorbitol activa al factor transcripcional CREB. Este estímulo activa diferentes vías transduccionales (azul, antecedentes anteriores), las cuales regulan la actividad de CREB (rojo, resultados de esta tesis). Además, este tipo de estrés regula la actividad de CREB a través de un importante segundo mensajero, Ca^{2+} .

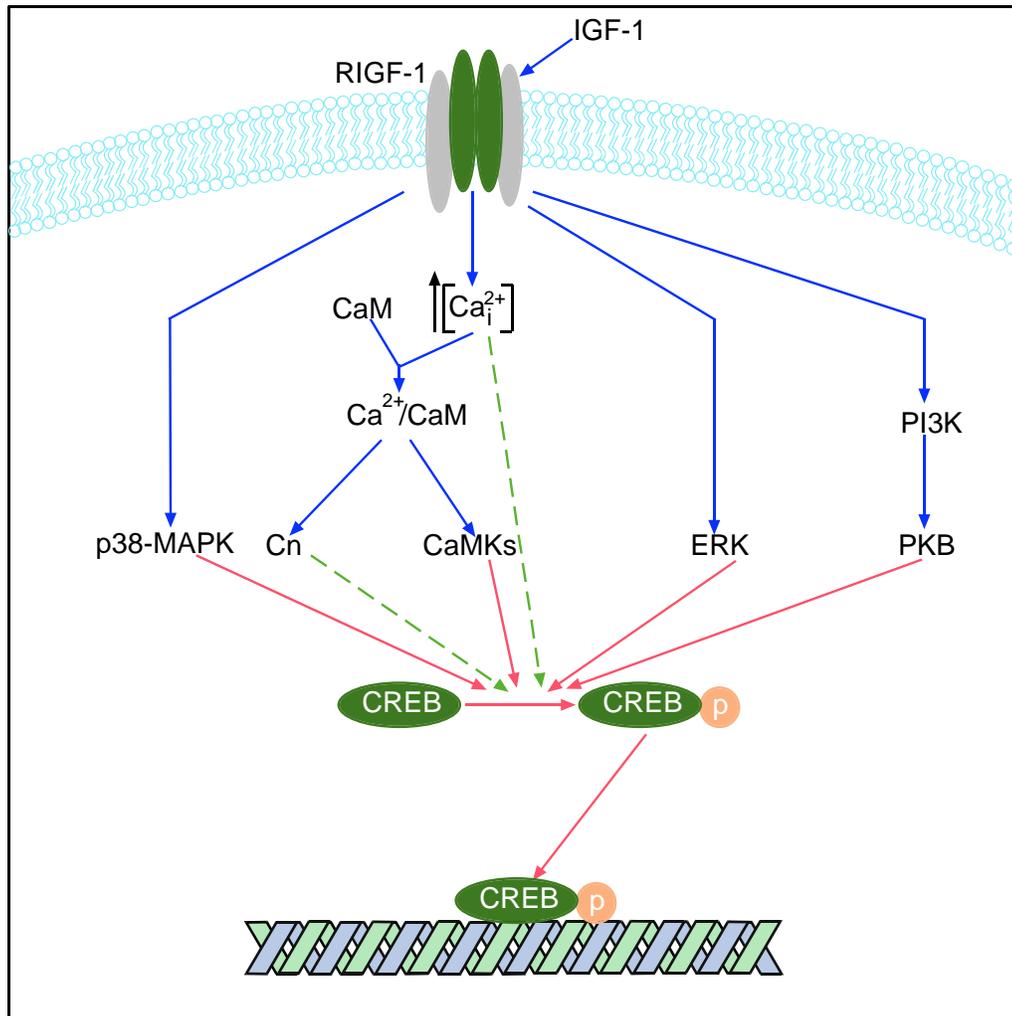


Figura 39. Esquema hipotético de la activación de CREB por IGF-1

IGF-1 activa al factor transcripcional CREB. Este factor de crecimiento, a través de su receptor (RIGF-1), activa diferentes vías transduccionales e induce aumentos del Ca^{2+}_i (azul, antecedentes anteriores), estas vías y Ca^{2+} regulan la actividad de CREB (rojo, resultados de esta tesis).

7.4. El estrés hiperosmótico aumenta los niveles intracelulares del Ca^{2+}

Como los cardiomiocitos son células excitables, la señalización por Ca^{2+} es más compleja que en otros tipos celulares; en estas células las oscilaciones del Ca^{2+}_i son reguladas por la frecuencia de los potenciales de acción que se disparan en la membrana plasmática (121). El estudio de la señalización del Ca^{2+} en este tipo celular, diferente a la que ocurre en el proceso de excitación-contracción, no es trivial. Aunque se sabe que aumentos del Ca^{2+}_i son característicos en la apoptosis (67,114,122), se desconocen los mecanismos involucrados en su regulación.

En nuestro modelo de estudio, los cambios en los niveles del Ca^{2+}_i inducidos por estrés hiperosmótico por sorbitol se investigaron con Fluo-3AM, una sonda sensible a Ca^{2+} que sólo permite obtener datos cualitativos en los niveles de Ca^{2+}_i . En cardiomiocitos incubados en una solución que contenía Ca^{2+} , el estrés hiperosmótico por sorbitol indujo aumentos rápidos y significativos de los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Además, se observó que una segunda estimulación, 10 min después de la primera, no modificaron los niveles de este ión, indicando que el estrés hiperosmótico por sorbitol estimularía un estado refractario en los cardiomiocitos (datos no mostrados). La señal de Ca^{2+} generada por este tipo de estrés posee, al menos, dos componentes claramente identificables, uno de gran intensidad que tiene su origen en el citoplasma, y otro que se presenta a nivel nuclear. Al final de cada registro, se observó la aparición de estructuras circulares que se proyectaban desde la membrana plasmática hacia el exterior. El Fluo-3AM se satura a altas concentraciones de Ca^{2+} y se genera una señal fluorescente de alta intensidad, esto tal vez pueda explicar las estructuras circulares observadas al final de los registros y que podrían estar dando cuenta de la salida del Ca^{2+} desde la célula hacia el medio externo.

La exposición de los cardiomiocitos a estrés hiperosmótico en un medio de incubación nominalmente libre de Ca^{2+} , generó cambios en la señal fluorescente, siendo menos pronunciada y alcanzando los máximos, en ambos componentes, a mayores tiempos. El aumento de los niveles de Ca^{2+}_i inducido por el estrés hiperosmótico detectado en los cardiomiocitos mantenidos en un medio libre de Ca^{2+} se podría deber a la apertura de canales y liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares. Estímulos que aumentan la actividad de proteína kinasa A generan aumentos del Ca^{2+}_i ya sea por el ingreso desde el medio extracelular o salida desde reservorios intracelulares (123). El influjo de Ca^{2+} estimula

una mayor actividad de los canales de calcio presentes en los reservorios intracelulares, produciéndose el proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (66,73). Los datos obtenidos en esta tesis apoyan que el origen más importante en las transientes de Ca^{2+} inducidas por estrés hiperosmótico es el medio externo ya que la preincubación de los cardiomiocitos en un medio libre de Ca^{2+} inhibió la apoptosis inducida por sorbitol (datos no mostrados). Es probable que el estímulo osmótico produzca la típica liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} y que el calcio externo tenga un papel protagónico en la respuesta apoptótica.

En varios modelos experimentales de apoptosis del cardiomiocito como son la isquemia/reperfusión o la sostenida señalización a través de la sobreexpresión de la proteína $\text{G}\alpha_q$ activa, los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} se han relacionado con eventos apoptóticos a nivel de la mitocondria como son la apertura del poro de transición y posterior activación de caspasas (66). Se ha demostrado que el influjo de Ca^{2+} induce la apertura del poro PT, la entrada de Ca^{2+} induce la liberación de este ión desde compartimentos intracelulares como es el retículo sarcoplásmico (RS). El Ca^{2+} liberado desde el RS es eficientemente capturado por la mitocondria, induciendo la apertura del poro mitocondrial. La desregulación del Ca^{2+} citosólico resulta en una sobrecarga de Ca^{2+} que induce apoptosis a través de un mecanismo dependiente de la mitocondria (124,125). En nuestro modelo hemos observado que el estrés hiperosmótico, además de generar transientes de Ca^{2+} en el cardiomiocito, produce la depolarización de la membrana mitocondrial, lo cual es consistente con posteriores eventos apoptóticos (Valentina Parra, comunicación personal).

Para clarificar el origen del Ca^{2+} movilizado por el estrés hiperosmótico por sorbitol se utilizó un quelante del Ca^{2+}_i (BAPTA-AM), un inhibidor de canales de calcio tipo L (nifedipino) y un inhibidor de los canales de calcio sensibles a rianodina (rianodina). Los resultados confirmaron que este tipo de estrés estimula la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo y que su liberación desde reservorios intracelulares sería independiente, en parte, de este Ca^{2+} externo (Figura 40). Además, el análisis cinético permitió determinar que los canales de calcio tipo L (LTCC), pero no los receptores para rianodina (RyR) median, en parte, el aumento del Ca^{2+}_i . El nifedipino retrasará significativamente el componente rápido citoplasmático. Lamentablemente no se pudo determinar la participación de otros canales en la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo. Tanto el Cadmio como el Gadolinio, bajo nuestras condiciones experimentales, generaron transientes de Ca^{2+} mayores a las

observadas con el estrés hiperosmótico (datos no mostrados). Una eventual explicación para estos efectos podría ser la generación de estrés oxidativo por estos compuestos en el cardiomiocito.

La homeostasis del Ca^{2+} es un proceso altamente regulado, uno de los principales puntos de regulación es la fosforilación de diversas proteínas. La entrada de calcio desde el medio externo genera salida de calcio desde sus depósitos intracelulares y el retorno a los niveles basales dependen de la fosforilación/desfosforilación de proteínas que regulan receptores y bombas que mantienen en un estado basal los niveles del Ca^{2+}_i (66). Los resultados sugieren la existencia de un componente de liberación de calcio desde reservorios intracelulares, sin embargo el mecanismo involucrado en dicha liberación es desconocido. La vía transduccional de la fosfolipasa C (PLC)-inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)-receptores de IP_3 (IP_3R) representa el mecanismo más importante y ubicuo de movilización de Ca^{2+} desde sus reservorios intracelulares en distintos tipos celulares, entre ellos el cardiomiocito (126). La inhibición de algunos componentes de esta vía en la liberación de Ca^{2+} en respuesta al estímulo osmótico, sugieren su participación. La inhibición de PLC, en ausencia de calcio externo, bloqueó completamente el efecto del estrés hiperosmótico en los niveles de Ca^{2+} . En cambio, cuando las células se trataron con antagonistas de los IP_3R , sorprendentemente, se observó solo una inhibición parcial. Estos resultados indican que la liberación de Ca^{2+} desde sus reservorios intracelulares en respuesta a sorbitol dependen de la activación de la PLC, pero que los componentes río abajo en esta vía no son los únicos responsables en esta liberación. La participación del IP_3 en la liberación de Ca^{2+} desde sus depósitos intracelulares en respuesta al estrés hiperosmótico requiere de mayor investigación. Aunque al menos, tres subtipos de receptores para IP_3 se han detectado en el cardiomiocito con distribuciones subcelulares diferentes (127,128) queda también por investigar cuál(es) de estas isoformas mediaría los efectos del estrés hiperosmótico.

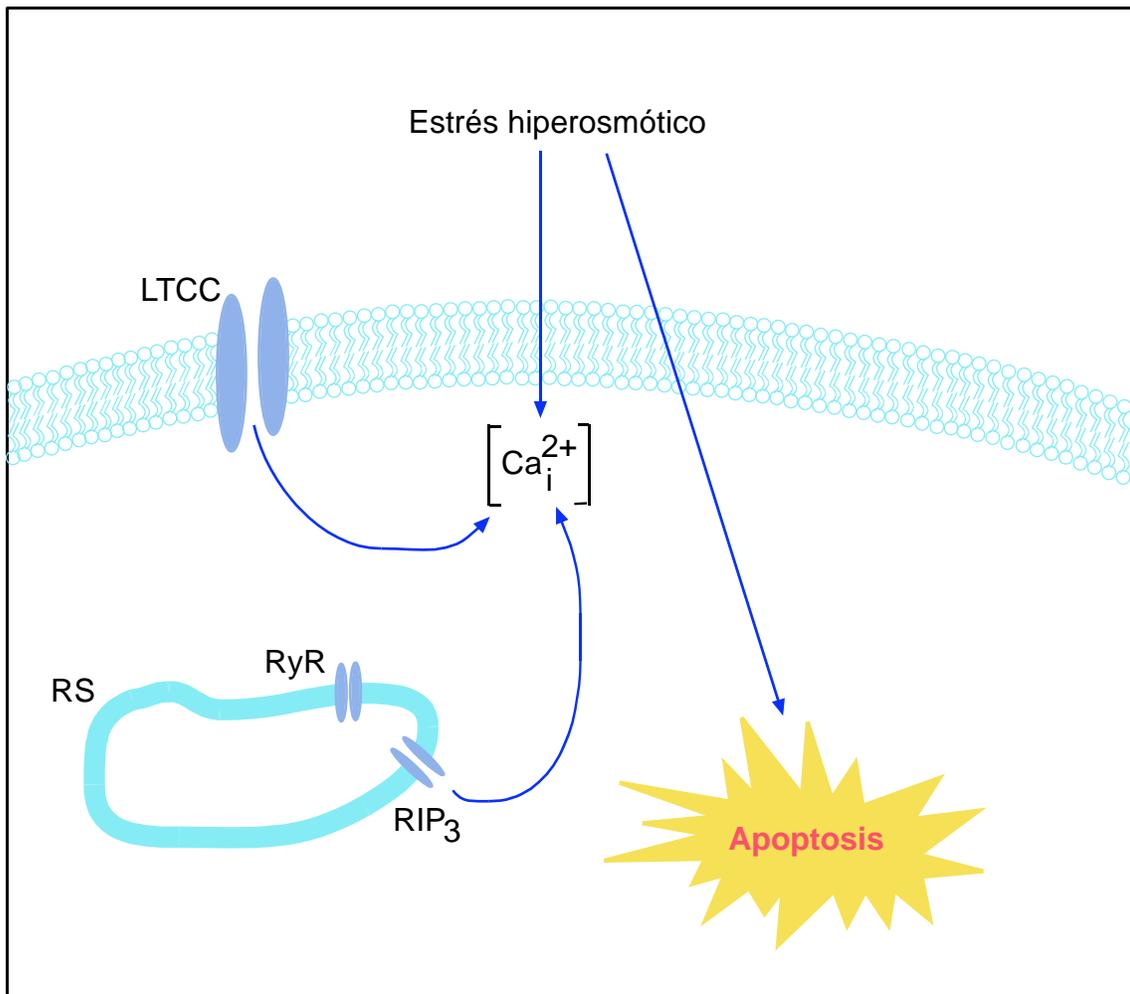


Figura 40. Esquema hipotético del aumento del Ca^{2+}_i inducido por estrés hiperosmótico

El estrés hiperosmótico aumenta los niveles del Ca^{2+}_i en cardiomiocitos. El Ca^{2+}_i aumenta por un influjo mediado por los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCC) y, salida de este ión desde depósitos celulares, la cual es mediada por los receptores de IP_3 (RIP_3) presentes en el retículo sarcoplásmico (RS).

7.5. El estrés hiperosmótico y calmodulina kinasa

En el corazón se expresan las CaMKs tipo I, II y IV, siendo más abundante e importante la de tipo II. La determinación de la actividad CaMKII en distintos tipos celulares ha dejado de manifiesto el carácter multifuncional de esta enzima, mostrando su participación en diversos procesos celulares como son la gluconeogénesis, la respiración mitocondrial, endocitosis, síntesis de neurotransmisores y transcripción génica (129). CaMKII se encuentra altamente representada en células del sistema nervioso central. En los cardiomiocitos, CaMKII se ha asociado a distintas patologías cardíacas (73). Ratones transgénicos que sobreexpresan una versión constitutivamente activa de la isoforma de CaMKII, exhiben cambios eléctricos característicos de arritmias (130). La sobre-expresión de CaMKII α induce un programa genético asociado con hipertrofia e insuficiencia cardíaca a través de la fosforilación del receptor de rianodina (RyR) y del fosfolamban (PLB) (131). Esta información en conjunto sugiere que la actividad y expresión de CaMKII en el cardiomiocito cumple un papel central en el desarrollo de diversos procesos fisiopatológicos. En esta tesis se determinó que el estrés hiperosmótico por sorbitol no alteró significativamente la actividad de CaMKII. Este resultado es interesante pues el estrés hiperosmótico al igual que IGF-1, el cual si activa a esta proteína en el cardiomiocito (62), genera movimientos de Ca^{2+}_i que eventualmente podrían desencadenar la activación de la enzima. Sin embargo, nuestros estudios muestran que las transientes de Ca^{2+} generadas por IGF-1 son distintas, en origen y cinética, a las descritas para el estrés hiperosmótico en esta tesis. La señal de Ca^{2+} inducida por IGF-1 se inicia en el núcleo y se propaga al citoplasma. En cambio, el estrés hiperosmótico induce transientes que se originan en el compartimento citoplasmático y requieren de una importante entrada de Ca^{2+} desde el medio externo. Estas evidencias podrían explicar las diferencias observadas en la activación de CaMKII por estos dos estímulos. De hecho en el tejido neuronal, las señales de Ca^{2+}_i son localizadas y activan preferencialmente a isoformas de CaMKII ubicadas en la vecindad de los sitios de liberación de calcio (132). Una segunda explicación para la incapacidad del estrés hiperosmótico de activar a CaMKII podría ser que la(s) isoforma(s) en particular activada(s) por IGF-1 puede(n) ser mas sensible(s) a los movimientos de Ca^{2+} que aquellos inducidos por el estrés hiperosmótico. Esta idea se ve respaldada por la observación de que isoformas específicas de CaMKII exhiben distintas sensibilidades a las oscilaciones de Ca^{2+}_i ; tanto en frecuencia, como en intensidad o amplitud (139). El estrés hiperosmótico aumentó significativamente la actividad de CaMKII sólo en los cardiomiocitos preincubados con IGF-1 (datos no

mostrados), sugiriendo que IGF-1 aumenta la sensibilidad de la ruta de señalización de CaMKII, permitiéndole responder al estrés hiperosmótico. En este sentido, se ha descrito que las isoformas de CaMKII pueden modificar su localización celular al ser activadas (132-134) lo que podría tal vez ocurrir con IGF-1.

7.6. Estrés hiperosmótico y calcineurina

Existe controversia acerca de la función de calcineurina en diversos eventos celulares, la cual se ha suscitado, en parte, por la dificultad de cuantificar confiablemente su actividad enzimática, la cual se evalúa a través de la liberación de fosfato desde un sustrato fosforilado (86). Debido a la presencia de múltiples fosfatasas presentes en los extractos celulares, se requiere realizar reacciones paralelas que discriminen la activación de Cn de la de otras fosfatasas. A similitud de lo realizado para determinar la actividad de CaMKII, la actividad de Cn se cuantifica en presencia de un péptido inhibitorio. En el presente trabajo se utilizó un método no radiactivo espectrofotométrico basado en la detección de fosfato libre por verde malaquita. En el ensayo enzimático se determinó la liberación de fosfato desde un sustrato artificial RII, cuya unión al reactivo "GREEN™" genera un color verde. Para eliminar la interferencia de las fosfatasas 1 y 2A, las cuales son las más abundantes, la determinación se realizó en presencia y ausencia de ácido okadaico (AO) y EGTA. En general, Cn se distingue de estas dos fosfatasas por su sensibilidad a CsA e insensibilidad a OA. Las condiciones del procedimiento experimental utilizado permitieron determinar de manera segura, solo la actividad de Cn.

Cn es un transductor crítico de señales de Ca^{2+} en el cardiomiocito, participando en eventos celulares tan distintos como son su desarrollo, hipertrofia y muerte por apoptosis (80). Su participación durante el desarrollo del cardiomiocito está bien documentada y no está sujeta a controversia (80). A pesar de la creciente información que liga a Cn a la progresión de la hipertrofia cardiaca, se desconoce el mecanismo exacto cómo esta fosfatasa promueve el crecimiento del cardiomiocito. En general, los estudios realizados con modelos *in vitro*, presentan evidencias que concuerdan en que la actividad de esta fosfatasa aumenta en respuesta a estímulos hipertróficos. La actividad de Cn aumenta en respuesta a estímulos hipertróficos como son la infusión β -adrenérgica, la sobrecarga de presión y el ejercicio, la cual está acompañada de aumentos en los niveles de esta proteína (84).

Nuestros resultados muestran que el estrés hiperosmótico, un estímulo apoptótico, no activa significativamente a Cn. Estos resultados contrastan con aquellos que han relacionado a Cn con eventos apoptóticos en el cardiomiocito (82,87,135). Se ha propuesto que Cn promueve la apoptosis en diversos tipos celulares por distintos mecanismos, uno de ellos tendría relación con la desfosforilación de Bad, una proteína pro-apoptótica de la familia bcl2 que tiene la capacidad de translocarse a la mitocondria e influir en la liberación del citocromo c (88). Por otro lado, se han mostrado interacciones entre la activación de esta fosfatasa y la de la vía transducional PI3K/PKB, la cual es generalmente una vía antiapoptótica y cuya activación estabiliza la membrana mitocondrial fosforilando a BAD (89). La actividad y niveles de esta proteína aumentan en respuesta a estímulos apoptóticos, pero la literatura coincide en considerarla como un efector transduccional cardioprotector (136). El principal efector molecular de Cn para modular la expresión génica son los factores transcripcionales de la familia NFAT.

7.7. Relación Ca^{2+}_i , CaMKII y Cn y apoptosis inducida por estrés hiperosmótico

Las fluctuaciones del Ca^{2+}_i cumplen un importante papel en la señalización celular, ya que la respuesta de sus efectores depende de los cambios en la frecuencia o intensidad del estímulo. En la apoptosis, los movimientos del Ca^{2+}_i constituyen un mecanismo transduccional enormemente complejo y versátil, en el que participan sistemas redox, vías de señalización de proteínas kinasas y fosfatasas y también de caspasas (63,67). Dentro de las “máquinas celulares” decodificadoras de estas señales están CaMKII y Cn, las que pueden participar tanto en la activación de mecanismos pro-apoptóticos como en la codificación de señales anti-apoptóticas, dependiendo de la naturaleza del estímulo y del modelo estudiado (69,71).

Ca^{2+} y las vías reguladas por este ión y calmodulina, CaMKs y Cn, son importantes reguladores de las respuestas de supervivencia y muerte en varios tipos celulares. Estos efectores transduccionales cumplen una significativa participación en el desarrollo de la hipertrofia del cardiomiocito, pero su inclusión en la apoptosis es menos clara (66). La modulación de los niveles de Ca^{2+} en respuesta a diferentes tipos de estrés se retransmite al núcleo por distintos mecanismos que regulan la transcripción de genes asociados a

apoptosis. Nuestros resultados sugieren que Ca^{2+}_i no mediaría la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico, pero si afectaría la señal de sobrevivencia generada por este estímulo. La apoptosis inducida por estrés hiperosmótico por sorbitol no disminuyó con el pretratamiento del cardiomiocito con un quelante del calcio intracelular. Incluso en la mayoría de los casos hubo más muerte, indicando que el Ca^{2+} intracelular media la sobrevivencia del cardiomiocito a estímulos apoptóticos.

La calmodulina, uno de los sensores intracelulares de Ca^{2+} más importantes, regula las señales de Ca^{2+} y los cambios en la expresión génica a través de distintos mecanismos, algunos de ellos mediante CaMKs y Cn, proteínas quinasa y fosfatasa dependientes de Ca^{2+} y calmodulina. La amplitud, frecuencia, fuente y localización subcelular (espacial y/o temporal) de las señales de Ca^{2+} determinan respuestas celulares diferenciales frente al mismo segundo mensajero. Las CaMKs son activadas por altos y transitorios niveles intracelulares de Ca^{2+} mientras que Cn se activa por incrementos sostenidos de este ión (66,70,79). Dependiendo del estímulo apoptótico, se ha descrito la participación de estas dos proteínas en la muerte del cardiomiocito, ya sea activándola o inhibiéndola. Estas proteínas además regulan indirectamente otras vías transduccionales, las que también, en algunos casos, modulan los niveles intracelulares de Ca^{2+} , a través de fosforilación o desfosforilación de bombas y canales a través de los cuales se moviliza este ión de un compartimento a otro (66). Nuestros resultados indican que estas dos proteínas no regulan la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico en el cardiomiocitos. El estrés hiperosmótico por sorbitol no modificó la actividad de estas dos proteínas y su inhibición por KN62 y CsA no bloqueó su efecto apoptótico. Debido a que los inhibidores utilizados no son del todo específico, como es el caso de Cn se necesitará usar otras aproximaciones experimentales para descartar definitivamente su participación.

8. CONCLUSIONES

En resumen se concluye que:

1. CREB participa en la señalización antiapoptótica del IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico.
2. CREB no participa en la muerte del cardiomiocito expuesto a estrés hiperosmótico.
3. CREB se activa tanto en respuesta al estrés hiperosmótico como en respuesta a IGF-1.
4. El estrés hiperosmótico regula la activación de CREB inducida por IGF-1.
5. El estrés hiperosmótico aumentó rápida y transitoriamente los niveles intracelulares de Ca^{2+} en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.
6. Estos aumentos del Ca^{2+}_i se debieron a un influjo de Ca^{2+} y a su liberación desde depósitos intracelulares.
7. El estrés hiperosmótico no aumentó las actividades enzimáticas de las proteínas calmodulina quinasa II y calcineurina.
8. Calmodulina quinasa II y calcineurina no participan en la apoptosis inducida por el estrés hiperosmótico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Weber, KT. Brilla, CG. (1991). Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation* 83: 1849-1865.
2. Chien, KR. Knowlton, KU. Zhu, H. Chien, S. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative physiologic response. *FASEB J.* 5:3037-3046.
3. Raloff J. (2001). Coming to terms with death: Accurate descriptions of a cell's demise may offer clues to diseases and treatments. *Science News.*; 159:378-380.
4. Ranganath RM, Nagashree NR. (2001). Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol.* 202: 159-242.
5. Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-776.
6. Feuerstein, G. Young, P. (2000). Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc. Res.* 45:560-569.
7. Sabbah, H. (2000). Apoptosis cell death in the heart. *Cardiovasc. Res.* 45:704-712.
8. Borges, M. Viopio-Pulkki, LM. Izumo, S. (2000). Apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45: 525-257.
9. Bishopric, N. Andreka, P. Slepak, T. Webster, K. (2001). Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:141-150.
10. Depre, C. Taegtmeyer, H. (2000). Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovasc. Res.* 45: 538-548.
11. Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa TJ Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. (1994). Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 75:426-433.
12. Saraste A, Pulkki KJ Kallajoki MJ Henriksen K, Parvinen MJ Voipio-Pulkki LM. (1997). Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 95:320-323.
13. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Trenblay J, Schwartz K, Hamet P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 97:2891-2897.
14. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka MJ Shiojima 1, Hiroi YJ Yazaki Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest.* 100:1813-1821.
15. Wang LJ Ma W, Markovich RJ Lee WLJ Wang PH. Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. (1998) *Endocrinol.* 139:1354-1360.
16. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz RJ Mann DL. (1995). Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation.* 92:1487-1493.

17. Bialik S, Cryns VLJ, Drincic A, Miyata S, Flamingi F, Zamboni LJ, Landi LJ, Pignatti C, Guarnieri CJ, Caldarera CM. (1999). The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circ Res.* 85:403-414.
18. Adams JW, Pagel AL, Means CK, Oxsenberg D, Armstrong RC, Brown JH. (2000). Cardiomyocyte apoptosis induced by $G_{\alpha q}$ signaling is mediated by permeability transition pore formation and activation of the mitochondrial death pathway. *Circ Res.* 287:1180-1187.
19. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. (2003). Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 93(4):292-301.
20. Bratton SB, Cohen GM. (2001). Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *TIPS* 22:306-315.
21. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. (1999). Regulation of Bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res.* 85:940-949.
22. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275:1132-1136.
23. Teiger E, Dam TV, Richard L. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin Invest.* 97:2891-2897.
24. Dorn GW 2nd, Hahn HS. (2004). Genetic factors in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 1015:225-37.
25. Prasad SV, Perrino C, Rockman HA. (2003). Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 13(5):206-12.
26. Singh K, Communal C, Sawyer B, Colucci WS. (2000). Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovasc Res.* 45:713-719.
27. Iwai-kanai E, Hasegawa K, Araki M, Kakita T, Morimoto T, Sasayama S. (1999). α - and β -adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation.* 100:305-311.
28. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP. (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II. *J Clin Invest.* 111(5):617-25.
29. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. (1999). Opposing effects of β 1- and β 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis. *Circulation.* 100:2210-2212.
30. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L. (1998). The negative inotropic effect of β 3- adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest.* 102:1377-1384.
31. Chandra J, Samali A, Orrenius S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biol Med.* 29:323-333.

32. Dreswnowsk, K. Baumgarten, CM. (1991). Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, clorothiazide, and ouabain. *Am. J. Physiol.* 260: C122-131.
33. Wright, AR. Rees, S. (1998). Cardiac cell volume: crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types. *Pharmacol. Ther.* 80: 89-121.
34. Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Diaz-Araya G, Lavandero S. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. (2001). *Cell Tissue Res.* 279-85.
35. Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. (2003). *J Biol Chem.* 278(40):38484-94.
36. Cicconi S, Ventura N, Pastore D, Bonini P, Di Nardo P, Lauro R, Marlier LN. (2003). Characterization of apoptosis signal transduction pathways in HL-5 cardiomyocytes exposed to ischemia/reperfusion oxidative stress model. *J Cell Physiol.* 195(1):27-37.
37. LeRoith, D. Roberts, CT. (1993). Insulin-like growth factor. *Ann. NY Acad. Sci.* 692:1-9.
38. Schneider, M. Lahm, H. Wu, M. Holeflich, A. Wolf, E. (2000). Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *FASEB J.* 14:629-640.
39. LeRoith, D. (2000). Insulin-like growth factor I receptor signaling-overlapping or redundant pathways?. *Endocrinology* 141:1287-1288.
40. Foncea, R. Andersson, M. Ketterman, A. Blakesley, V. Sapag-Hagar, M. Sugden, P. Lee Roith, D. Lavandero, S. (1997). Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 31:19115-19124.
41. Fuller, SJ. Mynett, JR. Sudgen, PH. (1992). Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors. *Biochem. J.* 282:85-90.
42. Morales, MP Gálvez, A. Eltit, JM. Ocaranza, P. Díaz-Araya, G. Lavandero, S. (2000). IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 1029-1035.
43. Foncea, R. Gálvez, A. Pérez, V. Morales, MP. Calixto, A. Meléndez, J. González-Jara, F. Díaz-Araya, G. Sapag-Hagar, M. Sugden, PH. LeRoith, D. Lavandero, S. (2000). Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:736-744.
44. Eltit, JM. Morales, MP. Campos, X. Gálvez, A. Ocaranza, P. Sapag-Hagar, M. Lavandero, S. (2001). Apoptosis induced by hyperosmotic stress is attenuated by insulin-like growth factor-1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in cultured cardiomyocytes. *Manuscrito enviado a publicación.*
45. Solem, ML. Thomas, AP. (1998). Modulation of cardiac Ca²⁺ channels by IGF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252:151-155.
46. Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S. (2004). Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-

- trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 279:7554-7565.
47. Robinson MJ, Cobb MH. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9:180-186.
 48. Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, Feuerstein GZ, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein EH. (2000). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res.* 86:692-699.
 49. Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV, Kyriakis JM. (1996). Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circ Res.* 78:947 -953.
 50. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases in apoptosis. *Science.* 270:1326-1331.
 51. Feuerstein GZ, Young PR. (2000). Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res.* 45:560-569.
 52. Hong F, Kwon SJ, Jhun BS, Kim SS, Ha J, Kim SJ, Sohn NW, Kang C, Kang I. (2001). Insulin-like growth factor-1 protects H9c2 cardiac myoblasts from oxidative stress-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Life Sci.* 68:1095-105.
 53. Abe J, Baines CP, Berk BC. Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury. *Circ Res.* 2000, 86:607-609.
 54. Passier R, Hong Zeng, Frey N, Naya FJ, Nicol R, Mc Kinsey T, Overbeek P, Richardson JA, Grant S, Olson EN. (2001). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest.* 105:1395-1406.
 55. Bell, LM. Leong, M. Kim, B. Wang, E. Park, J. Hemmings, BA. Firestone, GL. (2000). Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol. Chem.* 275:25262-25272.
 56. Mao, Z. Bonni, A. Xia, F. Nadal-Vicens, M. Greenberg, ME. (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286:785-790.
 57. Sugden PH, Clerk A. (1998). "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c- Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res.* 83:345-352.
 58. Kummer JI, Rao PK, Heidenreich KA. (1997). Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272:20490-20494.
 59. Pugazhenti, S. Nesterova, A. Sables, C. Heidenreich, KA. Boxer, LM. Heasley, LE. Reusch, J. (2000). Akt/Protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression Through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275:10761-10766.

60. Pugazhenthii, S. Boras, T. O'Connor, D. Meintzer, MK. Heidenreich, KA. Reusch, J. (1999). Insulin-like growth factor 1-mediated activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274:2829-2837.
61. Wu, W. Lee, W. Wu, YY. Chen, D. Liu, T. Jang, A. Sharma, PM. Wang, PH. (2000). Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275:40113-40119.
62. Xiao, G. Jeffers, M. Bellacosa, A. Mitsuuchi, Y. Vande Woude, GF. Testa, JR. (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:247-252.
63. Berridge M, Lipp P, Bootman M. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Mol. Cell Biol.* 1:11-20.
64. Elliot AC. (2001). Recent development in non-excitabile cell calcium entry. *Cell Calcium* 30:73-93
65. Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:517-529.
66. Zhang T, Miyamoto S, Brown JH. (2004). Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: Friends or Foes? *Recent Prog horm Res.* 59:141-168.
67. Hajnoczky G, Davies E, Madesh M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:445-54.
68. Jaconi M, Bony C, Richards SM, Terzic A, Arnaudeau S, Vassort G, Puceat M. (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell.* 11:1845-58.
69. Frey N, McKinsey TA, Olson EN. (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med.* 6:1221-7.
70. Soderling TR. (1996). Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases II and IV. *Biochim Biophys Acta.* 1297:131-138.
71. Soderling T, Chang B, Brickey D. (2001). Cellular signaling through multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 276:3719-3722.
72. Waldmann R, Hanson PI, Schulman H. (1990). Multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase made Ca2+ independent for functional studies. *Biochemistry.* 29:1679-1684.
73. Zhu W-Z, Wang S-Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic, E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP. (2003). Linkage of β 1-adrenergic stimulation to apoptotic Heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca2+/calmodulin kinase II. *J Clin Invest.* 111:617-625.
74. Corcoran EE, Jeans AR. (2001). Defining Ca2+/Calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 276:2975-2978.

75. Fujisawa H. (2001). Regulation of the activities of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biochem.* 129(2):193-9.
76. Wu Yuejin, Colbran R., and Anderson M. (2001). Calmodulin kinase is a molecular switch for cardiac excitation-contraction coupling. *PNAS.* 98 (5):2877-2881.
77. Passier R, Hong Zeng, Frey N, Naya FJ, Nicol R, Mc Kinsey T, Overbeek P, Richardson JA, Grant S, Olson EN. (2001). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest.* 105:1395-1406.
78. See V, Boutillier AL, Bito H, Loeffler JP. (2001). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *FASEB J.* 15:134-144.
79. Klee CB, Ren H, Wang X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 273:13367–13370.
80. Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN. (2003). Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 278:36981-4.
81. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature.* 365:352-5.
82. Pu WT, Ma Q, Izumo S. (2003). NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro. *Circ Res.* 92(7):725-31.
83. Molkentin JD. (2000). Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res.* 27;87(9):731-8.
84. Saito S, Hiroi Y, Zou Y, Aikawa R, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. (2000). β -Adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 275:34528-33.
85. De Windt LJ, Lim HW, Haq S, Force T, Molkentin JD. (2000). Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH₂-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J Biol Chem.* 275(18):13571-9.
86. Lim HW, New L, Han J, Molkentin JD. (2001). Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 276(19):15913-9.
87. Kakita T, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Adachi S, Morimoto T, Wada H, Kawamura T, Yanazume T, Sasayama S. (2001). Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res.* 88(12):1239-46.
88. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 284(5412):339-43.

89. Jayaraman T, Marks AR. (2000). Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. *J Biol Chem.* 275:6417-6420.
90. West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11024-31.
91. Shaywitz, AJ. Greenberg, ME. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68:821-861.
92. Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, Xu R, During MJ, Dragunow M.J. (1999). CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *Neurochem.* 73:1836-42. Du, K. Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 273:32377-32379.
93. Schumacher, MA. Goodman, RH. Brennan, RG. (2000). The structure of a CREB bZIP-somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J. Biol. Chem.* 275:35242-35247.
94. Mayr B, Montminy M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:599-609.
95. Grewal, SS. Fass, DM. Yao, H. Ellig, CL. Goodman, RH. Stork, PJ. (2000). Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 275:34433-34441.
96. Wu, GY. Deisseroth, K. Tsien, RW. (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:2808-2813.
97. Du, K. Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 273:32377-32379.
98. Frentzke, RC. Orcarz, CE. Lang, RM. Lin, H, Leiden, JM. (1998). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J. Clin. Invest.* 101:2415-2426.
99. Liu W, Chin-Chance C, Lee EJ, Lowe WL Jr. (2002). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase contributes to insulin-like growth factor I-mediated inhibition of pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* 143:3802-12.
100. Muller FU, Boknik P, Knapp J, Luss H, Neumann J, Vahlensieck U, Bohm M, Deng MC, Scheld HH, Schmitz W. (1997). Quantification of the cAMP response element binding protein in ventricular nuclear protein from failing and nonfailing human hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 236:351-4.
101. Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, Li P, Wang Y, Schmitz W, Dietz R, von Harsdorf R. (2001). In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-

- dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation*. 104:2088-94.
102. El Jamali A, Freund C, Rechner C, Scheidereit C, Dietz R, Bergmann MW. (2004). Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy in vitro: activation of CREB downstream of GSK3beta. *FASEB J*. 18:1096-8.
 103. Reddy MA, Thimmalapura PR, Lanting L, Nadler JL, Fatima S, Natarajan R. (2002). The oxidized lipid and lipoxygenase product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces hypertrophy and fibronectin transcription in vascular smooth muscle cells via p38 MAPK and cAMP response element-binding protein activation. Mediation of angiotensin II effects. *J Biol Chem*. 277:9920-8.
 104. Minta A, Kao JPY, Tsien RY. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescent chromophores. *J. Biol. Chem*. 264:8171-8178.
 105. Castleman K. *Digital image processing*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1995.
 106. Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. (2000). Aldosterone and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 279:132-139.
 107. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.
 108. Castrillo A, de Las Heras B, Hortelano S, Rodriguez B, Villar A, Bosca L. (2001). Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. *J Biol Chem*. 276:15854-60.
 109. María Paz Morales. (2000). Evaluación de la apoptosis en cultivos de cardiomiocitos y su modulación por IGF-1. Memoria para obtener el título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
 110. Anita Gálvez Arévalo. (2003). Efecto apoptótico de la hiperglicemia en cardiomiocitos y su prevención por insulina e IGF-1: Estudio de los mecanismos transduccionales. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
 111. Eisner Verónica. (2004). Factor transcripcional NF-kB en la apoptosis del cardiomiocito activada por estrés hiperosmótico. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
 112. Juan Alberto Ulloa. (2002). Estudio del efecto apoptótico de la hiperoamolaridad: papel de la aldosa reductasa y su regulación por IGF-1. Memoria para obtener el título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
 113. Loyher ML, Mutin M, Woo SK, Kwon HM, Tappaz ML. (2004). Transcription factor tonicity-responsive enhancer-binding protein (TonEBP) which transactivates osmoprotective genes is

- expressed and upregulated following acute systemic hypertonicity in neurons in brain. *Neuroscience*. 124:89-104.
114. Demarex N, Distelhorst C. (2003). Apoptosis-the calcium connection. *Science*. 300:65-67.
 115. Burg MB, Kwon ED, Kultz D. (1996). Osmotic regulation of gene expression. *FASEB J*. 10:1598-606.
 116. Franchi-Gazzola R, Visigalli R, Dall'Asta V, Sala R, Woo SK, Kwon HM, Gazzola GC, Bussolati O. (2001). Amino acid depletion activates TonEBP and sodium-coupled inositol transport. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280:C1465-74.
 117. Welch S, Plank D, Witt S, Glascock B, Schaefer E, Chimenti S, Andreoli AM, Limana F, Leri A, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. (2002). Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res*. 90:641-8.
 118. Reusch JE, Klemm DJ. (2002). Inhibition of cAMP-response element-binding protein activity decreases protein kinase B/Akt expression in 3T3-L1 adipocytes and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 277:1426-32.
 119. Zhang CY, Wu YL, Boxer LM. (2002). Impaired proliferation and survival of activated B cells in transgenic mice that express a dominant-negative cAMP-response element-binding protein transcription factor in B cells. *J Biol Chem*. 277:48359-65.
 120. Francois F, Godinho MJ, Grimes ML. (2000). CREB is cleaved by caspases during neural cell apoptosis. *FEBS Lett*. 486:281-4.
 121. Meldolesi J, Grohovaz F. (2001). Total calcium ultrastructure: advances in excitable cells. *Cell Calcium*. 30:1-8.
 122. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, Pozzan T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*. 22:8619-8627.
 123. Kapiloff MS. (2002). Contributions of protein kinase A anchoring proteins to compartmentation of cAMP signaling in the heart. *Mol Pharmacol*. 62:193-9.
 124. Marks, A.R. (1997). Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am. J. Physiol*. 272, H597–H605.
 125. Szabadkai G, Rizzuto R. (2004). Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett*. 567:111-5.
 126. De Jonge HW, Van Heugten HA, Lamers JM. (1995). Signal transduction by the phosphatidylinositol cycle in myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 27:93-106.
 127. Taylor CW, Laude AJ. (2002) IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*. 32:321-34.
 128. Krizanova O, Krepsova K, Micutkova L, Kvetnansky R. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the heart compared to other tissues are differently modulated by stress. *Ann N Y Acad Sci*. 1018:310-4.
 129. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 2002;364:593-611.

130. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2002;106:1288-1293.
131. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH. The dC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2003;92:912-919.
132. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*. 1997;499:291-306.
133. Hudmon A, Schulman H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:473-510.
134. Berridge MJ, Dupont G. Spatial and temporal signalling by calcium. *Curr Opin Cell Biol*. 1994;6:267-274.
135. Molkenin JD. (2001). Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ Res*. 88:1220-2.
136. De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW 2nd, Kitsis RN, Molkenin JD. (2000). Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res*. 86:255-63.