

Juan I Burgos, Malena Morell, Luis A Gonano y Martín Vila Petroff.  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio E Cingolani, CONICET-UNLP

## INTRODUCCIÓN

La osmolaridad de los tejidos esta finamente regulada bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, en diferentes situaciones patológicas como estados de deshidratación severa, hiperglucemia, hiperlipidemia y diabetes, las células sufren encogimiento osmótico. A nivel cardíaco, esta alteración en el volumen celular, es capaz de promover disfunción contráctil. El Óxido Nítrico (NO), sintetizado por la Oxido Nítrico Sintasa (NOS), ha sido definido como segundo mensajero y regulador de la función cardíaca<sup>(1)</sup>. Previamente demostramos que el hinchamiento hipotónico de miocitos cardíacos produce liberación de NO promoviendo un soporte contráctil<sup>(2)</sup>.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el estrés hiperosmótico también promueve la liberación de NO y, de ser así, examinar su impacto sobre la función contráctil.

## MÉTODOS

Miocitos cardíacos de ratas wistar macho de 3 meses fueron aislados mediante digestión enzimática. Con el objetivo de inducir estrés hiperosmótico las células fueron perfundidas durante 5 minutos con una solución isosmótica (SI: 309 mOsm/L) y luego 20 minutos con una solución hiperosmótica (SH: 440 mOsm/L).

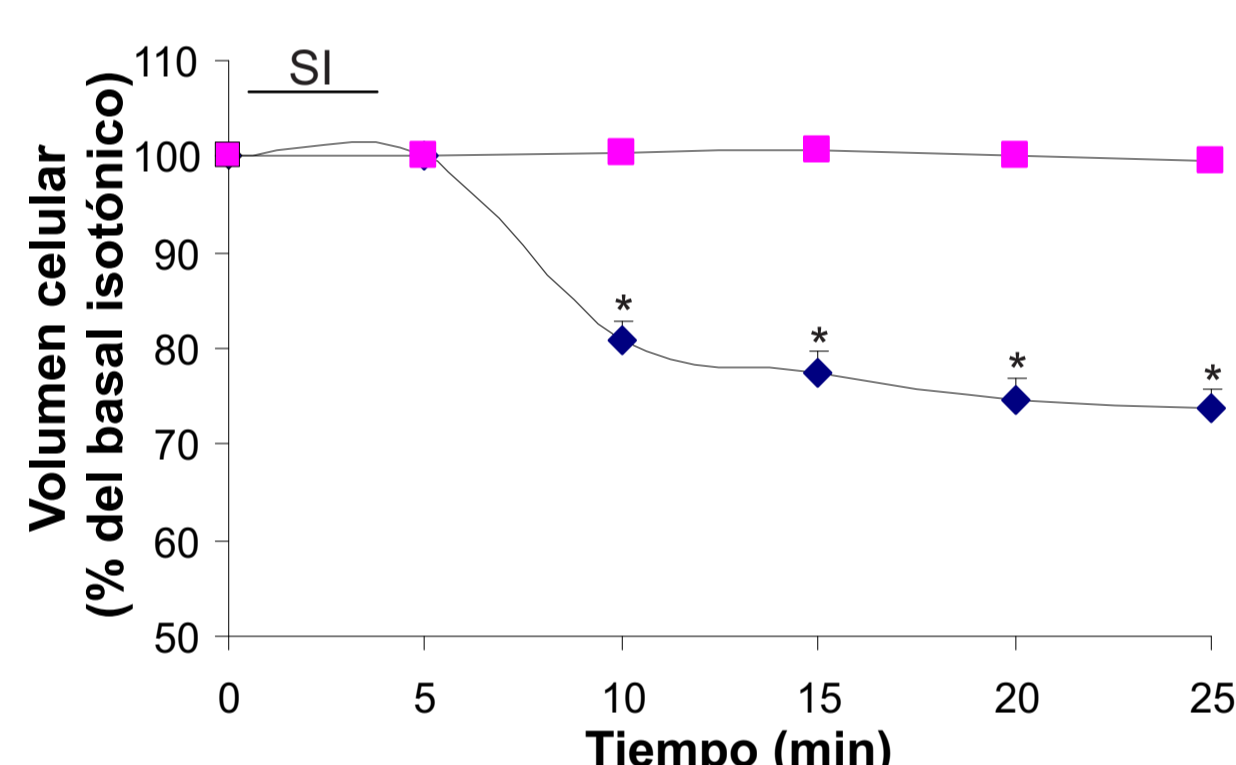
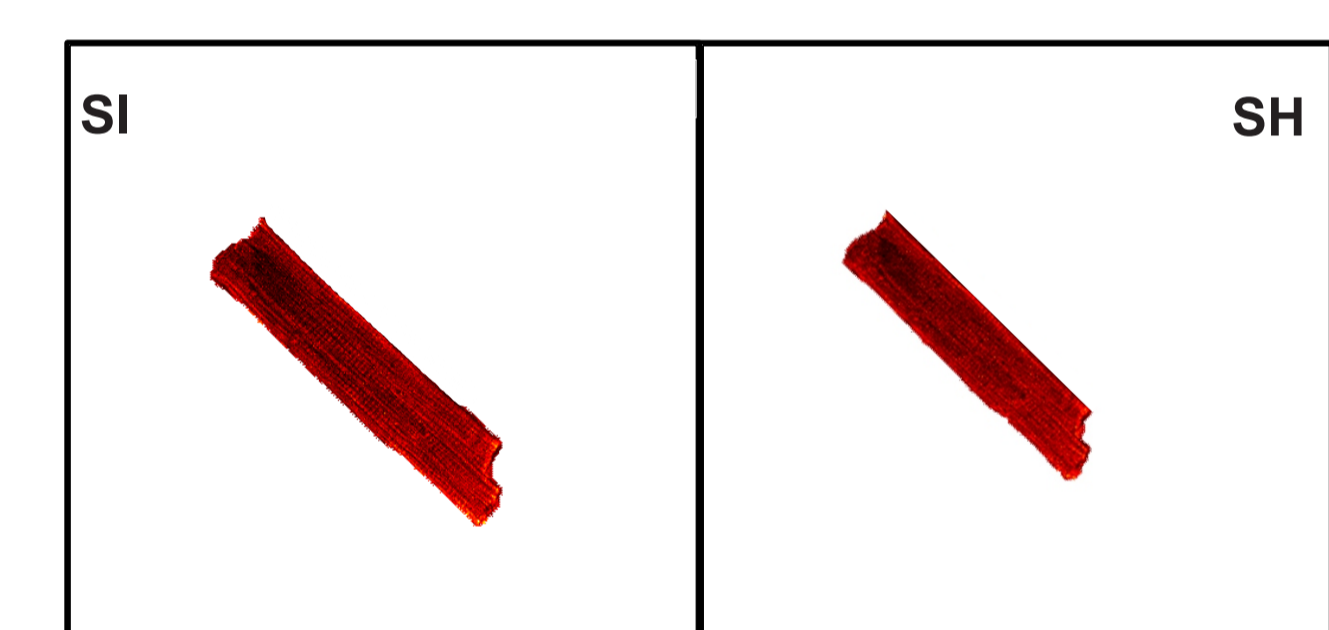
Para medir producción de NO, los miocitos fueron cargados con el indicador fluorescente DAF-FM y se tomaron imágenes de epifluorescencia en un microscopio invertido. En paralelo, se tomaron imágenes de campo claro donde se midió el cambio en el volumen celular.

Con el objetivo de evaluar la contractilidad, se midió el acortamiento celular mediante video detección de bordes.

Se estudió el nivel de fosforilación de eNOS y nNOS a partir de anticuerpos específicos para los sitios fosforilables de estas proteínas.

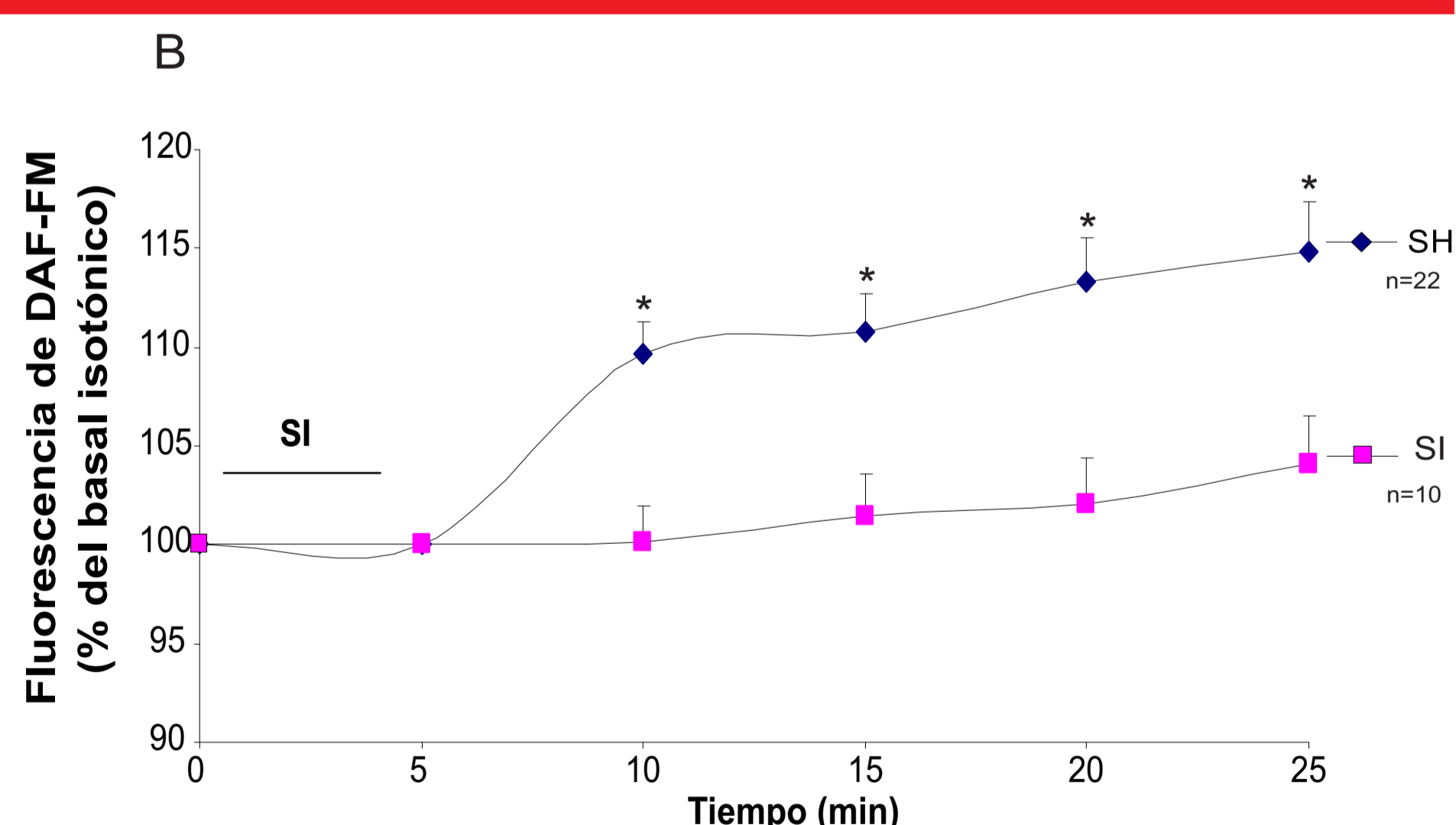
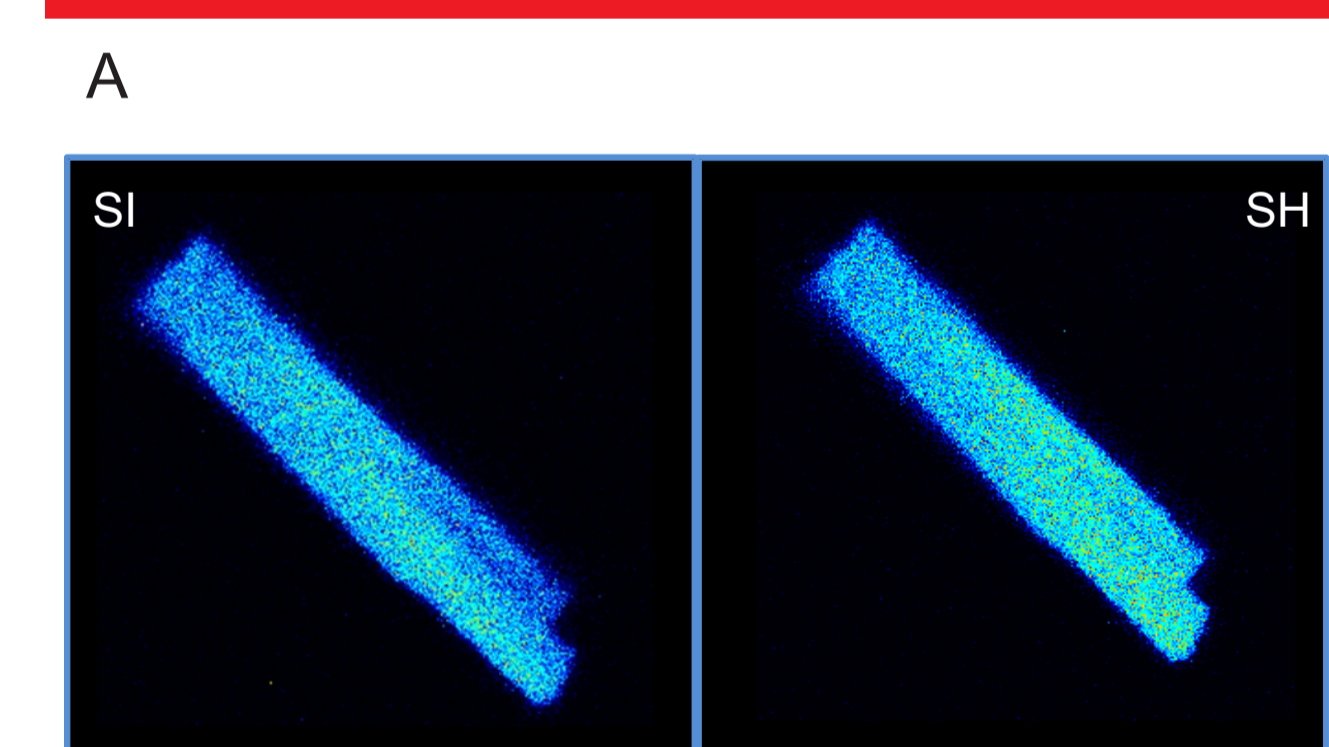
## RESULTADOS

### 1. El estrés hiperosmótico provoca la disminución del volumen celular



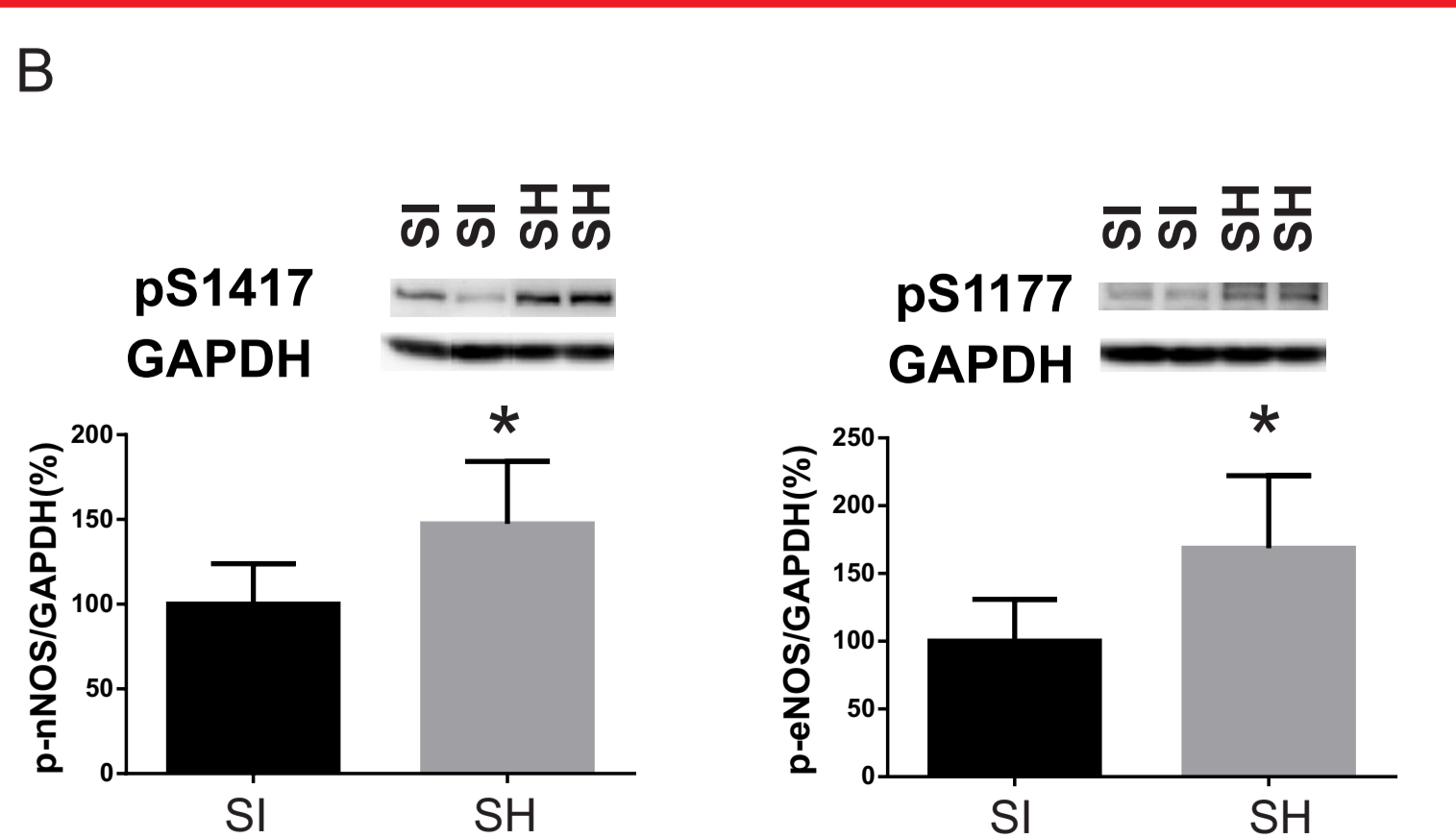
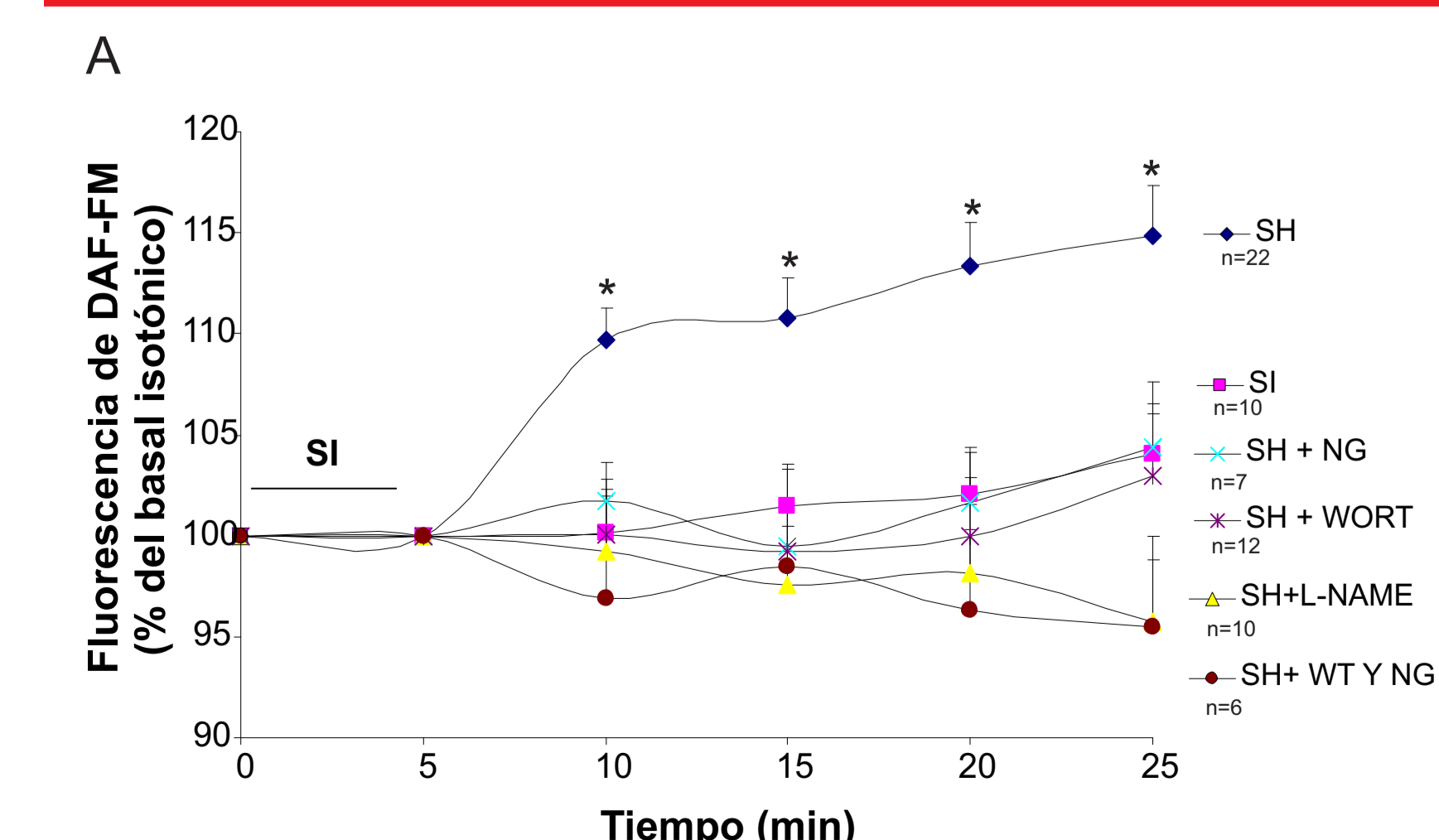
La perfusión con solución hiperosmótica (SH) disminuye significativamente el volumen de miocitos cardíacos.

### 2. Someter a los miocitos cardíacos a una solución hiperosmótica (SH) promueve la liberación de Oxido Nítrico (NO)



A: Imágenes representativas de fluorescencia que muestran un aumento de la fluorescencia de DAF-FM (indicativo de producción de NO) durante la perfusión de miocitos cardíacos con solución hiperosmótica (SH).  
B: Resultados promedio donde se muestra un aumento gradual de la fluorescencia de DAF-FM durante la perfusión de miocitos con solución hiperosmótica (SH) que es significativo a los 5 minutos comparado a la perfusión con solución isosmótica (SI).

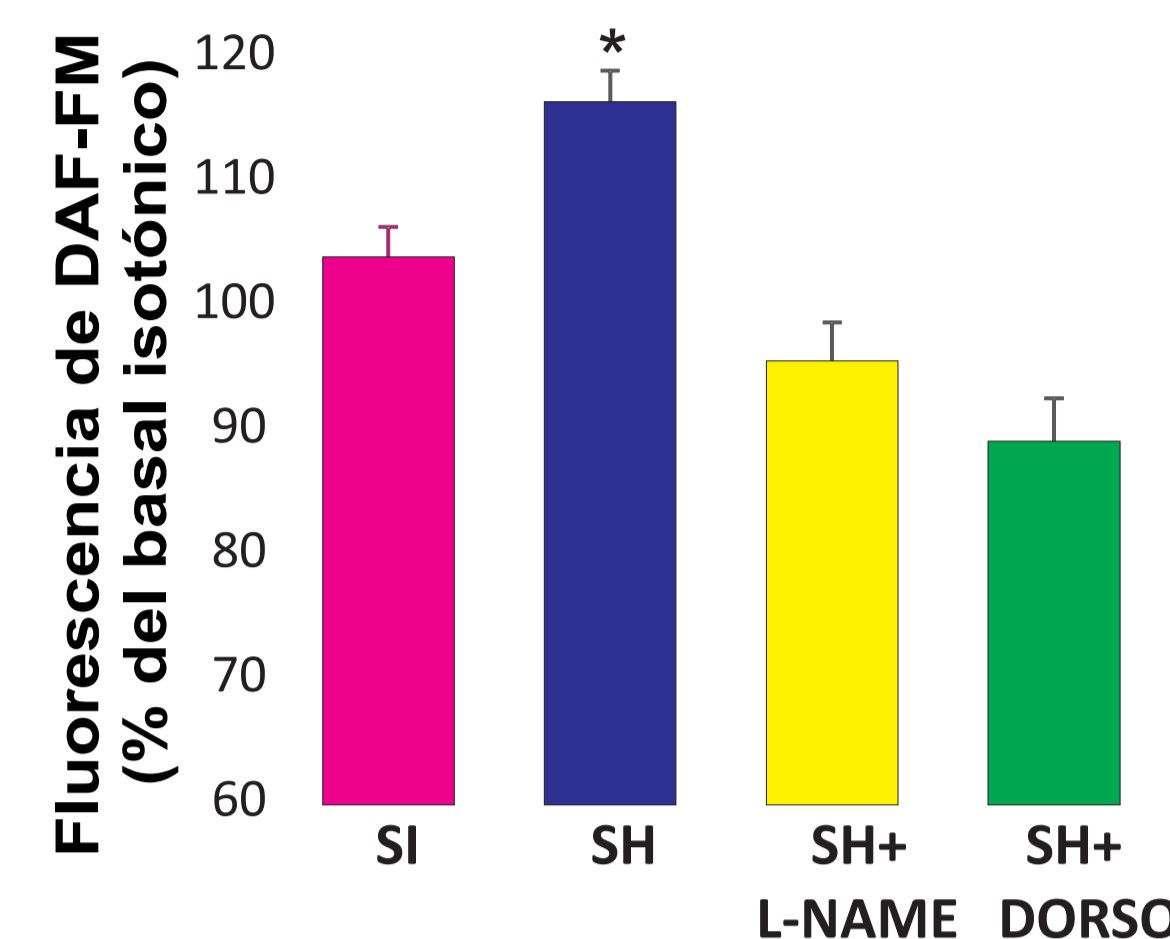
### 3. nNOS y eNOS serían las isoformas de la NOS responsables de la producción de NO durante el estrés hiperosmótico.



A: Inhibir las NOS (con L-NAME), la nNOS (con Nitroguanidina), la eNOS (con Wortmanina) o ambas (Nitroguanidina+Wortmanina) previene la producción de NO durante el estrés hiperosmótico.  
B: El estrés hiperosmótico promueve la fosforilación de nNOS y eNOS sugiriendo que ambas isoformas serían las responsables de la producción de NO.

### 4. La AMPK promueve la activación de las NOS durante el estrés hiperosmótico

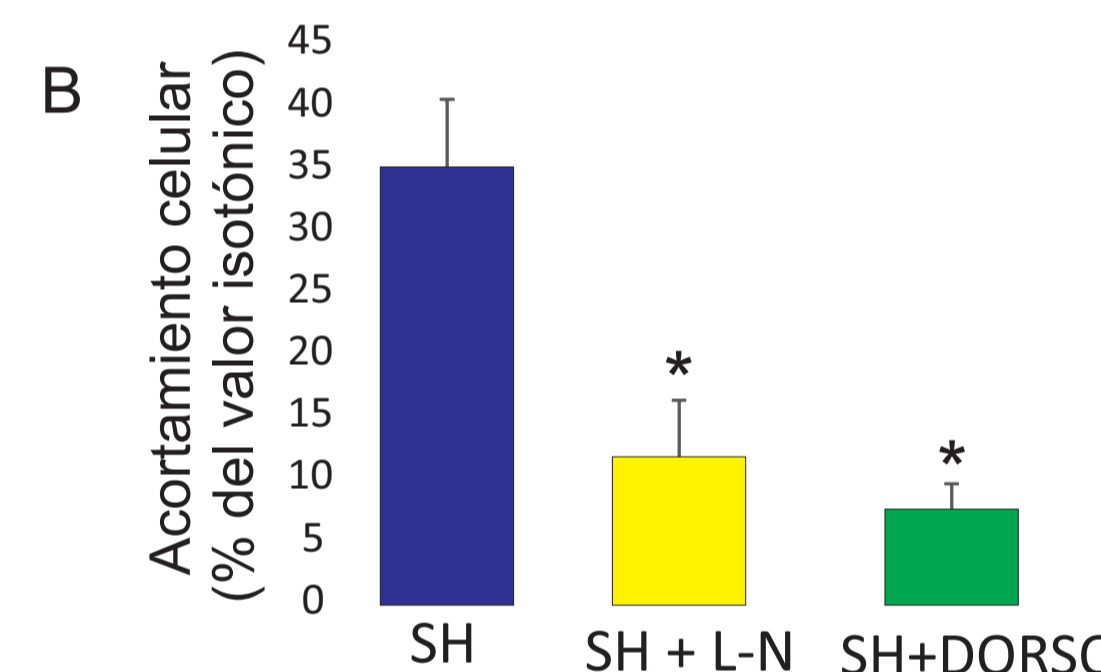
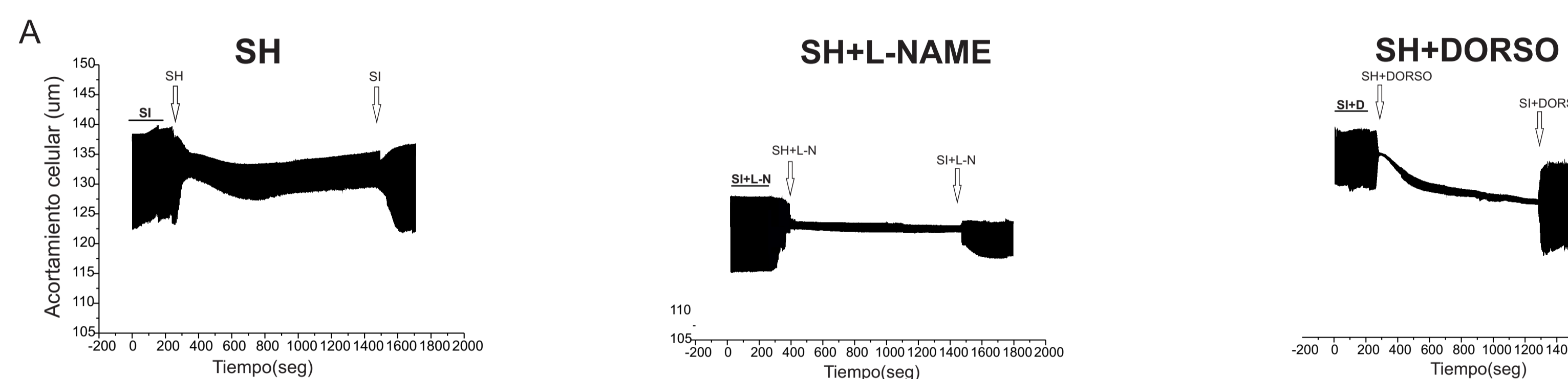
Teniendo en cuenta que la protein-quinasa dependiente de AMP (AMPK) puede ser activada por deformación de la membrana en el músculo cardíaco y que puede fosforilar a nNOS y eNOS examinamos si esta quinasa media la activación de las NOS inducida por estrés hiperosmótico.



Exponer a los miocitos a SH en presencia de Dorsomorfin (inhibidor de AMPK) previno el aumento en la fluorescencia de DAF-FM, indicativo de producción de NO, sugiriendo que esta quinasa sería la responsable de la activación de las isoformas de la NOS durante el estrés hiperosmótico.

### 5. El NO provee soporte inotrópico durante el estrés hiperosmótico

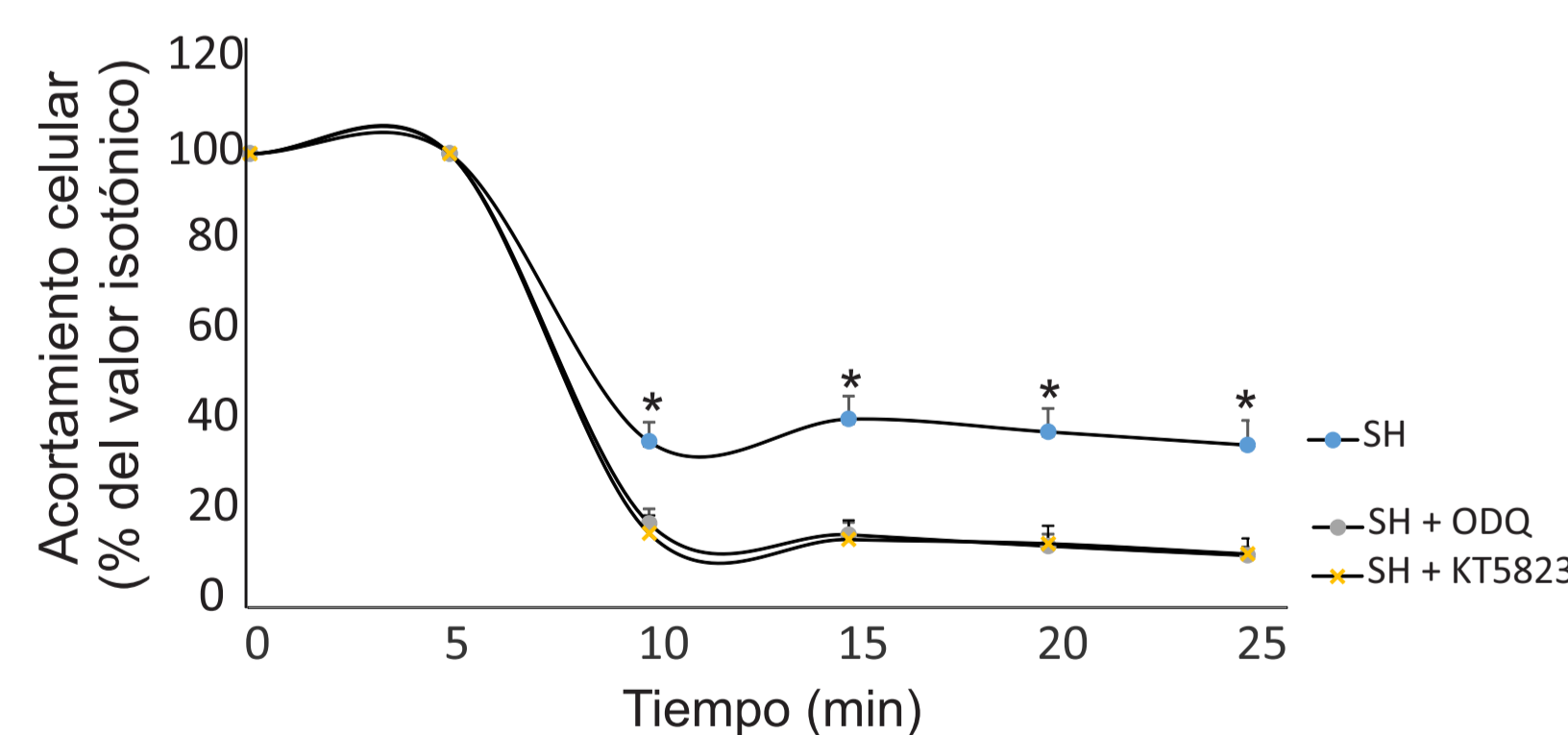
Esta descrito que el estrés hiperosmótico cursa con un efecto inotrópico negativo (EIN). Teniendo en cuenta que el NO es un importante modulador de la función miocárdica evaluamos si juega algún papel en el EIN inducido por estrés osmótico.



A. Perfiles representativos donde se muestra el efecto de la perfusión de miocitos con una solución hiperosmótica en ausencia y presencia de inhibidores (L-NAME y Dorsomorfin).  
B. Resultados promedio que demuestran que inhibir las NOS, con L-NAME o inhibir la quinasa activadora de las mismas con Dorsomorfin, exagera el EIN que se produce durante el estrés hiperosmótico sugiriendo que el NO estaría generando un soporte contráctil durante este tipo de estrés.

### 6. El soporte inotrópico durante el estrés hiperosmótico esta dado por vía GMPc/PKG.

Esta establecido que el NO puede modular la función contráctil a través de mecanismos dependientes e independientes de GMPc. Con el objetivo de evaluar la cascada de señalización por la cuál el NO genera soporte contráctil durante el estrés hiperosmótico realizamos experimentos en presencia y ausencia de ODQ (inhibidor de guanilato ciclasa) y KT5823 (inhibidor de PKG)



Resultados promedio que demuestran que inhibir GMPc y PKG exagera el EIN producido durante el estrés hiperosmótico sugiriendo que el NO estaría generando el soporte contráctil a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente.

## CONCLUSIONES

1. El estrés hiperosmótico promueve la liberación de NO y las isoformas de la NOS involucradas serían la nNOS y la eNOS.
2. La AMPK estaría sensando el estrés mecánico de la membrana produciendo así la activación de las isoformas de la NOS.
3. El estrés hiperosmótico cursa con un EIN.
4. El NO liberado provee soporte inotrópico durante el estrés hiperosmótico a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente.
5. La liberación de NO podría ayudar a sostener la función contráctil durante diferentes situaciones patológicas asociadas con el encogimiento celular como deshidratación severa, hiperglucemia, hiperlipidemia, diabetes, etc.
6. Los resultados sugieren que la disfunción contráctil que ocurre durante la disminución del volumen celular podría estar exacerbada en patologías asociadas con una baja disponibilidad de NO como por ejemplo HTA.

## REFERENCIAS

- 1- Ziolo MT, Kahr MJ, Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. J Mol Cell Cardiol 2008;45:625-632.
- 2- Gonano LA, Morell M, Burgos JI, Dulce RA, De Giusti VC, Aiello EA, Hare JM, Vila Petroff M. Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect. Cardiovasc Res 2014;104(3):455-466.