

Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr Horacio E. Cingolani
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET.



**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
INDUCIDA POR HINCHAMIENTO HIPOTÓNICO Y SU
POTENCIAL IMPACTO SOBRE EL MANEJO DEL CALCIO
INTRACELULAR, LA CONTRACTILIDAD MIOCÁRDICA Y LA
VIABILIDAD CELULAR.**

Lic. Malena Morell

Director: **Dr. Martín Vila Petroff**

2017

AGRADECIMIENTOS

Y así llegue tal vez a la sección más difícil y emotiva de escribir de una tesis...los agradecimientos...el momento de reconocer y agradecer a todas las personas que estuvieron al lado de uno, de una forma u otra, acompañando, apoyando y ayudando durante este proceso.

En primer lugar, a mi director Martín por permitirme trabajar en el CIC, por la confianza y apoyo desde el primer día que empecé. Por estar al pie del cañón con cada duda, sugerencia y corrección. Porque a pesar de tener miles de responsabilidades como director del centro, siempre se hizo un rato para escucharme y ayudarme.

A Luis...por su ayuda infinita, por su gran compañerismo, por transmitirme su pasión por la ciencia y todos sus conocimientos con una paciencia extrema. Por todos esos mates, charlas y música compartida. Por darme confianza siempre...te estaré infinitamente agradecida. Me tocó el mejor compañero del mundo.

A Ale y Caro por alegrarme todos los días...por todas las risas, charlas y mates compartidos...porque me dan ganas de venir todos los días a trabajar si es para compartirlo con ustedes! Los adoro...Orlos te voy a extrañar muchísimo.

A Nacho y Juli...por su ayuda particular en esta tesis...gracias!! Fueron un gran apoyo cotidiano en este proceso...Negra, llegaste en un momento muy particular al lab...gracias por tantas risas, mate, charlas y radio jaja!!No hubiese sido lo mismo sin vos.

A Ramirito!!! Que haría sin vos y todos tus conocimientos de informática y de la vida??!! Sos lo más! Gracias por siempre estar al pie del cañón para ayudarme.

A mis compañeros de almuerzo en el lab, por tantas anécdotas compartidas que hacen del día laboral un día más relajado: Gus, Giga, Romi, Maite, Cel, Juli, Sofi, Alex, Ale Yeves, Vero, Lucía. A Moni, Omar, Marisa, Luisita, Ale, Andrés, Irene, Marga, Ceci, Leti, Omin, Ema y realmente a todos los integrantes del CIC...por ese comentario de pasillo: ¿Y Male, como venís? Por las palabras de aliento, por hacerme sentir que se puede, porque todos contribuyeron, inclusive sin saberlo, en la realización de esta tesis. Somos muchos y no puedo nombrarlos a todos, pero lo saben y se los agradeceré a cada uno personalmente...pero gracias, gracias de verdad.

A toda mi familia...pero principalmente a mi familia "nuclear"...a ellos va dedicada esta tesis. Porque son mi gran sostén...por el amor incondicional. A mis papás por ser EL ejemplo de vida, a mis hermanos por bancarme durante todo este proceso y ayudarme tanto. Son todo para mí y tuve mucha suerte en esta vida por la familia que me tocó...los amo más que a nada en el mundo.

A Guille, por demostrarme tanto durante todo este tiempo, por ayudarme y sostenerme...por el amor, el respeto, la confianza y la paciencia...gracias!

A mis amigos...a las de Cipo, a los de la facu y a los de la vida...por los momentos compartidos y por las anécdotas generadas.

A todos ustedes...GRACIAS!

"La felicidad sólo es real cuando es compartida"

INDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 1 |
| LISTA DE FIGURAS | 4 |
| RESUMEN | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1. Estrés osmótico | 10 |
| 2. Óxido Nítrico | 12 |
| 3. Acoplamiento éxcito-contráctil en miocitos cardíacos. | 15 |
| 4. Estrés osmótico y su impacto sobre el AEC | 20 |
| 5. Óxido Nítrico y su impacto sobre el AEC | 23 |
| A. Vías de señalización del NO. | 23 |
| B. Isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) | 25 |
| B.1. Isoforma neuronal (nNOS o NOS1) | 25 |
| I. <i>Modificaciones post-traduccionales de nNOS</i> | 25 |
| II. <i>Efectos contráctiles del NO derivado de nNOS</i> | 26 |
| III. <i>Blancos y cascadas de señalización de nNOS</i> | 27 |
| B.2. Isoforma endotelial (eNOS o NOS3) | 29 |
| I. <i>Modificaciones post-traduccionales de eNOS</i> | 29 |
| II. <i>Efectos contráctiles del NO derivado de eNOS</i> | 30 |
| III. <i>Blancos y cascadas de señalización de eNOS</i> | 31 |
| B.3. Isoforma inducible (iNOS o NOS2) | 33 |
| I. <i>Efectos contráctiles del NO derivado de iNOS</i> | 34 |
| II. <i>Blancos y cascadas de señalización de iNOS</i> | 34 |
| 6. Muerte celular | 35 |
| A. Hinchamiento hipotónico y su impacto sobre la viabilidad celular | 35 |
| B. Óxido Nítrico y su impacto sobre la viabilidad celular | 36 |
| OBJETIVO GENERAL | 38 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 40 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 42 |
| 1. Aspectos generales | 43 |

| | |
|--|----|
| 2. Aislamiento de miocitos cardíacos | 43 |
| 3. Inducción de hinchamiento osmótico | 45 |
| 4. Medición de ancho/largo celular | 46 |
| 5. Medición de NO | 46 |
| 6. Estudio de la membrana celular y el sistema de túbulos t | 47 |
| 7. Registro de Ca^{2+} citosólico y acortamiento celular | 47 |
| 8. Estimación del contenido luminal de Ca^{2+} en el Retículo Sarcoplásmico | 49 |
| 9. Detección de liberación espontánea de Ca^{2+} del RS por microscopia confocal | 50 |
| 10. Inmunodetección por análisis de Western blot | 51 |
| 11. Estudio de la viabilidad celular durante el hinchamiento hipotónico | 52 |
| 12. Análisis Estadístico | 53 |
| FARMACOLOGÍA UTILIZADA | 54 |
| RESULTADOS | 56 |
| 1. El hinchamiento hipotónico promueve el aumento del ancho celular y la liberación de NO en miocitos ventriculares de rata. | 57 |
| 2. La isoforma nNOS sería la responsable de la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico. | 59 |
| 3. La isoforma nNOS del RS sería la responsable de la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico. | 61 |
| 4. La integridad del citoesqueleto es requerida para la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico. | 62 |
| 5. La quinasa dependiente de AMP (AMPK) media la activación de nNOS durante el hinchamiento hipotónico. | 65 |
| 6. El NO producido por la nNOS provee soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico. | 65 |
| 7. El soporte contráctil generado por el NO está dado por un mecanismo dependiente de GMPc. | 69 |
| 8. El soporte contráctil del NO durante el hinchamiento hipotónico es a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente. | 72 |
| 9. El soporte contráctil brindado por el NO no se debe a cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS. | 73 |

| | |
|---|----|
| 10. El soporte contráctil se debe a una mayor sensibilidad del RyR2 para un dado Ca^{2+} citosólico. | 76 |
| 11. El sitio Ser2808 de RyR2 se encuentra fosforilado a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente. | 78 |
| 12. Exponer a miocitos cardíacos a una solución hipotónica evita su muerte debida al paso del tiempo. El NO no estaría jugando ningún papel durante este proceso. | 80 |
| DISCUSIÓN | 83 |
| 1. El hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en miocitos ventriculares de rata. | 84 |
| 2. El hinchamiento hipotónico no afecta la integridad del sarcolema. | 86 |
| 3. El citoesqueleto sensoría la deformación de la membrana durante el hinchamiento hipotónico y, a través de la AMPK, lo traduciría en la activación de nNOS. | 87 |
| 4. Prevenir la liberación de NO exagera el efecto inotrópico negativo producido por hinchamiento hipotónico. | 88 |
| 5. El soporte contráctil está mediado a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG. | 89 |
| 6. El soporte contráctil brindado por el NO no se debe a cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS | 89 |
| 7. El soporte contráctil brindado por el NO se debe a una mayor sensibilización del RyR2 para un dado Ca^{2+} citosólico. | 90 |
| 8. Exponer a miocitos cardíacos adultos a SH mejora su supervivencia. | 92 |
| CONCLUSIONES | 95 |
| BIBLIOGRAFÍA | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclasa

AEC: acoplamiento éxcito-contráctil

Akt: proteína quinasa B

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Ca²⁺-CaM: complejo Ca²⁺-calmodulina

CaMKII: proteína quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina

DMSO: dimetilsulfóxido

DPHR: canal de Ca²⁺ tipo L o Receptor de dihidropiridinas

EIN: efecto inotrópico negativo

EIP: efecto inotrópico positivo

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GC: guanilato ciclasa

GCs: guanilato ciclasa soluble

GMPc: guanosín-3', 5'-monofostato cíclico

I_{Cl,swell}: corriente de cloro activada por hinchamiento

I/R: isquemia y reperusión

L-NAME: L-nitroarginina metil éster

MPG: N-(2-Mercaptopropionil)glicina

NTG: nitroguanidina

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

eNOS/NOS3: óxido nítrico sintasa endotelial

iNOS/NOS2: óxido nítrico sintasa inducible

nNOS/NOS1: óxido nítrico sintasa neuronal

NCX: intercambiador Na⁺/Ca²⁺

ODQ: 1H-[1,2,4] oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1

PA: potencial de acción

PDE: fosfodiesterasa

PKA: proteína quinasa A

PKG: proteína quinasa G

PLN: fosfolamban

PTPM: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

RS: retículo sarcoplásmico

RyR2: receptores de rianodina cardíaco

SEM: error estándar

SERCA2a: bomba ATPasa del RS

SH: solución hipotónica

SI: solución isotónica

TnI: troponina I

WT: wortmanina

LISTA DE FIGURAS

- Fig 1:** Diagrama del hinchamiento celular que se produce durante I/R.
- Fig 2:** Diagrama de la estructura de las NOS.
- Fig 3:** Diagrama simplificado de la estructura y activación de las NOS.
- Fig 4:** Esquema de la localización de las isoformas de la NOS.
- Fig 5:** Esquema de las proteínas involucradas en el manejo de Ca^{2+} durante el AEC de miocitos cardíacos.
- Fig 6:** Representación esquemática del RyR2 con sus sitios fosforilables y las quinasas responsables de su fosforilación.
- Fig 7:** Reconstrucción tridimensional del transitorio, ondas y chispas de Ca^{2+} .
- Fig 8:** Tabla donde se resumen los principales cambios en el AEC durante la exposición a SH durante períodos de tiempos cortos y prolongados.
- Fig 9:** Esquema de blancos y cascadas de señalización de nNOS.
- Fig 10:** Esquema de blancos y cascadas de señalización de eNOS.
- Fig 11:** Imágen de aislamiento de miocitos mediante digestión enzimática.
- Fig 12:** Imágen de campo claro de un miocito cardíaco.
- Fig 13:** Tabla donde se muestran las soluciones isotónica (SI) e hipotónica (SH).
- Fig 14:** Protocolo utilizado para la medición de la corriente del NCX.
- Fig 15:** Imágenes representativas de chispas y ondas de Ca^{2+} .
- Fig 16:** Imágenes representativas de un miocito cardíaco de rata vivo y uno muerto.
- Fig 17:** Imágenes representativas y resultados promedio del cambio en el ancho y largo celular (A) y de la fluorescencia de DAF-FM (B) durante el hinchamiento hipotónico
- Fig 18 A:** Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de inhibidores de las NOS en la fluorescencia de DAF-FM.
- Fig 18 B:** Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de inhibidores de las NOS en el ancho celular.
- Fig 18 C:** Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en miocitos de ratones NOS1KO y WT en la fluorescencia de DAF-FM.
- Fig 19:** Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI, SH y SH+ (RY+CPA) en la fluorescencia de DAF-FM.
- Fig 20:** Imágenes representativas (A) y resultados promedio (B) que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en la integridad del sistema de túbulos t y de la membrana celular en células cargadas con Di-8-ANNEPS.
- Fig 20 C:** Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI, SH y SH+COLCH en el ancho celular y la fluorescencia de DAF-FM.
- Fig 21:** Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SH y SH+DORSO en la fluorescencia de DAF-FM.
- Fig 22 A:** Registros continuos del efecto de SH en ausencia y presencia del inhibidor de las NOS (L-NAME) en el acortamiento celular de miocitos contrayéndose a 0.5 Hz.
- Fig 22 B:** Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos en SH en ausencia y presencia de L-NAME.

Fig 22 C: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos perfundidos con SH en ausencia y presencia de Nitroguanidina (NTG).

Fig 23: Trazos representativos y resultados promedio de los transitorios de Ca^{2+} y acortamiento celular durante el hinchamiento hipotónico en ausencia y presencia de L-NAME y NTG.

Fig 24: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos en SH y SH+MPG.

Fig 25: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos en SH+DMSO y SH+ODQ.

Fig 26: Trazos representativos y resultados promedio de acortamiento celular y transitorios de Ca^{2+} en ausencia y presencia de ODQ.

Fig 27: Resultados promedio mostrando el efecto de la perfusión con SH en el acortamiento celular y amplitud del transitorio de Ca^{2+} en ausencia y presencia del inhibidor de PKG (KT5823).

Fig 28: Panel A: Trazos representativos y resultados promedio que muestran la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína durante la perfusión con SI y con SH en ausencia y presencia de NTG. Panel B: Resultados promedio que muestran la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína durante la perfusión con SI y con SH en ausencia y presencia de ODQ.

Fig 29: Panel A: Registros típicos de la corriente del NCX inducida por cafeína durante la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de ODQ. Panel B: Resultados promedio del estudio de la integral de la corriente del NCX inducida por cafeína durante la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de ODQ.

Fig 30: Panel A: Imágenes típicas y resultados promedio de la frecuencia de chispas de Ca^{2+} durante la perfusión con SI+DMSO, SI+ODQ, SH+DMSO y SH+ODQ. Panel B: Imágenes típicas de ondas de Ca^{2+} y resultados promedio de la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{2+} durante la perfusión con SI+DMSO, SI+ODQ, SH+DMSO y SH+ODQ.

Fig 31: Western blots representativos y resultados promedio de la fosforilación del sitio Ser2808 de RyR2 en SI y SH en ausencia y presencia de ODQ y KT5823.

Fig 32: Panel A: Fotos representativas de la exposición a SI y SH al tiempo cero y al cabo de 10 horas sobre la viabilidad celular. Panel B: Resultados promedio mostrando el efecto de mantener a miocitos cardiacos durante 10 horas en SI y SH.

Fig 33: Resultados promedio mostrando el efecto de mantener a miocitos cardiacos durante 10 horas en SH y SH+L-NAME.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis realizado en un modelo celular tuvo como finalidad la comprobación de la hipótesis de que el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de Óxido Nítrico (NO).

Utilizando miocitos cardíacos de rata demostramos, a partir de la medición de la fluorescencia de DAF-FM, que el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO. La utilización de inhibidores como L-NAME (inhibidor inespecífico de las NOS), nitroguanidina (inhibidor específico de nNOS), wortmanina (inhibidor de eNOS) y rianodina+ácido ciclopiazónico (inhibidores de la función del retículo sarcoplasmático (RS)), y a través del uso de una maniobra no farmacológica que consistió en realizar los experimentos en miocitos de ratones que tienen deletado funcionalmente el gen NOS1 para la nNOS (NOS1KO) pudimos comprobar que la isoforma responsable en la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico era la nNOS ubicada en el RS.

Luego, con el objetivo de evaluar los mecanismos por los que se traducía la deformación de la membrana plasmática en la activación de la nNOS durante el hinchamiento hipotónico, evaluamos la fluorescencia de DAF-FM en presencia de colchicina (inhibidor de la polimerización de los microtúbulos) y de dorsomorfina (inhibidor de la proteína dependiente de AMP (AMPK)). En base a los resultados obtenidos pudimos comprobar que el citoesqueleto estaría sensando la deformación de la membrana y lo traduciría en la activación de AMPK con el consecuente aumento de la producción de NO mediado por la nNOS.

A través de la medición de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y el acortamiento celular de los miocitos cardíacos en ausencia y presencia de diferentes inhibidores como los antes mencionados para inhibir las NOS y además ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (GCs)) y KT5823 (inhibidor de la proteína quinasa G (PKG)) pudimos observar que el NO estaría generando soporte contráctil a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG durante el efecto inotrópico negativo (EIN) asociado al hinchamiento hipotónico.

Este soporte contráctil se debería a un mecanismo dependiente de GMPc/PKG que promueve que el sitio Ser2808 del receptor de rianodina (RyR2) esté más fosforilado provocando que este receptor esté más sensibilizado frente a un dado Ca^{2+} citosólico generándose un mayor transitorio de Ca^{2+} y así el soporte contráctil.

Por otro lado, observamos que exponer a los miocitos adultos a una solución hipotónica mejora su supervivencia y que el NO no estaría mediando este efecto.

INTRODUCCIÓN

1. Estrés osmótico

La osmolaridad de fluidos corporales está finamente regulada, por lo que en condiciones fisiológicas no es usual que las células cardíacas estén expuestas a gradientes osmóticos significativos [1]. Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas, el equilibrio se pierde y las células pueden quedar expuestas a estrés osmótico.

Las membranas de las células animales son altamente permeables al agua. De este modo, un desbalance entre las osmolaridades intra y extracelular se acompaña de movimiento de agua a través de dicha membrana con la consiguiente alteración del volumen celular [2]. Está descrito que los miocitos neonatales pueden regular su volumen a través de un mecanismo denominado RVD (por sus siglas en inglés: *regulatory volumen decrease*) [3]. Sin embargo, se sabe que este mecanismo está ausente en miocitos cardíacos adultos [4].

Las células cardíacas pueden sufrir hinchamiento hipotónico en condiciones tales como sepsis, shock diabético y, particularmente importante, en el contexto de isquemia y reperfusión (I/R).

Durante la isquemia miocárdica el metabolismo del corazón cambia desde un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico [5]. Esto produce que la presión osmótica en el tejido cardíaco aumente por la acumulación de metabolitos como creatinina (Cr), fosfato (Pi), nucleótidos de adenina (AMP, ADP), acyl coenzima A (acyl-CoA) y lactato. La producción inicial de Cr y Pi, metabolitos relativamente impermeables a membrana, causan el hinchamiento de miocitos durante la isquemia. Sin embargo, el metabolito que más se produce durante este proceso es el lactato, el cual, se equilibra entre los espacios intra y extracelular y no contribuye al hinchamiento en la isquemia. Sin embargo, durante el comienzo de la reperfusión es el metabolito que más contribuye en el aumento de la osmolaridad del tejido, que puede alcanzar un valor estimado de 360 mOsm [6]. El gradiente osmótico más significativo y que promueve el hinchamiento celular ocurre en la reperfusión donde el fluido extracelular hipertónico (360 mOsm) se lava con sangre con una osmolaridad normal (290 mOsm) arrastrando el lactato (Fig 1).

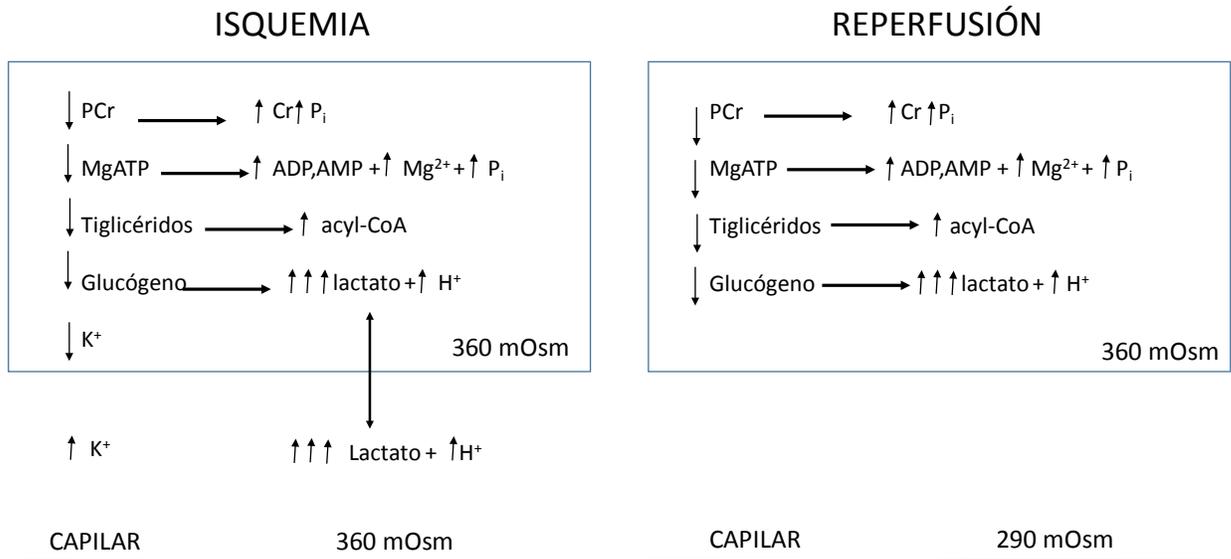


Fig 1: Diagrama del hinchamiento celular que se produce durante I/R. (Modificado de Vandenberg et al [7])

Actualmente, es conocido que el hinchamiento hipotónico provoca la dilución de los componentes intracelulares y la deformación tanto de las membranas celulares como del citoesqueleto subyacente. La deformación del citoesqueleto, es capaz de activar canales mecanosensibles y modificar el flujo de iones [8] conduciendo a un remodelamiento estructural, eléctrico e iónico de los miocitos resultando en una disminución de la contractilidad y de la viabilidad celular y, a un aumento de la actividad arritmogénica contribuyendo al deterioro de la función cardiaca durante la I/R [9]. Por lo tanto, conocer los mecanismos íntimos y las vías de señalización activadas por el hinchamiento hipotónico resulta de suma importancia para encontrar nuevos blancos moleculares que permitan reducir los daños asociados a I/R.

2. Óxido Nítrico

El Óxido Nítrico (NO) es un gas altamente difusible que contiene un átomo de nitrógeno unido covalentemente a un átomo de oxígeno con un electrón no apareado, el cual provoca que este compuesto pueda reaccionar con otros iones y moléculas rápidamente.

El NO puede ser producido a través de mecanismos independientes y dependientes de una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOSs).

La producción de NO independiente de las NOS se produce generalmente en situaciones patológicas e involucra la participación de nitritos circulantes como donantes de NO [10]. En tejidos hipóxicos está descripta la formación de NO es mediada por la enzima xantina óxido reductasa [11].

Las NOSs son una familia de enzimas que catalizan la síntesis de NO a partir del aminoácido L-arginina. Bioquímicamente, las NOSs se componen de un homodímero en el cual cada monómero está formado por un dominio oxigenasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal.

El dominio reductasa tiene sitios de unión para NADPH y las flavinas: FAD y FMN. Por su parte, el dominio oxigenasa posee sitios de unión para el grupo Hemo, L-arginina y tetrahidrobiopterina (BH₄). Entre estas dos regiones se encuentra el sitio de unión para calmodulina (CaM). Los dos monómeros se unen a través del grupo hemo en presencia de ZnS₄ y la unión de BH₄ al complejo promueve la formación de un dímero estable. El dominio reductasa transfiere electrones desde NADPH a través de las flavinas hacia el grupo hemo. Consecutivamente, la L-arginina es hidroxilada a NG-hidroxi-L-arginina seguido de la oxidación de este intermediario, a través de un electrón de NADPH, formando así L-citrulina y NO [12].

El complejo Ca²⁺-calmodulina (Ca²⁺-CaM) es esencial para vincular FMN y el grupo hemo asegurando una eficiente transferencia de electrones [13].

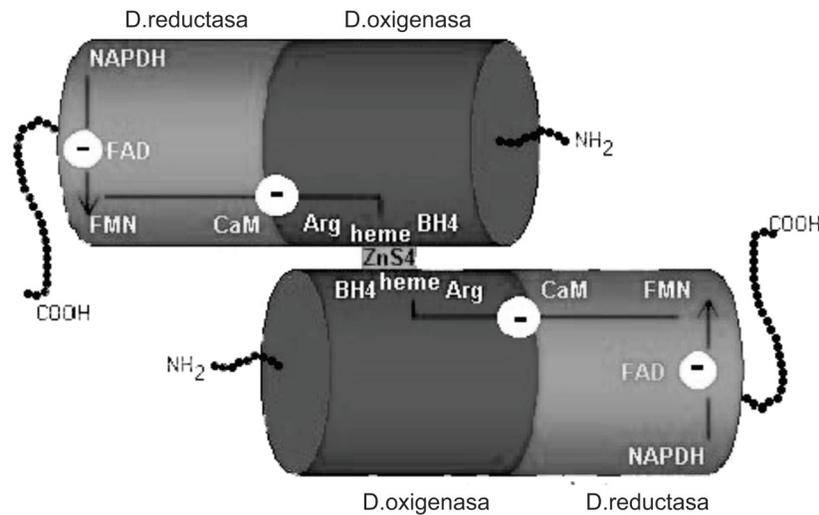


Fig 2: Diagrama de la estructura de las NOS (Modificado de Albrecht et al. [14]).

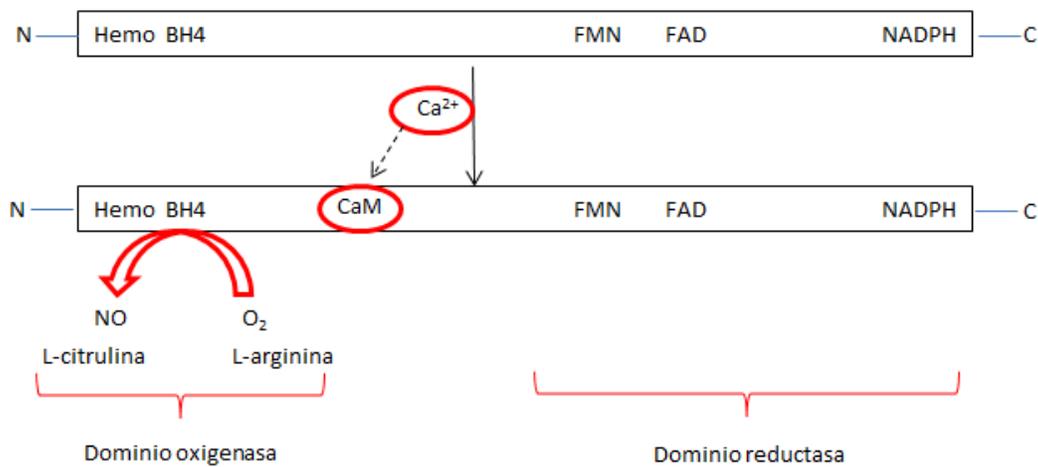


Fig 3: Diagrama simplificado de la estructura y activación de las NOS.

Los miocitos cardíacos expresan constitutivamente dos isoformas de la NOS: la NOS endotelial (eNOS: codificada por el gen NOS3) ubicada en caveolas y membrana y la NOS neuronal (nNOS: codificada por el gen NOS1) ubicada en el retículo sarcoplásmico (RS). Ambas enzimas producen bajos niveles de NO a partir de L-arginina y mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} -calmodulina [15].

La otra isoforma citosólica, la NOS inducible (iNOS codificada por el gen NOS2), se encuentra ausente en corazón sano pero se expresa durante la inflamación mediada por factores de transcripción inducibles por citoquinas [16, 17]. Una vez que se expresa

produce, bajo un mecanismo independiente de Ca^{2+} , mayor cantidad de NO y a una velocidad mayor comparado con las otras isoformas. El NO producido por esta isoforma induce disfunción cardíaca [18].

La mitocondria también se caracteriza por la presencia de NOS (mtNOS). Algunos autores postulan que las isoformas presentes serían la iNOS y la eNOS [19, 20] mientras que otros autores afirman que serían la nNOS y eNOS [21, 22].

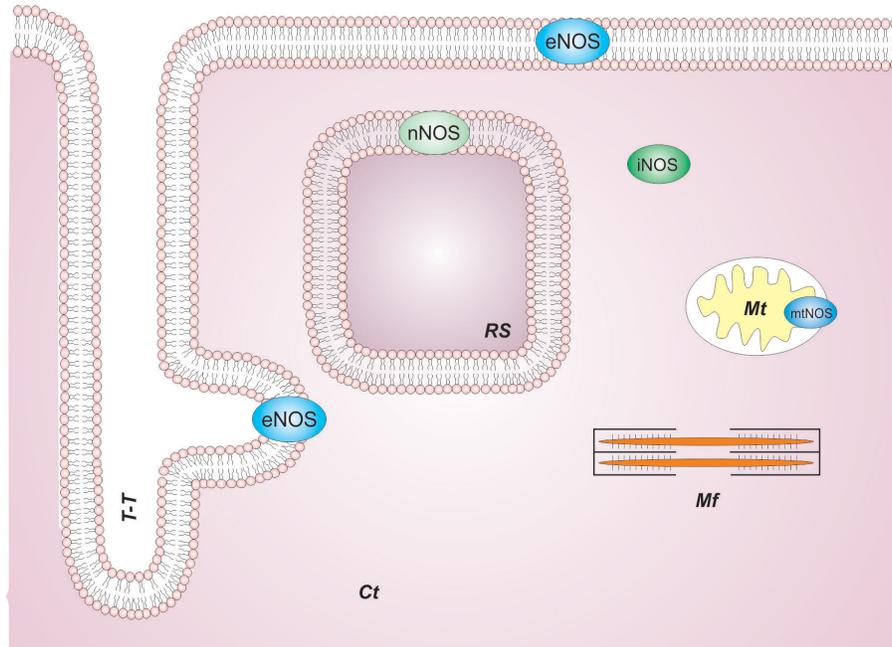


Fig 4: Esquema donde se muestra la localización de las diferentes isoformas de la NOS. T-T: túbulo t, Ct: citosol, Mf: miofilamentos, RS: retículo sarcoplásmico, Mt: mitocondria.

El NO es una molécula de señalización altamente reactiva y un importante modulador de la función miocárdica [23]. Ejerce múltiples efectos sobre la función cardíaca a través de acciones directas sobre los cardiomiocitos y de acciones indirectas como consecuencia de sus efectos vasculares.

En cardiomiocitos y corazones aislados las concentraciones de NO fluctúan durante el ciclo cardíaco alcanzando concentraciones máximas al final de la diástole, inversamente a lo que sucede con la concentración de Ca^{2+} intracelular. Además, la liberación de NO disminuye cuando lo hace la precarga y aumenta marcadamente con la noradrenalina sugiriendo que el NO desempeña un papel importante en la regulación de la función cardíaca [23].

Esta molécula tiene efectos sobre el manejo del Ca^{2+} intracelular y la respuesta inotrópica. Se han descrito efectos inotrópicos positivos a dosis bajas ($1 \mu\text{M}$) y negativos a dosis altas ($>30 \mu\text{M}$) [24].

Previamente, se demostró que el estrés mecánico promueve la liberación de NO [25-27]. Sin embargo, si el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en miocitos cardíacos y si éste tiene algún impacto sobre las alteraciones de la función cardíaca asociadas con este tipo de estrés no ha sido aún examinado.

Debido al impacto que tienen el hinchamiento hipotónico y el NO sobre la contractilidad miocárdica, en la siguiente sección se describirá el mecanismo de acoplamiento éxcito-contráctil para luego poder abordar en mayor profundidad los mecanismos por los cuales el hinchamiento hipotónico y el NO pueden modular la contractilidad.

3. Acoplamiento éxcito-contráctil en miocitos cardíacos.

La contracción de cada miocito es consecuencia de un conjunto de fenómenos que comienzan con la despolarización de la membrana celular y culmina a nivel de los miofilamentos, con la contracción (Fig 5). Este proceso, que tiene como principal protagonista al ión Ca^{2+} , se denomina acoplamiento éxcito-contráctil (AEC). La llegada de un potencial de acción (PA) provoca la entrada de Na^+ a través de los canales rápidos de Na^+ . A partir de los -40 mV , la apertura de los canales lentos de Ca^{2+} tipo L o receptores de Dihidropiridinas (DPHR), permite la entrada de Ca^{2+} a la célula (corriente denominada: $I_{\text{Ca,L}}$) y configura la meseta del PA. La entrada de Ca^{2+} por estos canales promueve la liberación de mayor cantidad de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (RyR2) ubicados en el RS, mecanismo conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (en inglés *calcium induced-calcium release* [28]). La liberación de Ca^{2+} a través de los RyR2 se suma temporal y espacialmente, dando lugar a un aumento transitorio y global del Ca^{2+} citosólico conocido como transitorio de Ca^{2+} o *Calcium transient*. Este aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico determinará la interacción entre las proteínas contráctiles: actina y miosina permitiendo la contracción del miocito.

La contracción ocurre a nivel de las miofibrillas, que son diferenciaciones celulares adaptadas específicamente a la función contráctil y son las efectoras finales del AEC. Las estricciones que muestran los miofilamentos se deben a la repetición a lo largo de los mismos de la unidad contráctil del músculo: el sarcómero. El mismo, está constituido por

filamentos gruesos y finos interconectados entre sí. Los filamentos gruesos ocupan el centro del sarcómero y están compuestos fundamentalmente por miosina. Las “colas” de las moléculas de miosina forman el cuerpo del filamento grueso, en tanto que las “cabezas” se dirigen hacia afuera del mismo y constituyen los puentes cruzados. Estos puentes, interactúan con la actina, principal componente de los filamentos finos, y, a través de la energía química derivada de la hidrólisis del ATP, “tiran” de los filamentos finos, lo que provoca el deslizamiento de éstos sobre los gruesos provocando el acortamiento del sarcómero.

Los filamentos finos están formados, además, por proteínas regulatorias que constituyen el complejo tropomiosina-troponina. La troponina es un heterotrímero, formado por la troponina I (TnI), cuya función es la de inhibir la interacción actina-miosina, la troponina T (TnT), que une la troponina a la tropomiosina y la troponina C (TnC), que tiene la capacidad de unirse al Ca^{2+} . Cuando el Ca^{2+} aumenta en el citosol, se une a la TnC provocando un cambio conformacional del complejo troponina-tropomiosina, que rota y deja libre el sitio de la actina que interactúa con la miosina, permitiendo la unión de ambas y, por lo tanto, la contracción.

Posteriormente, para que el corazón cumpla eficazmente con su función de bomba, debe ocurrir la relajación mecánica de los cardiomiocitos, que permite el llenado diastólico de las cámaras cardíacas. Esto requiere de la reducción en la concentración citosólica de Ca^{2+} , que ocurre mediante las siguientes vías: el Ca^{2+} es recapturado fundamentalmente por la Ca^{2+} -ATPasa del RS (SERCA2a) y, en menor proporción, es extruido por el Intercambiador Sodio-Calcio (NCX) y por la Ca^{2+} ATPasa de membrana (PMCA).

El secuestro de Ca^{2+} hacia el lumen del RS mediado por SERCA2a se encuentra sujeto a regulación, mediante un mecanismo que depende de la interacción entre SERCA2a y una proteína regulatoria llamada Fosfolamban (PLN). La recaptura de Ca^{2+} resulta inhibida cuando ambas proteínas se encuentran en interacción física [29]; aunque este fenómeno es reversible dado que cuando PLN es fosforilada, la interacción entre ambas proteínas es menos estable. Esta proteína regulatoria puede ser fosforilada en tres sitios diferentes: en el residuo Serina 16 (Ser16) por la proteína quinasa A (PKA) y por la proteína quinasa G (PKG), en el residuo Treonina 17 (Thr17) por la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina II (CaMKII) y en Serina 10 (Ser10) por la proteína quinasa C (PKC). La fosforilación en los sitios Thr17 y Ser16 son mediadores clave en los efectos inotrópicos positivos y relajantes de la estimulación β_1 -adrenérgica [30-32].

En cuanto al NCX, éste es un transportador de membrana electrogénico por lo que la dirección con la que funciona instante a instante durante el ciclo cardíaco depende del potencial de membrana y del gradiente electroquímico de ambos iones [33]. Durante la diástole, funciona en modo directo extruyendo 1 ión Ca^{2+} e ingresando 3 iones Na^{+} a la célula pero, este transportador también puede funcionar en modo reverso introduciendo Ca^{2+} y extruyendo Na^{+} en las mismas proporciones que en el modo directo.

Además, existe otra proteína integral de membrana denominada PMCA (por sus siglas en inglés: *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) que tiene la capacidad de transportar Ca^{2+} en contra de su gradiente electroquímico desde el citoplasma hacia el espacio extracelular y es activada por el complejo Ca^{2+} -CaM [34].

Las características del manejo del Ca^{2+} intracelular durante el AEC determinarán el estado inotrópico del músculo cardíaco, y sus alteraciones ocurridas a nivel celular son causa de disfunción contráctil [35], hipertrofia cardíaca [36], arritmias [37] y muerte celular [38].

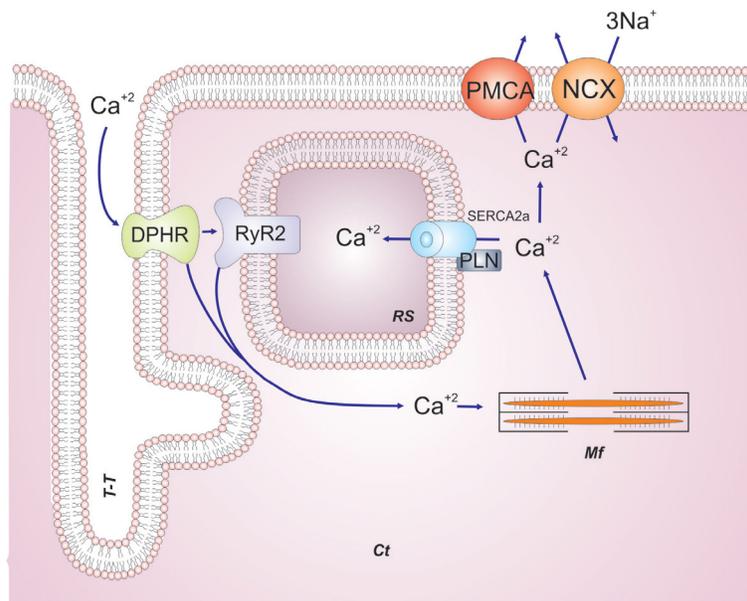


Fig 5: Esquema donde se muestran las principales proteínas involucradas en el manejo de Ca^{2+} durante el AEC de miocitos cardíacos. T-T: túbulo t, Ct: citosol, Mf: miofilamentos, RS: retículo sarcoplásmico, DPHR: receptor de dihidropiridina o canal de Ca^{2+} tipo L, PLN: fosfolamban, RyR2: receptor de rianodina, PMCA: Ca^{2+} ATPasa de membrana, NCX: intercambiador sodio-calcio.

Resulta de interés para poder comprender los resultados que se presentarán más adelante describir con mayor detalle una de las proteínas de mayor relevancia en el proceso de AEC: los receptores de rianodina.

Los receptores de rianodina (RyR2) son proteínas integrales que se insertan en la membrana del RS conformando grupos (en inglés “clusters”) de 30 a 250 RyR2 [39]. Actúan como canales de Ca^{2+} permitiendo la salida de este ión hacia el citosol. Son complejos macromoleculares homo-tetraméricos compuestos por 4 subunidades de 565 kDa cada una.

La probabilidad de que estos canales se abran permitiendo el flujo de Ca^{2+} es afectada por su interacción con cationes intracelulares (el mismo ión Ca^{2+} , además de Mg^{2+} y H^+) y proteínas tales como Sorcina, Calstabin-2, Triadina, Juntina y Calsecuestrina [40, 41].

Adicionalmente, su función es afectada por modificaciones post-traduccionales tales como nitrosilación, oxidación o fosforilación en residuos aminoacídicos específicos [42, 43]. Hasta el momento tres residuos específicos de Serina (Ser) han sido descritos como blancos fosforilables: Ser2808, Ser2030 y Ser2814. La proteína quinasa A (PKA) fosforila a los sitios Ser2808 [44] y Ser2030 [45], la proteína dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) fosforila Ser2808 [46] y Ser2814 [47, 48], mientras que la proteína quinasa G (PKG) es capaz de fosforilar al residuo Ser2808 *in vitro* [49]. En conjunto, estos residuos fosforilables se encuentran en la cara citosólica del canal, conformando la “zona caliente” o lo que en inglés se denomina “*phosphorylation hot spot*” y su fosforilación aumenta la probabilidad de apertura del canal (Fig 6).

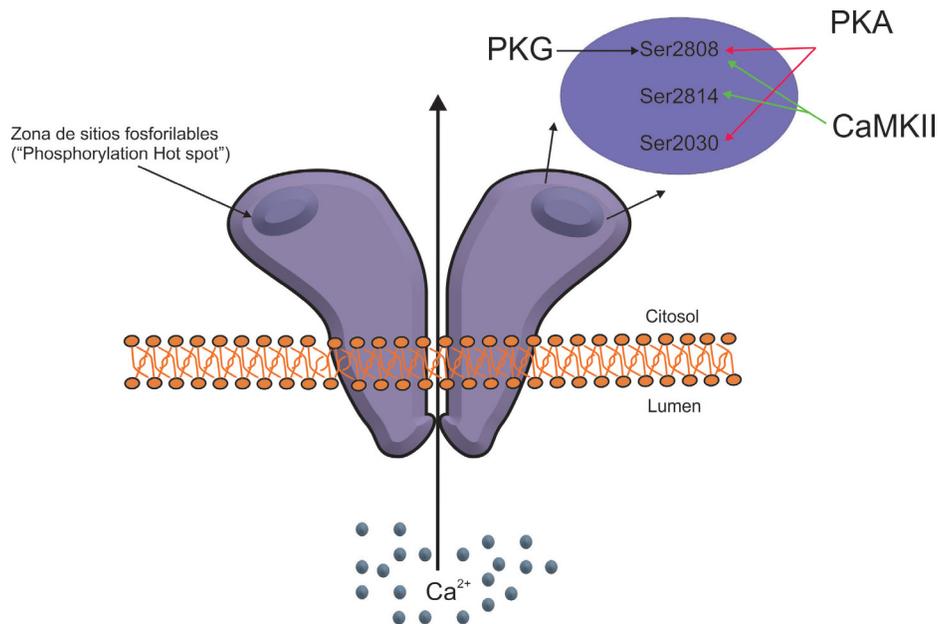


Fig 6: Representación esquemática del RyR2 con sus sitios fosforilables y las quinasas responsables de su fosforilación.

Durante el AEC, la apertura de los RyR2 es activada por la unión de Ca^{2+} a su cara citosólica, aunque existe una región sensible a Ca^{2+} en su cara luminal [49, 50]. La liberación global de Ca^{2+} hacia el citosol (transitorio de Ca^{2+}) es la resultante de un conjunto de eventos locales de liberación que ocurren en forma sincronizada mediante el proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} [28].

Cada uno de estos eventos locales corresponde a la liberación de Ca^{2+} desde un “cluster” de RyR2. Una fracción importante de estos “clusters” co-localiza con grupos de DPHR, formando en conjunto unidades llamadas Díadas (en inglés: “*couplons*”) [51].

La actividad de los “clusters” de RyR2 puede ser monitoreada por microscopía confocal registrando la liberación de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol, que será detectada como una chispa de Ca^{2+} (en inglés: “*Ca}^{2+}* spark”) dado su carácter local y transitorio [52]. La ocurrencia de chispas de Ca^{2+} no solo se dan en forma sincronizada durante el AEC, sino que también ocurre como un evento estocástico durante el período diastólico y permite la pérdida o fuga de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol (en inglés: “*SR Calcium leak*”) [53]. La pérdida diastólica de Ca^{2+} es mayor en condiciones de sobrecarga de Ca^{2+} dentro del RS [54], debido a un fenómeno que algunos investigadores denominan “Liberación de Calcio inducida por sobrecarga” (SOIRC: *Store Overload-Induced Calcium Release*) [55, 56]. Este fenómeno puede comprenderse teniendo en cuenta que los RyR2 poseen una región sensible a la concentración luminal de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$), la cual es capaz de aumentar su probabilidad de apertura en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del RS [40, 57].

En condiciones de sobrecarga de Ca^{2+} también se da otro tipo de fenómeno basado en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . En este caso, la salida de Ca^{2+} a través de un cluster de RyR2 puede, al difundir hacia el espacio adyacente, activar o “reclutar” a los clusters vecinos [58]. De este modo, la apertura sucesiva de los RyR2 permite la propagación de una onda de liberación lenta de Ca^{2+} hacia el citosol (en inglés: “*Ca}^{2+}* wave”) [59].

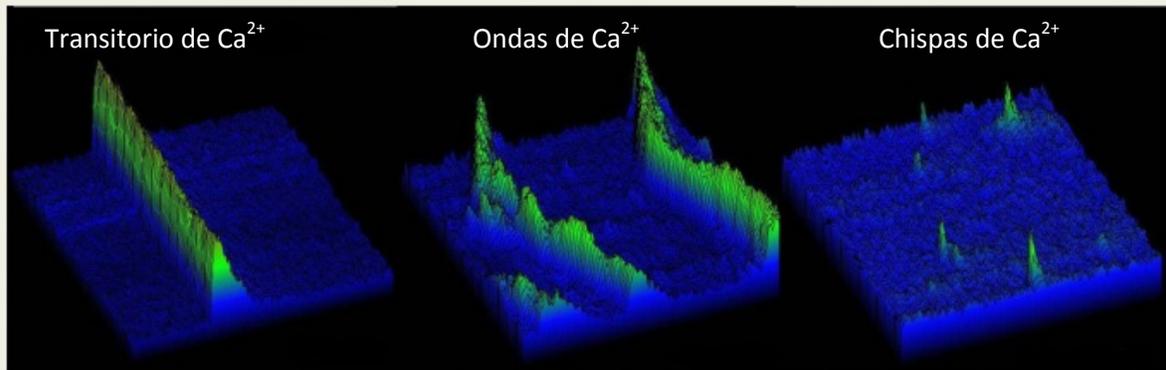


Fig 7: Reconstrucción tridimensional de registros de fluorescencia adquiridos mediante el barrido lineal realizado por microscopía confocal en miocitos cardíacos de rata incubados con el indicador Fluo-3 (Modificado de Gonano et al. [60]).

4. Estrés osmótico y su impacto sobre el AEC

Las cardiomiopatías, enfermedades del músculo cardíaco, se caracterizan por cursar con disfunción contráctil y representan en la actualidad un problema para la sociedad. Durante algunas de estas patologías, los miocitos cardíacos están, entre otras cosas, expuestos a estrés osmótico [61].

Pequeños aumentos en el volumen celular están asociados con una significativa disfunción contráctil sistólica. Por ejemplo, un 2.6% de aumento de agua en el miocardio producida por soluciones hipotónicas se asocia con un 43% de disminución en el funcionamiento del ventrículo izquierdo [62].

El hinchamiento celular causa la deformación de membranas celulares y el citoesqueleto subyacente y provoca la dilución de contenidos intracelulares (a diferencia de otros tipos de deformación de membrana como es por ejemplo el estiramiento axial) representando una de las principales amenazas para el corazón debido a que en forma aguda promueve el desarrollo de disfunción contráctil y arritmias fatales [9, 63] y crónicamente aumenta el tamaño de infarto debido a una acelerada necrosis celular. El efecto pro-arritmogénico característico del hinchamiento se debe en parte a alteraciones en las propiedades electrofisiológicas [63].

Brette et al. estudiaron en detalle el hinchamiento hipotónico y las consecuencias que tiene sobre el AEC. En miocitos de ratas observaron que el hinchamiento hipotónico produce una modulación bifásica del acortamiento celular y del Ca²⁺ intracelular que coinciden con cambios bifásicos en la duración del potencial de acción cardíaco (DPA)

provocando inicialmente un efecto inotrópico positivo (EIP) y luego un efecto inotrópico negativo (EIN). Estos efectos en el AEC generados debido a la perfusión con solución hipotónica (SH) fueron estudiados durante períodos cortos (1 min) y largos (7-10 min) de tiempo [64].

Inicialmente, durante el período corto de exposición a SH, observaron un aumento significativo en la DPA sin cambios en el potencial de membrana en reposo. También observaron un aumento en la amplitud de contracción y en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} comparado con la perfusión con solución isotónica (SI), mientras que, la amplitud de la corriente de Ca^{2+} tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) se encontraba significativamente reducida. Evaluaron el contenido de Ca^{2+} del RS a través de la maniobra del pulso de cafeína [65] y no observaron cambios con respecto a SI. Sin embargo, la liberación fraccional de Ca^{2+} del RS (FR) estaba aumentada aproximadamente un 10%. FR es una medida que indica eficiencia del AEC y se calcula como la fracción de Ca^{2+} liberada en un latido (debido a la liberación de Ca^{2+} por la $I_{\text{Ca,L}}$) sobre la amplitud del transitorio de Ca^{2+} producido por un pulso de cafeína (que indica máxima disponibilidad de Ca^{2+} en el RS) [66]. Es decir, la amplitud de contracción durante el primer minuto esta aumentada debido a un aumento en la eficiencia de acople entre el Ca^{2+} que ingresa por la $I_{\text{Ca,L}}$ y el que se libera desde el RS a través de los RyR2.

Contrariamente, la exposición prolongada a una SH provoca la reducción de la DPA, de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y por ende de la amplitud de contracción. La reducción en la DPA puede deberse a una disminución mayor de $I_{\text{Ca,L}}$ que se observa durante la exposición prolongada a SH y en parte, a la activación de una corriente repolarizante denominada corriente de cloro activada por hinchamiento ($I_{\text{Cl;Swell}}$).

La corriente de Cl^- rectificadora-repolarizante ($I_{\text{Cl;Swell}}$) se activa por hinchamiento y estiramiento mecánico de miocitos cardíacos y es un importante regulador de la función cardíaca en situaciones fisiológicas y patológicas. $I_{\text{Cl;Swell}}$ modula la actividad eléctrica cardíaca, la regulación del volumen de los miocitos neonatales y la apoptosis [67]. El Cl^- tiene un potencial de equilibrio (E_{Cl}) de -60 mV por lo tanto a potenciales de membranas menos negativos este ión tiende a ingresar a la célula contribuyendo a la repolarización de la membrana y por ende, al acortamiento de la DPA [68].

Durante la exposición prolongada a SH también se evaluó el contenido de Ca^{2+} del RS y se observó una tendencia, aunque no significativa, a que éste se encuentre disminuido. En cuanto a la FR, ésta se encuentra disminuida aproximadamente en un 20% con

respecto a la perfusión con SI y se debería a la exacerbada reducción en la $I_{Ca,L}$ y a la tendencia en la disminución de la carga de Ca^{2+} del RS y por ende a una menor disponibilidad de Ca^{2+} para la contracción.

Los efectos bifásicos observados por Brette et al. en la DPA y en la modulación del acortamiento y del Ca^{2+} intracelular [64] son consistentes con los observados por Vandenberg et al. [7] en miocitos ventriculares de cobayo y por Li et al. [69] en miocitos ventriculares de conejo.

Tomados en conjunto, estos antecedentes demuestran que la exposición prolongada a SH promueve un EIN asociado a una disminución en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

| | EXPOSICIÓN A SH POR UN CORTO PERÍODO DE TIEMPO (1 min) | EXPOSICIÓN A SH POR UN PERÍODO DE TIEMPO PROLONGADO (7-10 min) |
|--|--|--|
| DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCION (DPA) | ↑ | ↓ |
| AMPLITUD DE CONTRACCIÓN | ↑ | ↓ |
| AMPLITUD DEL TRANSITORIO DE Ca^{2+} | ↑ | ↓ |
| CORRIENTE DE Ca^{2+} TIPO L ($I_{Ca,L}$) | ↓ | ↓ ↓ |
| CONTENIDO DE Ca^{2+} DEL RS | ↔ | tendencia a ↓ |
| LIBERACIÓN FRACCIONAL DE Ca^{2+} DEL RS | ↑ | ↓ |

Fig 8: Tabla donde se resumen los principales cambios en el AEC durante la exposición a SH durante períodos de tiempos cortos y prolongados. La flecha hacia abajo significa que disminuye, hacia arriba que aumenta y la horizontal que no cambia con respecto a la exposición a SI.

5. Óxido Nítrico y su impacto sobre el AEC

A. Vías de señalización del NO

Los efectos del NO en el corazón están mediados por al menos dos mecanismos de acción: dependientes e independientes de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) [70].

Los efectos **dependientes de GMPc** resultan de la unión del NO a la guanilato ciclasa soluble (GCs) promoviendo su activación. Esto aumenta la producción de GMPc que puede activar a la proteína quinasa G (PKG) o regular la actividad de fosfodiesterasas (PDE2, PDE3 y PDE5). Las PDEs 2 Y 5 son activadas por GMPc mientras que la PDE3 es inhibida por GMPc.

Vila Petroff et al. encontraron aumentos significativos de GMPc usando un conocido donante de NO: SNAP [24]. Además, en otro estudio se demostró que la aplicación de un análogo del GMPc (8-bromo-GMPc) producía un efecto inotrópico negativo atribuido a una disminución en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles debido a la fosforilación de la Tnl mediada por PKG [71].

Por otro lado, esta descrito que los donantes de NO y el GMPc pueden reducir la entrada de Ca^{2+} a través de los DPHR [72]. Los mecanismos por los cuales el aumento del GMPc inducido por NO podrían modular la corriente de Ca^{2+} tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) son controvertidos. La $I_{\text{Ca,L}}$ podría estar disminuida a través de un mecanismo que involucra el descenso de los niveles basales del AMP cíclico (AMPc) debido a la activación de la PDE2 dependiente de GMPc [73]. Por otro lado, se ha demostrado que el GMPc podría modular la actividad de $I_{\text{Ca,L}}$ mediante un mecanismo que no involucra cambios en el AMPc intracelular [74].

Interesantemente, un estudio demuestra que la inhibición de PDE5 disminuye la contractilidad cardíaca luego de un estímulo β -AR en ratones WT pero no en ratones que tienen delecionada funcionalmente la eNOS ($\text{NOS3}^{-/-}$) [75]. Por otro lado, Ziolo et al. demostraron que la inhibición de PDE5 disminuiría la $I_{\text{Ca,L}}$ a través del aumento de la actividad de PKG [76] sugiriendo que eNOS y PDE5 co-localizan implicando a GMPc como una molécula de señalización de eNOS.

Contrariamente a lo expuesto, esta descrito que bajas concentraciones de GMPc (0,1 a 10 μM) o del donante de NO (0,1-10mM) inducen la estimulación de la $I_{\text{Ca,L}}$ y que esto se debía a la inhibición GMPc-dependiente de la PDE3 favoreciendo la estimulación AMPc-PKA dando como resultado una mayor liberación de Ca^{2+} desde el RS y un EIP [24, 77].

En lo que respecta al RyR2, está descrito que PKG es capaz de fosforilar a este canal *in vitro* [49, 78] pero si esto forma parte de una cascada fisiológica *in vivo* hasta el momento es desconocido. Por otro lado, el GMPc a través de la inhibición o activación de PDE puede controlar la concentración de AMPc y por ende la fosforilación de este canal a través de PKA [78].

En cuanto a PLN, está descrito que podía ser fosforilada a través de un mecanismo GMPc-dependiente en el sitio Ser16 aumentando la afinidad de la SERCA2a por Ca^{2+} [79, 80].

Por su parte, los efectos dependientes de GMPc sobre el NCX parecerían ser activadores. Se ha demostrado que la densidad de la corriente del NCX (I_{NCX}) aumenta por GMPc en miocitos aórticos de rata [81] y en células neonatales cardíacas de murinos [82].

Los mecanismos **independientes de GMPc** ocurren principalmente vía S-nitrosilación que consiste en la conversión de grupos tiol (-SH), incluyendo residuos de cisteína de proteínas, para formar S-nitrosotioles (SNO). Por otro lado, bajos niveles de NO pueden aumentar el AMPc a través de la activación de adenilato ciclasa (AC) independientemente de GMPc e inducir una respuesta contráctil positiva [24].

Además, el NO puede reaccionar con otras especies reactivas del oxígeno o nitrógeno interrumpiendo su señalización fisiológica y llevando potencialmente a la producción de otras moléculas caracterizadas por ser reactivas y tóxicas como por ejemplo peroxinitrito ($ONOO^-$) afectando la contractilidad miocárdica [83].

La oxidación y S-nitrosilación de tioles y proteínas han sido implicadas en la regulación del AEC. Primeramente se demostró una inhibición reversible de $I_{Ca,L}$ por agentes modificadores de sulfidrilos dando origen a la hipótesis de que una S-nitrosilación mediada por NO o por donantes del mismo podría tener efectos similares sobre $I_{Ca,L}$ [84]. Posteriormente, se demostró la activación reversible de los canales DPHR a través de la S-nitrosilación concluyendo que el estado redox del sarcolema puede modular $I_{Ca,L}$ [85].

Por otro lado, está demostrado que cuando el NO es administrado como gas, como S-nitrosotioles o como compuestos libres de sulfuro puede oxidar o nitrosilar tioles regulatorios en el RyR2 resultando en la apertura de estos canales y liberando Ca^{2+} del RS. Además, estos efectos pueden ser revertidos por agentes reductores [86]. Otro estudio realizado por Xu et al. demostró que los RyR2 pueden ser activados

reversiblemente cuando son S-nitrosilados, mientras que un aumento de estrés oxidativo produce la inactivación irreversible [87].

Hay controversias en los efectos que tiene el NO sobre la contractilidad cardíaca pero ésto podría deberse a la diferente ubicación que tienen las isoformas de la NOS [76, 88] y a las distintas vías de señalización involucradas. Además, hay estudios que determinaron que los distintos efectos contráctiles podrían deberse a las concentraciones de NO [24, 89].

En la siguiente sección se describirán con mayor profundidad las diferentes isoformas de la NOS abarcando su forma de activación, los efectos sobre la contractilidad cardíaca y las vías de señalización.

B. Isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS).

Como se mencionó previamente el NO es sintetizado a través del clivaje de L-arginina en L-citrulina a través de tres isoformas distintas de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) dentro del miocardio. La isoforma neuronal (nNOS o NOS1) y la endotelial (eNOS o NOS3) se expresan constitutivamente en miocitos cardíacos y producen NO a través de la regulación por calcio y calmodulina (Ca^{2+} -CaM). Actualmente se sabe que, a pesar de que el NO es una molécula de señalización altamente difusible, la señalización de estas dos isoformas está compartimentalizada y el NO producido por estas isoformas modula de manera diferente la función cardíaca. Por otro lado, la isoforma inducible (iNOS o NOS2) solo se expresa durante respuestas inflamatorias y no requiere de Ca^{2+} para su activación.

B.1. Isoforma neuronal (nNOS o NOS1)

La nNOS fue descrita originalmente en cerebro [90] pero se sabe que se expresa constitutivamente en miocitos cardíacos y se ha demostrado que se localiza en el RS y que co-inmunoprecipita con RyR2 en condiciones fisiológicas [87, 88].

La actividad de está enzima esta sujeta a regulación a través de su fosforilación.

I. *Modificaciones post-traduccionales de nNOS*

Hay diversos estudios en células no cardiacas donde se demuestra la fosforilación de nNOS en el sitio Ser1412 a través de la activación de tres proteínas quinasas: Akt/PKB, CaMKII y PKA, que promueven el aumento en la producción de NO [91-95].

Rodríguez et al. describieron que durante una isquemia renal se fosforila el sitio Ser1417 de la nNOS promoviendo la producción de NO [96]. Por otro lado, Niu et al. demostraron en corazones de ratones C57BL6/J la fosforilación del sitio Ser1417 y la desfosforilación de Ser847 debido a la exposición a un agonista β_3 -adrenérgico. La fosforilación de Ser1417 promueve la producción de NO sugiriendo a este sitio como un sitio activador en células cardíacas, contrariamente a lo que sucede con el sitio Ser847 [97].

En células no cardíacas también se demostró que la fosforilación de nNOS por CaMKI, CaMKII y PKC en los sitios Ser847, Ser741 y Thr296 estarían asociadas con una reducción en la actividad de esta isoforma y promoverían una menor producción de NO [92, 93, 95, 98-100].

Por otro lado, está descripto que la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) fosforila a nNOS en numerosos tipos celulares [101-103] y que esta quinasa puede ser activada por estimulación mecánica en músculo cardíaco [104, 105]. En un trabajo reciente, se demostró en miocitos cardíacos de ratones, que la AMPK, activada por estimulación mecánica, promueve la fosforilación de nNOS en el sitio Ser1412 provocando un aumento en la producción de NO [106].

Recientemente, en la línea celular de cardiomiocitos HL-1, se demostró que ante la presencia de un agente oxidante (H_2O_2), AMPK se activa y esta quinasa promueve la fosforilación de nNOS [107].

II. Efectos contráctiles del NO derivado de nNOS

La relación fuerza-frecuencia (FFR) hace referencia a la respuesta inotrópica o contráctil ante un aumento en la frecuencia cardíaca. Esta relación puede ser negativa si hay una disminución de la respuesta inotrópica al aumento de frecuencia o positiva si sucede lo contrario. En experimentos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la FFR está en parte modulada por la señalización de la nNOS y que cuando esta isoforma está delecionada funcionalmente en ratones ($NOS1^{-/-}$) éstos poseen una FFR disminuida (tanto la contracción como la relajación) [23, 88, 108].

Está demostrado también que la ausencia de esta isoforma conduce a una reducción en la respuesta contráctil frente a un estímulo β -adrenérgico [109] y esto podría deberse a un menor acortamiento celular asociado con una disminución en el transitorio de Ca^{2+} [108].

Si bien los mecanismos no han sido del todo dilucidados, la nNOS es considerada cardioprotectora. Se ha observado en ratones NOS1^{-/-} que luego de un infarto de miocardio se caracterizan por una mayor hipertrofia y dilatación de ventrículo izquierdo, como así también por un aumento en la mortalidad [110, 111].

III. *Blancos y cascadas de señalización de nNOS*

La localización de la nNOS en el RS sugiere que los canales iónicos y los transportadores involucrados en la regulación del ciclado de Ca²⁺ en el miocito sean blancos en la señalización del NO producido por esta isoforma.

-DPHR

Sears et al. demostraron en ratones NOS1^{-/-} y a través de la inhibición farmacológica de la nNOS, que esta isoforma reduce la contracción y el transitorio de Ca²⁺ en miocitos aislados de ventrículo izquierdo debido a que disminuye la I_{Ca,L} indicando que la nNOS juega un importante rol en la regulación de la contractilidad a través de la regulación de los flujos de Ca²⁺ [112]. Gallo et al. sugieren que el NO derivado de la nNOS podría estar afectando I_{Ca,L} a través de un mecanismo GMPc-dependiente [113]. En concordancia con esto, un análogo de GMPc, el 8-Br-GMPc, produjo la inhibición de I_{Ca,L} en miocitos de ventrículo derecho de hurón [85] y otro estudio en miocitos ventriculares de rata muestra que PKG produce el 40% de la inhibición de esta corriente [114].

Por otro lado, también está descripto que los mecanismos de acción del NO derivado de la nNOS en la I_{Ca,L} podrían involucrar cambios en el estado redox del canal. Hu et al. mostraron que la nitrosilación disminuye la expresión del DPHR bajo un mecanismo independiente de GMPc [115] y resultados similares se obtuvieron en presencia de agentes oxidantes [116]. Sin embargo, el efecto de la nitrosilación sobre esta corriente es controvertido ya que Campbell et al. demostraron en miocitos aislados que la nitrosilación estimularía la I_{Ca,L} [85].

-SERCA2a y PLN

En el RS, el NO producido por la nNOS favorece la relajación del miocito cardíaco a través de la recaptura de Ca²⁺ por SERCA2a debido la fosforilación de PLN por un mecanismo dependiente de PKA (pero independiente de GMPc/PKG) en el sitio Ser16. Esta fosforilación es debida a la inhibición de la proteína fosfatasa tipo 2 (PP2A)

dependiente de nNOS. Además, la recaptura de Ca^{2+} aumenta debido a la fosforilación en el sitio Thr17 por CaMKII [117].

Además, está descrito que el NO producido por esta isoforma puede activar a SERCA2a a través de S-nitrosilación [118] o indirectamente a través de S-glutationilación dependiente de peroxinitrito [119].

Debido a que la nNOS co-inmunoprecipita con la enzima xantina óxido reductasa [23], una enzima productora de superóxido, y que por otro lado, la nNOS puede producir, durante estados patológicos, tanto NO como superóxido [120], es posible que se produzca peroxinitrito promoviendo disfunción contráctil y una disminución en la retoma de Ca^{2+} hacia el RS debido a una disminución en la fosforilación de PLN [108].

-NCX

Otro de los componentes que regulan la relajación miocárdica es el NCX. Sears et al. demostraron que la producción de NO por la nNOS no afectaría la función de este intercambiador [112].

-RyR2

El rol del NO derivado de la nNOS en la actividad del RyR2 es controversial debido a que se ha demostrado, en ratones $NOS1^{-/-}$ que el NO a través de la S-nitrosilación puede producir un aumento [121] o una disminución [122] en la probabilidad de apertura de este canal.

Gonzalez et al. también demostraron que la oxidación del RyR2 puede promover un aumento en su actividad [121]. Sin embargo, una prolongada oxidación lleva a la inactivación irreversible del mismo [123].

Por otro lado, teniendo en cuenta que nNOS, RyR2 y CaMKII co-localizan espacialmente [88] también está descrito que el NO liberado por la nNOS puede aumentar la actividad de RyR2 a través de la nitrosilación de CaMKII. Curran et al. demostraron en miocitos de conejos, que el NO actúa corriente abajo durante la estimulación β -adrenérgica manteniendo la actividad de CaMKII independientemente de Ca^{2+} . Esto produce un aumento de la liberación de Ca^{2+} en diástole y por ende, la formación de ondas espontáneas de Ca^{2+} (Ca^{2+} waves) conocidas por ser pro-arritmogénicas [124].

Xiao et al. describieron en experimentos *in vitro* que el sitio Ser2808 de RyR2 puede ser fosforilado por PKG [49]. Sin embargo, hasta el momento, no hay evidencias de la fosforilación de este sitio *in vivo*.

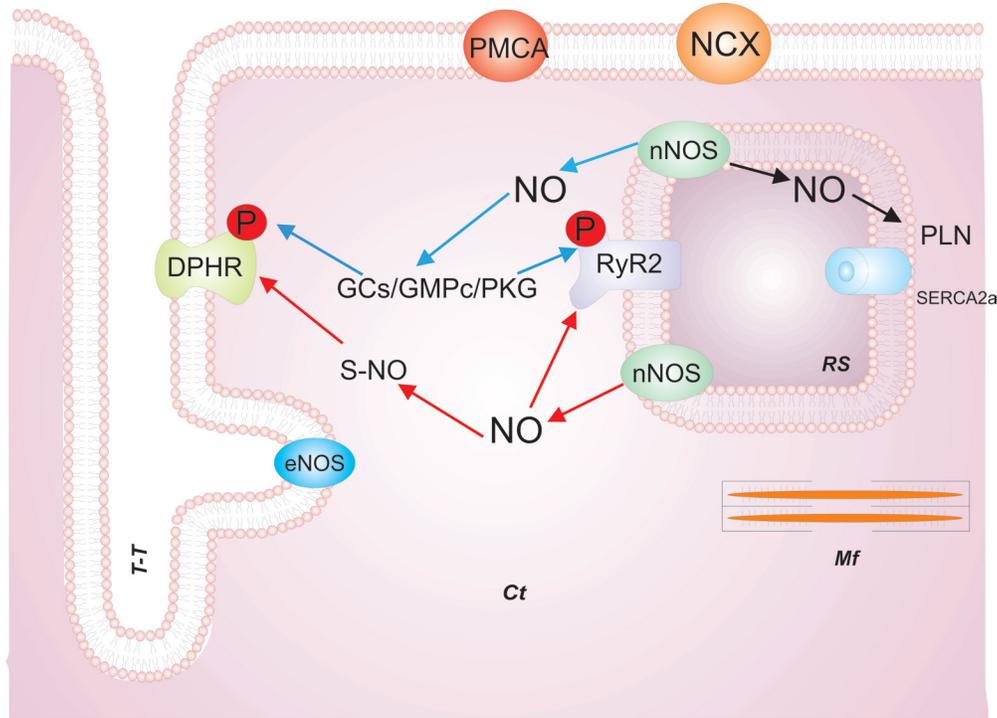


Fig 9: Esquema donde se representan los principales blancos y cascadas de la señalización de nNOS. T-T: Túbulo T, Ct: citosol, Mf: miofilamentos, RS: retículo sarcoplásmico, DPHR: receptor de dihidropiridina o canal de Ca²⁺ tipo L, PLN: fosfolamban, RyR2: receptor de rianodina, PMCA: Ca²⁺ ATPasa de membrana, NCX: intercambiador sodio-calcio.

B.2. Isoforma endotelial (eNOS o NOS3)

Al igual que la nNOS, la isoforma endotelial se expresa constitutivamente en miocitos cardíacos. Esta isoforma se localiza en las caveolas y sarcolema y co-inmunoprecipita con caveolina-3 (Cav-3) [125]. Cuando eNOS se encuentra asociada a Cav-3 la actividad de la enzima se encuentra disminuida y esto se debe a que Cav-3 previene la unión de CaM cuando los niveles de Ca²⁺ son bajos.

I. Modificaciones post-traduccionales de eNOS

eNOS puede sufrir modificaciones post-traduccionales como miristoilación, palmitoilación y fosforilación.

A diferencia de las otras isoformas de las NOS, la eNOS contiene un grupo miristoilo y un grupo palmitoilo permitiendo que esta isoforma pueda sufrir otras modificaciones post-traduccionales como miristoilación y palmitoilación. Estas modificaciones son requeridas para la correcta interacción entre Cav-3 y eNOS [126].

Sin embargo, la principal regulación post-traducciona l de la eNOS tiene lugar a través de la fosforilación. La actividad de esta isoforma aumenta por la fosforilación en los sitios Ser1177 y Ser633 y disminuye por la fosforilación en Thr495.

El sitio mas estudiado en la fosforilación de eNOS es el sitio Ser1177. El mismo puede ser fosforilado por la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) durante la isquemia miocárdica [127], por PKA durante la deformación de la membrana celular mediada por estrés de cizallamiento [128], CaMKII [129], PKG [130] y Akt [131-133].

La actividad de eNOS también puede estar aumentada por la fosforilación en el sitio Ser633. Muchos de los activadores de la síntesis de NO que aumentan la fosforilación en el sitio Ser1177, también lo hacen en este sitio aunque en menor medida. Algunos de los activadores son el ATP, la bradiquinina y el factor de crecimiento del endotelio vascular [134], el cizallamiento [128] y las estatinas [135]. Interesantemente, la producción de NO debido a la fosforilación de este sitio, no requiere del aumento del Ca^{2+} intracelular [136] sugiriendo que su fosforilación sería importante para mantener el aumento en la actividad de eNOS luego de la producción inicial de NO a través de la fosforilación del sitio Ser1177. PKA sería la quinasa responsable en la fosforilación del sitio Ser633 [128, 136, 137] mientras que Akt es incapaz de fosforilarlo [137].

La actividad de eNOS se reduce por la fosforilación en el sitio Thr495 debido a que su fosforilación interfiere en la unión de Ca^{2+} -CaM [138]. También se ha demostrado la fosforilación de este sitio por PKC [134, 138] y por AMPK [127].

Por otro lado, están descriptos dos sitios fosforilables más de la eNOS pero sus efectos sobre la producción de NO son controversiales.

La fosforilación en el sitio Ser615 se ha descripto como activadora [135, 137] e inactivadora [139]. Lo mismo sucede con el sitio Ser114 ya que se ha descripto que cuando se encuentra desfosforilado promueve la producción de NO [140, 141] y contrariamente, se ha descripto que el cizallamiento aumenta la fosforilación de este sitio promoviendo la producción de NO [142].

II. Efectos contráctiles del NO derivado de eNOS

El rol que la eNOS tiene sobre la contractilidad basal es controvertido y esto se podría deber a los distintos modelos utilizados para su estudio. En miocitos cardíacos aislados

esta isoforma no cumpliría ningún rol en la función basal [23] mientras que en corazón entero se observó que sí la modularía [143].

Se ha descrito que eNOS aumenta los transitorios de Ca^{2+} y la contracción durante el estiramiento axial de miocitos cardíacos [26].

Además, se ha observado que el NO derivado de las eNOS disminuye la respuesta funcional en ratones evidenciado por un menor transitorio de Ca^{2+} y menor acortamiento celular frente a un estímulo β -adrenérgico (β -AR) [144]. Por otro lado, se ha observado que en ratones que tienen sobre-expresada esta isoforma la respuesta contráctil esta todavía más deprimida [145]. En concordancia con este trabajo, Wang et al. observaron que la inhibición aguda de eNOS en ratones silvestres (WT) aumenta la respuesta contráctil frente a un estímulo β -AR [108]. En cuanto a la respuesta ante este tipo de estímulo también hay controversia ya que otros autores no observaron diferencias entre miocitos de ratones que tenían delecionada la eNOS y miocitos de ratones WT [146].

Por otro lado, la señalización de eNOS podría ejercer un papel cardioprotector frente a la actividad arritmogénica durante la estimulación β -AR. Está descrito que inhibir esta isoforma promueve que se alargue la duración del potencial de acción y que el RyR2 libere más Ca^{2+} en período diastólico pudiendo contribuir a la generación de arritmias [108]. Además, eNOS protegería también del remodelado cardíaco limitando la hipertrofia, fibrosis y disfunción contráctil luego de una sobrecarga de presión [147].

Por otra parte, Kaye et al. demostraron que el NO derivado de la eNOS promueve la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} a través de un mecanismo PKG dependiente [148].

III. Blancos y cascadas de señalización de eNOS

La eNOS se ubica en caveolas y membrana plásmática sugiriendo que algunas proteínas con la misma ubicación podrían estar reguladas a través de la producción de NO por esta isoforma. A continuación se detallan los blancos posibles explicitando si esta isoforma promueve algún efecto sobre los mismos.

-DPHR

Como se mencionó previamente, la eNOS se ubica en caveolas cerca del DPHR. Bai et al. mostraron que la activación de eNOS promueve una disminución en $I_{\text{Ca,L}}$ [149]. Otros estudios demostraron que el 8-Br-cGMP (un análogo de GMPc) fosforila la subunidad $\alpha 1\text{C}$

en el sitio Ser533 del DPHR promoviendo la inhibición del canal, lo que sugiere que esta fosforilación sería a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente [150].

Además, Ziolo et al., demostraron que la inhibición de PDE5 disminuía la $I_{Ca,L}$ a través del aumento de la actividad de PKG [76] sugiriendo que eNOS y PDE5 co-localizan implicando a GMPc como una molécula de señalización corriente abajo de eNOS.

En cuanto a los mecanismos independientes de GMPc inducidos por eNOS, se ha observado que esta corriente se regula de forma reversible mediante mecanismos redox y que estos pueden activarla [85] o inhibirla [115, 151]. Por otro lado, Sun et al. demostraron que eNOS podría disminuir la $I_{Ca,L}$ en miocitos a través de la S-nitrosilación de la subunidad $\alpha 1C$ del DPHR [151].

-SERCA2a y PLN

Recientemente, Bibli et al. demostraron que la cascada de señalización GMPc/PKG/PLN sería cardioprotectora reduciendo el tamaño del infarto luego de una isquemia y tendría como intermediaria la activación de eNOS mediante la fosforilación del sitio Ser1177 y la consecuente producción de NO [152].

-NCX

Está descrito que el NCX y eNOS co-localizan en la caveola en células endoteliales vasculares y que este intercambiador promueve la activación de eNOS, sugiriendo una interacción funcional entre ambas proteínas [153]. Además, Maczewski et al. demostraron que la inhibición del NCX atenúa la formación de NO luego de un proceso isquémico [154].

Hay un trabajo en células endoteliales donde se muestra que el NO producido por la eNOS a través de la GC inhibe la vasoconstricción mediada por el NCX [155]. Por otro lado, Mene et al. demostraron en células mesangiales humanas cultivadas, que PKG inhibiría la actividad del NCX [156].

Sin embargo, hasta el momento no hay estudios que demuestren un efecto del NO producido por esta isoforma sobre el NCX en miocitos cardíacos.

-RyR2

Vila Petroff et al. observaron que el NO liberado por la eNOS aumentaría la probabilidad de apertura del RyR2 y la amplitud del transitorio de Ca^{2+} bajo condiciones de

estiramiento axial vía un mecanismo independiente de GMPc (y dependiente de Akt) produciendo un efecto inotrópico positivo sin cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS [26]. Por otro lado, hasta el momento se desconoce que esta isoforma regule este canal a través de mecanismos dependientes de GMPc.

-MIOFILAMENTOS

El NO liberado por esta isoforma puede afectar directamente la contracción de los miocitos y disminuir la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} a través de la fosforilación de la TnI, mediante un mecanismo dependiente de GMPc/PKG, promoviendo así disfunción contráctil [148].

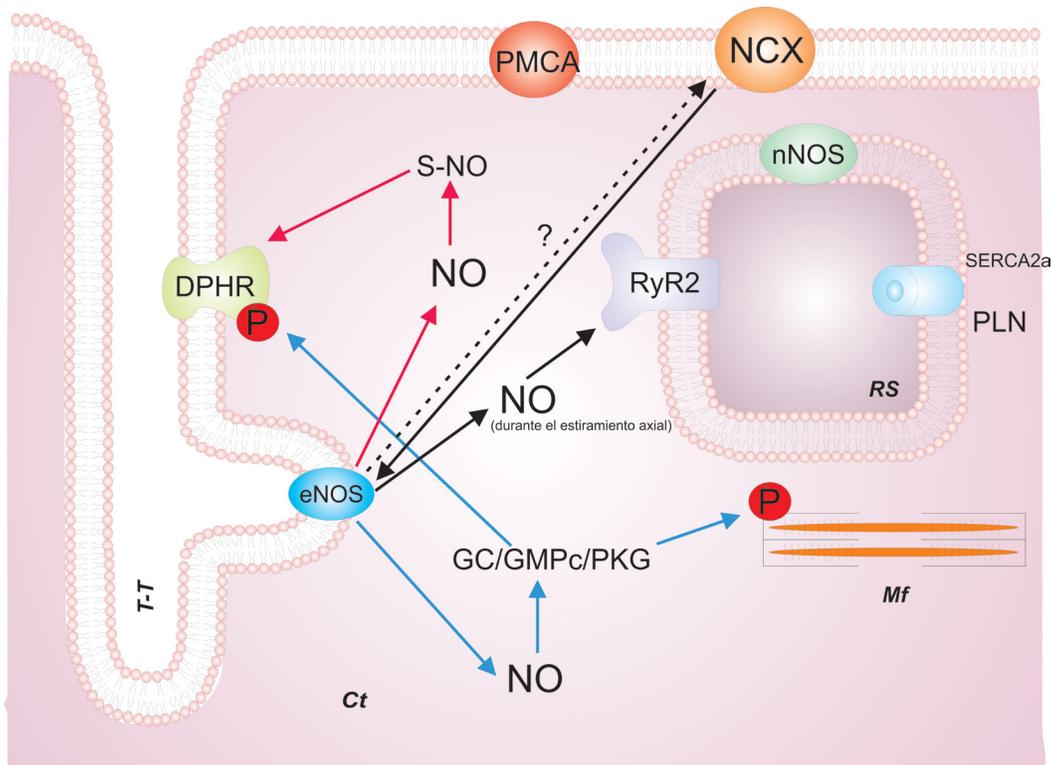


Fig 10: Esquema donde se representan los principales blancos y cascadas de la señalización de eNOS. T-T: Túbulo T, Ct: citosol, Mf: miofilamentos, RS: retículo sarcoplásmico, DPHR: receptor de dihidropiridina o canal de Ca^{2+} tipo L, PLN: fosfolamban, RyR2: receptor de rianodina, PMCA: Ca^{2+} ATPasa de membrana, NCX: intercambiador sodio-calcio.

B.3. Isoforma inducible (iNOS o NOS2)

La isoforma inducible es una proteína citosólica que se expresa únicamente durante respuestas inmunes [157] y por ende durante condiciones patológicas que están asociadas con respuestas inflamatorias como injuria por isquemia y reperfusión [158], sepsis [159], envejecimiento [160] e insuficiencia cardíaca [161].

I. Efectos contráctiles del NO derivado de iNOS

En muchas condiciones patológicas del miocardio, la disfunción cardíaca que se observa es en parte debido a la producción de NO por la iNOS. La expresión de esta isoforma luego de una injuria por isquemia y reperfusión contribuye a la disfunción contráctil y al aumento en el tamaño de infarto [158, 162]. Se ha descrito que la inhibición de esta isoforma promueve protección contra la disfunción miocárdica en sepsis [18] y normaliza la función de corazones enteros de miocardios seniles [160].

II. Blancos y cascadas de señalización de iNOS

Varias proteínas involucradas en el manejo de Ca^{2+} son blancos de la iNOS incluyendo la TnI [163], RyR2 [161] y la $I_{\text{Ca,L}}$ [164]. A través de un mecanismo dependiente de GMPc, el NO producido por la iNOS induce una reducción en la $I_{\text{Ca,L}}$ [164] y en la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} [163] promoviendo disfunción contráctil.

Otro efecto de la iNOS dependiente de GMPc esta mediado por la alteración en la actividad de las fosfodiesterasas. La iNOS disminuye los niveles de AMPc posiblemente a través de la activación de la PDE2 atenuando la respuesta frente a la estimulación β -adrenérgica [165].

La iNOS también tiene efectos a través de mecanismos independientes de GMPc. La iNOS puede desacoplarse fácilmente llevando a la producción tanto de NO como de superóxido, el cual puede reaccionar formando altos niveles de peroxinitrito [166]. Esta especie reactiva del nitrógeno, a altas concentraciones, es un potente oxidante capaz de causar daño celular [167]. Estudios demuestran que puede inactivar SERCA2a llevando a una reducción de la carga de Ca^{2+} del RS y por ende a disfunción contráctil [168]. También puede reducir la fosforilación de PLN en el residuo Ser16 dependiente de AMPc a través de la activación de fosfatasas afectando así también la retoma de Ca^{2+} por la SERCA2a [169].

iNOS es capaz de producir varios efectos sobre el AEC debido a que, una vez que se expresa produce mayores cantidades de NO comparado con las otras isoformas. Además, debido a que es una isoforma citosólica su señalización no está compartimentalizada.

6. Muerte celular

Recientemente varias formas de muerte celular han sido caracterizadas en base a criterios morfológicos y bioquímicos. Los dos modelos mejor caracterizados son la muerte celular por apoptosis y necrosis.

Hay diversos mediadores que pueden llevar a la muerte celular. Alguno de ellos son: la producción excesiva de radicales libres de oxígeno (ROS) y la sobrecarga de Ca^{2+}_i . Ambos, pueden potencialmente producir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), fenómeno que se acompaña de una reducción en la producción celular de ATP y de la liberación de sustancias disparadoras de la apoptosis hacia el citoplasma, en el caso de una apertura reversible, o bien de la pérdida de la funcionalidad de dicha organela y muerte celular por necrosis si la apertura es irreversible [170, 171].

Debido a que el hinchamiento hipotónico cursa con alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} y que este ión está implicado tanto en la iniciación como en el tipo de muerte celular que termine adoptando el miocito, describiré a continuación como el estrés osmótico puede afectar la viabilidad celular.

A. Hinchamiento hipotónico y su impacto sobre la viabilidad celular

El edema miocárdico inducido por la reperfusión puede afectar la supervivencia de los miocitos a través de efectos directos del hinchamiento de los mismos o como resultado de los efectos del edema celular e intersticial sobre la circulación coronaria y el rendimiento miocárdico [172]. Por otro lado, diversos trabajos han demostrado que el hinchamiento hipotónico promueve apoptosis

Steenbergen et al. y Ruiz-Meana et al. demostraron que el hinchamiento hipotónico promueve la disrupción de la membrana celular sugiriendo que este tipo de estrés conduciría a la muerte celular [173, 174].

Mizoguchi et al. describieron que la $I_{Cl;Swell}$, corriente que se activa durante este tipo de estrés, jugaría un rol importante en la inducción de apoptosis ya que aumenta la actividad de la caspasa-3 y promueve la fragmentación de ADN luego de una I/R [175].

Por otro lado, Diaz-Elizondo et al. han demostrado, en miocitos neonatales, que la exposición a soluciones hiposmóticas promueve una disminución en la viabilidad celular al cabo de 6 hs de tratamiento con respecto al control. Sin embargo, no pudieron detectar la activación de Caspasa9 ni Caspasa3, proteínas que se activan durante la apoptosis, pero observaron que la exposición a un medio hipotónico inducía en los cardiomiocitos estructuras vesiculosas características de la muerte por necrosis. Ellos sugieren que el hinchamiento hipotónico estaría reduciendo la viabilidad celular a través de una cascada independiente de caspasas y proponen que la muerte celular sería a través de necrosis [176].

Además, Rojas-Rivera et al. también observaron en miocitos neonatales de ratas Sprague-Dawley que el hinchamiento hipotónico producía estructuras en formas de vesículas en el 70% de los cardiomiocitos y sugieren que la muerte celular sería por necrosis y que los ROS serían los mediadores durante este proceso [177].

Recientemente, Katsuya Kajimoto et al. demostraron que exponer a miocitos neonatales de ratas Wistar a una solución hipotónica durante 24 hs reduce significativamente la viabilidad. Ellos plantean que el hinchamiento hipotónico lleva a la muerte celular pero a su vez activa una cascada protectora que involucra a PKN1 y ERK, que actúan como un mecanismo adaptativo que alivia la injuria y muerte celular promovida por el hinchamiento hipotónico [178].

Finalmente, hasta lo que sabemos, existe sólo un trabajo que muestra el impacto del hinchamiento hipotónico sobre la viabilidad de miocitos cardíacos adultos. En este estudio se demuestra que exponer a las células a una SH promueve muerte celular [174]. Sin embargo, la osmolaridad de la SH es extrema (80 mOsm) con respecto a la que se sabe que puede ocurrir durante el proceso de reperfusión: 290 mOsm [7]

B. Óxido Nítrico y su impacto sobre la viabilidad celular

Está descrito que el NO puede ejercer efectos pro y anti-apoptóticos en el músculo cardíaco.

En miocitos cardíacos aislados y corazones enteros, se observó que el NO a altas concentraciones (en el rango de μM) induce necrosis y apoptosis. Hofstaetter et al.

observaron que exponer a corazones de rata a 10 μ M del donante de NO (SNAP) promovía apoptosis [179]. En otro trabajo, Taimor et al. proponen que la vía por la cual el NO produce el desarrollo de necrosis parecería ser independiente de GMPc, mientras que el desarrollo de apoptosis, involucraría a GMPc y la subsecuente activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos y de factores de transcripción [180]. Sin embargo, esta proposición es controvertida ya que está descripto que el NO puede aumentar la probabilidad de apertura del PTPM a través de la S-nitrosilación generando la liberación de citocromo c desde la mitocondria promoviendo muerte celular [181].

En cuanto a los efectos anti-apoptóticos, Hofstaetter et al. también demostraron que luego de una iquemia prolongada (3 hs), la aplicación de un donante de NO previene la apoptosis sugiriendo que el NO reduce la muerte celular durante este proceso [179].

Borutaite et al. describieron que el NO protegería de la muerte celular a través un mecanismo GMPc/PKG dependiente. El NO inhibiría el PTPM e impediría la liberación de citocromo c, a través de la activación de la PKC mitocondrial [182].

Por otro lado, se sabe que la mayoría de las caspasas contienen una única cisteína en su sitio catalítico, la cual está sujeta a modificaciones redox y también puede ser nitrosilada por NO promoviendo su inactivación e inhibiendo así, la muerte celular por apoptosis [183]. Un estudio reciente en miocitos neonatales de rata demostró que la inhibición de la apoptosis por la S-nitrosilación de caspasa 3 jugaría un importante rol sugiriendo que el NO podría ser capaz de recuperar a los miocitos del proceso de apoptosis aún cuando la cascada apoptótica esté iniciada [184].

Tomados en conjunto, estos antecedentes indican que el hinchamiento hipotónico y el NO están íntimamente involucrados en las alteraciones en la viabilidad celular. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado en miocitos de ratas adultas y en condiciones de osmolaridad semejantes a las que se observan durante el proceso de I/R, si este tipo de estrés celular y el NO tienen algún efecto en la viabilidad celular.

OBJETIVO GENERAL

El hinchamiento hipotónico ocurre en diversas situaciones patológicas, y a nivel cardíaco, esta alteración en el volumen celular, es capaz de promover, entre otras cosas, disfunción contráctil y alteraciones en la viabilidad celular.

El óxido nítrico (NO), sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS), ha sido identificado como un regulador clave del AEC y de la viabilidad celular.

Previamente, se demostró que la deformación de las membranas como el estiramiento axial de miocitos cardíacos y el hinchamiento hipotónico de células endoteliales y de células ciliadas externas de cóclea inducen la liberación de NO. Sin embargo, si la deformación de las membranas por hinchamiento hipotónico también induce la liberación de NO en miocitos cardíacos no había sido estudiado hasta el momento.

Nuestro objetivo general fue evaluar si el hinchamiento hipotónico de miocitos cardíacos promueve la liberación de NO y de ser así, estudiar su potencial impacto sobre el manejo de Ca^{2+} intracelular, la contractilidad y la viabilidad celular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Determinar si el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en miocitos cardíacos adultos.
- 2) Determinar la/s isoformas de las NOS responsables en la producción de NO.
- 3) Examinar si el citoesqueleto está involucrado en sensar el estiramiento de la membrana inducido por el hinchamiento y traducirlo en un aumento de la liberación de NO.
- 4) Evaluar el mecanismo por el cual el hinchamiento hipotónico promueve la activación de la/s isoformas de la NOS.
- 5) Examinar el impacto del NO sobre la función contráctil y el manejo del Ca^{2+} intracelular durante el hinchamiento hipotónico.
- 6) Determinar la vía por la cual el NO afecta el AEC.
- 7) Examinar el impacto del hinchamiento hipotónico sobre la viabilidad de miocitos cardíacos adultos.
- 8) Determinar si el NO impacta sobre las alteraciones de la viabilidad asociadas con el hinchamiento hipotónico.

MATERIALES
Y
METODOS

1. Aspectos generales

Todos los experimentos han sido realizados de acuerdo a las normas generales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, estipuladas en la "Guide for the care and use of laboratory animals, NIH publication n° 85-23, 1996" y aprobados por El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (**CICUAL**) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Plata.

Los resultados se obtuvieron en miocitos aislados de corazones de ratas Wistar macho adultas (200-300 gramos) y de ratones (25-30g) que tienen delecionado funcionalmente el gen de la NOS1 (NOS1KO) y sus respectivos controles silvestres (C57BL/6). En todos los experimentos las células fueron obtenidas a partir de por lo menos 3 corazones.

2. Aislamiento de miocitos cardíacos

Los miocitos cardíacos fueron aislados según la técnica de digestión enzimática en un sistema de perfusión tipo Langendorff descripta previamente [185]. Para la realización de esta técnica los animales fueron anestesiados vía inyección intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg). Una vez alcanzada una correcta anestesia y analgesia, comprobadas al determinar ausencia de reflejo tendinoso y corneal, como así también la ausencia de respuesta frente a otros estímulos, se procedió con la cirugía. En el caso de los ratones, se les inyectó 0.5 ml de heparina sódica (200 U/ml) previamente a la analgesia y anestesia con el objetivo de evitar la formación de coágulos.

El acceso al corazón se logró realizando una toracotomía, mediante una incisión a la altura del esternón dejando expuesta la totalidad de la cavidad torácica. Posteriormente, se retiró la cubierta pericárdica y, en el caso de las ratas, se procedió a inyectar 1 ml de heparina sódica (200 U/ml) dentro de la cavidad auricular. Finalmente, el corazón se removió y se suspendió en un sistema de perfusión tipo Langerdorff mediante canulación de la aorta.

El corazón se perfundió retrógradamente a 37°C a una presión constante de perfusión de 70-80 mmHg. En primer lugar, con solución HEPES 1 mM Cl_2Ca (su composición se detalla posteriormente) burbujeada con O_2 al 100 % para limpiar el tejido y estabilizar la

función contráctil. Luego, el corazón se perfundió durante 5 minutos con la solución HEPES nominalmente libre de Ca^{2+} dado que contiene 0.1 mM de EGTA (compuesto capaz de unirse al Ca^{2+} libre y quelarlo), con lo cual el corazón deja de latir y se debilitan las uniones intercelulares. En el caso del ratón, el corazón solo se perfundió con la solución HEPES 0.1 mM de EGTA [186].

El siguiente paso consistió en recircular, durante 15 minutos, una solución de digestión compuesta por una solución HEPES con los siguientes agregados: 0.5 mM Cl_2Ca , 0.5 mg/ml de colagenasa tipo II (300U/ml), 0.02mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0.5 mg/ml. El proceso de digestión se realizó a 37°C , y en su etapa final se pudo observar una menor consistencia del corazón al tacto.

Una vez concluida la digestión, el corazón se desmontó y el tejido ventricular se disoció mecánicamente con tijeras. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que atravesaron 4 pasos de decantación y resuspensión en soluciones HEPES cada vez más concentradas de Cl_2Ca , hasta lograr una concentración final de 1 mM en el caso de la rata y 1.8 mM en el caso del ratón. Este pasaje escalonado por soluciones progresivamente más concentradas en Cl_2Ca tiene como finalidad evitar la muerte celular por recalcificación rápida. Finalmente, las células aisladas fueron conservadas en una solución isotónica (su composición se detalla posteriormente) a $20\text{-}24^\circ\text{C}$, donde se mantuvieron en suspensión hasta su utilización. Los miocitos cardiacos fueron elegidos para su estudio en base a su morfología (patrón sarcomérico conservado y bordes regulares (Fig 12)), a su capacidad de contraerse ante la estimulación eléctrica y a la ausencia de contracciones espontáneas [187].

Solución HEPES (en mM. Ajustada a pH 7.4 con NaOH):

ClNa 146.2

ClK 4.7

Cl_2Ca 1

Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 10

PO_4NaH_2 0.35

SO_4Mg 1.05

Glucosa 10



Fig 11: Imágen de miocitos cardíacos de rata aislados mediante digestión enzimática conservados en solución isotónica para su posterior utilización. Se observa que el aislamiento tiene un rendimiento mayor al 80%.

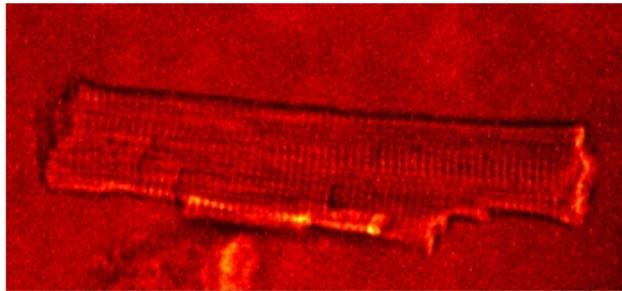


Fig 12: Imágen de campo claro de un miocito cardíaco de rata donde puede observarse un patrón sarcomérico conservado y bordes regulares.

3. Inducción de hinchamiento osmótico

Los miocitos cardíacos fueron estimulados por electrodos de platino a 0.5 Hz y perfundidos (1 ml/min a temperatura ambiente) con solución isotónica (SI: 309 mOsm) durante 5 minutos (o hasta su estabilización en dicha solución) y luego durante 20 minutos con solución hipotónica (SH: 217 mOsm). Los experimentos controles consistieron en mantener los miocitos en SI durante toda la duración del protocolo experimental. Ambas soluciones se caracterizan por una reducción en la concentración del Na^+ pero la SI está suplementada con manitol para mantener la osmolaridad.

A continuación se detalla cómo se prepararon las soluciones isotónica e hipotónica (todas las concentraciones están expresadas en milimoles por litro) descritas previamente por Bell JR et al. [4].

| | Solución isotónica (SI) | Solución hipotónica (SH) |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| NaCl | 91 | 91 |
| KCl | 5.3 | 5.3 |
| MgCl ₂ | 0.5 | 0.5 |
| CaCl ₂ | 1 | 1 |
| Glucosa | 10 | 10 |
| Hepes, pH 7.4 | 10 | 10 |
| Manitol | 91.5 | 0 |
| Osmolaridad(mOsm) | 309 | 217 |

Fig 13: Tabla donde se muestran las soluciones isotónica (SI) e hipotónica (SH).

4. Medición de ancho/largo celular

Se tomaron imágenes de campo claro en un microscopio invertido Zeiss 410 (LSM, Tech, Pennsylvania, USA) con el objetivo de medir el ancho y largo celular como estimativo del grado de hinchamiento celular. Ambos parámetros fueron analizados utilizando el software *Image J*.

5. Medición de NO

Los miocitos cardíacos fueron cargados con el indicador fluorescente DAF-FM Diacetato (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate, Molecular Probes) en una concentración 5 μ M durante 30 minutos a temperatura ambiente de acuerdo a la técnica realizada previamente [26]. Una vez que ingresa a las células, el indicador es desacetilado por esterasas intracelulares y se convierte en DAF-FM, un compuesto que, una vez que reacciona con el NO, forma benzotriazol y puede ser detectado por su fluorescencia.

Los miocitos fueron observados en un microscopio invertido Zeiss 410 (LSM, Tech, Pennsylvania, USA). El indicador fue excitado por un láser Argon a 488 nm y la emisión fue colectada en un rango entre 510-530 nm. Este indicador es sensible al foto-apagado (en inglés *photo-bleaching*) por lo cual se usó la menor intensidad de láser posible. La fluorescencia fue adquirida durante 2.5 segundos cada 5 minutos a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento (25 minutos).

Se midió la producción de NO citosólico en células mantenidas en SI (células controles) y en células sometidas a hinchamiento hipotónico (SH) marcapaseadas durante todo el protocolo a 0.5 Hz. Los cambios registrados en la fluorescencia del indicador DAF-FM fueron considerados como una medida del cambio de NO intracelular.

6. Estudio de la membrana celular y el sistema de túbulos t

Debido a que el hinchamiento hipotónico produce la deformación de la estructura celular se evaluó el estado de la membrana celular y el sistema de túbulos t. Para ello mantuvimos a un grupo de miocitos cardíacos durante 20 minutos en SI y a otro grupo en SH. Luego de este tiempo, los miocitos se cargaron con el indicador fluorescente di-8-aminonaphthylethylenylpyridinium (Di-8-ANNEPS, 5 μ M, Molecular Probes) durante 2 minutos. Este indicador, debido a su propiedad de ser lipofílico permite evaluar el estado de la membrana celular y el sistema de túbulos T [188]. El indicador fue excitado a través de un láser Argon a 488 nm y la emisión se recolectó a 630 nm.

Se tomaron imágenes a miocitos expuestos a ambas soluciones y luego, a partir de las imágenes se analizó cuantitativamente la arquitectura de los túbulos T de los miocitos usando el programa de análisis Auto TT. Este programa de análisis automatizado puede ser utilizado para estudiar estructuras con patrones regulares. En particular para el estudio de los túbulos T permite evaluar las densidades de los mismos orientados transversal y longitudinalmente y su separación. También combina la densidad y la regularidad de los túbulos T para dar un índice de integridad de los mismos proporcionando así, una evaluación global de las alteraciones de estas estructuras [189].

7. Registro de Ca²⁺ citosólico y acortamiento celular

Con el propósito de monitorear en tiempo real las características del ciclado de Ca²⁺ citosólico, se realizaron experimentos funcionales mediante microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos aislados estimulados a 0.5 Hz. Las células fueron

incubadas durante 12 minutos a temperatura ambiente con el indicador sensible a Ca^{2+} Fura-2, en una concentración de 10 μM .

Luego del período de incubación las células se centrifugaron a baja velocidad durante 1 minuto y se resuspendieron en SI libre de indicador, para descartar aquellas moléculas de indicador que no ingresaron al compartimento intracelular.

El Fura-2 se utilizó en su forma permeante éster de acetoximetilo (AM), que se comporta como una molécula hidrofóbica capaz de atravesar con facilidad la membrana plasmática. Una vez dentro del citosol, las esterasas intracelulares hidrolizan la unión éster liberando la porción AM y la forma ácida activa del fluoróforo, que queda retenida en el interior celular. Por esta razón, las células no fueron utilizadas hasta luego de transcurridos 30 minutos posteriores a la incubación con el indicador, para permitir la desesterificación intracelular del mismo y trabajar con células que contengan una concentración intracelular estable de Fura-2.

Las células ya cargadas fueron colocadas sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot 200 adaptado para la técnica de epifluorescencia. Las mismas fueron perfundidas con SI (células control) o con SI+SH (células que sufren hinchamiento hipotónico) a un flujo constante de 1 ml/minuto y estimuladas eléctricamente a 0.5 Hz.

Para obtener una señal fluorescente sensible a Ca^{2+} citosólico, la muestra fue iluminada mediante una lámpara de Xenón, filtrando el haz de luz para excitar a dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm) en forma alternada. La fluorescencia emitida por las células fue registrada a >510 nm y amplificada por un fotomultiplicador. La excitación alternada con dos longitudes de onda permite calcular un cociente entre la señal emitida por el indicador cuando es excitado con luz de 340 nm de longitud de onda (en estas condiciones la emisión varía según se encuentre o no interactuando con moléculas de Ca^{2+}) y la señal emitida cuando es excitado con luz de 380 nm de longitud de onda (en esta condición la intensidad de señal emitida es independiente de la interacción entre moléculas de fluoróforo y Ca^{2+}). La obtención de este cociente permite normalizar la señal fluorescente adquirida por la cantidad de moléculas de fluoróforo que se encuentran en condiciones de emitir señal fluorescente a lo largo del experimento, evitando artefactos derivados del foto-apagado del fluoróforo, de su pérdida de la célula así como también de un cambio de foco de la muestra.

Con el propósito de medir el acortamiento celular, se generó contraste óptico entre los bordes celulares y el fondo de la cámara de perfusión. La célula a estudiar fue iluminada

con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible. De esta forma se logró la videodetección de bordes celulares permitiendo registrar la longitud y monitorear el acortamiento de los cardiomiocitos. Los datos adquiridos fueron almacenados en un software adecuado (ION Optix análisis) para su posterior análisis.

Estas maniobras se utilizan para evaluar en tiempo real el manejo de Ca^{2+} intracelular y el estado inotrópico (contractilidad) de las células en condiciones basales y los cambios acontecidos en respuesta a los diferentes tratamientos.

8. Estimación del contenido luminal de Ca^{2+} en el RS

A miocitos perfundidos con SI y SH se les estimó el contenido de Ca^{2+} del RS luego de la aplicación de cafeína, a partir de los siguientes métodos:

1. A través de la medición de la amplitud de la fluorescencia emitida por el indicador Fura-2.
2. A través del estudio de la integral de la corriente hacia adentro (“*inward*”) del NCX.

En el caso del método 1) se midió la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína 15 mM. La aplicación rápida de esta droga, provoca la liberación completa de las moléculas de Ca^{2+} contenidas dentro del RS y al mismo tiempo inhibe a la SERCA2a impidiendo su retoma permitiendo estimar el contenido de Ca^{2+} del RS [190].

Debido a la posibilidad de que el hinchamiento celular promueva la dilución del indicador Fura-2 y por ende de subestimar la cantidad de Ca^{2+} del RS determinada por el método 1), evaluamos la corriente del NCX en su modo directo luego de un pulso de cafeína. La misma fue medida con un amplificador Axoclamp 2A usando la técnica de patch clamp bajo la configuración de “whole-cell voltaje clamp”. La solución de pipeta contiene (en mM) y con un pH de 7.2: aspartato de K 120, KCl 20, Na_2ATP 4, MgCl_2 4, HEPES 10, Glucosa 10 y GTP 0.1. La corriente se midió en miocitos perfundidos con SI y SH suplementadas con 0.1mM de BaCl con el objetivo de inhibir las corrientes de K^+ y a temperatura constante de 30°C. Inicialmente se realizaron 10 pulsos de 250 ms de duración desde un voltaje de -80 mV a un voltaje de 0 mV a fin de cargar el RS de Ca^{2+} retornando a un voltaje de -80 mV y luego de 1 min se aplicó un pulso de cafeína y se registró la corriente del NCX. La amplitud de esta corriente fue normalizada por la capacitancia de la célula y expresada como pA/pF.

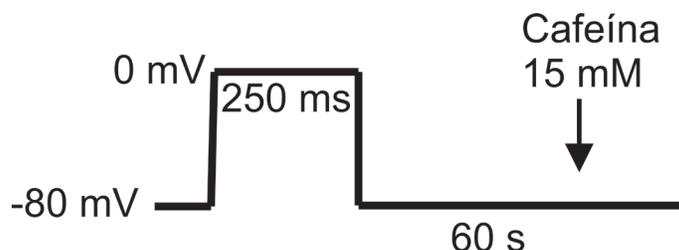


Fig 14: Protocolo utilizado para la medición de la corriente del NCX.

Como se mencionó previamente, la presencia de cafeína 15 mM produce el vaciamiento total de Ca^{2+} del RS y la imposibilidad de la recaptura de este ión debido a la inhibición de la SERCA2a. Bajo estas condiciones, el NCX extruye Ca^{2+} y por lo tanto el registro de su corriente nos permitió estimar el contenido de Ca^{2+} del RS de una forma indirecta.

9. Detección de liberación espontánea de Ca^{2+} del RS por microscopía confocal.

Para el estudio en tiempo real de la liberación espontánea de Ca^{2+} del RS se trabajó en un microscopio invertido confocal (Zeiss 410, LSM Tech, Pennsylvania, USA) con miocitos cardíacos de rata cargados con el indicador sensible a Ca^{2+} Fluo-3. Dicha carga se realizó incubando a las células con 10 μM de Fluo-3 AM durante 10 minutos en oscuridad, previo a la realización de los experimentos.

Para lograr la obtención de señal fluorescente sensible a Ca^{2+} citosólico, la célula seleccionada fue excitada con luz de 488 nm proveniente de un láser Argón y la señal emitida fue recolectada en el rango de 510 a 560 nm. En estos experimentos se realizó el barrido longitudinal de la célula en un plano focal específico (tanto el sector a barrer como el plano focal fueron seleccionados antes de comenzar cada experimento, buscando obtener una buena relación célula/fondo y evitando atravesar los núcleos celulares). A diferencia de la información obtenida en experimentos realizados en epifluorescencia, el barrido lineal realizado en un plano focal específico, permite obtener resolución espacial de la liberación de Ca^{2+} dentro de la célula evaluada. Esta técnica permite detectar eventos de liberación local y transitoria de Ca^{2+} , conocidos como “chispas de Ca^{2+} ” (en inglés: *calcium sparks*) sin dejar de detectar la ocurrencia de ondas de Ca^{2+} (en inglés: *calcium waves*). Estos eventos fueron evaluados durante la perfusión de miocitos

cardíacos con SI y SH como parámetros estimativos de la sensibilidad del RyR2 a un dado Ca^{2+} citosólico

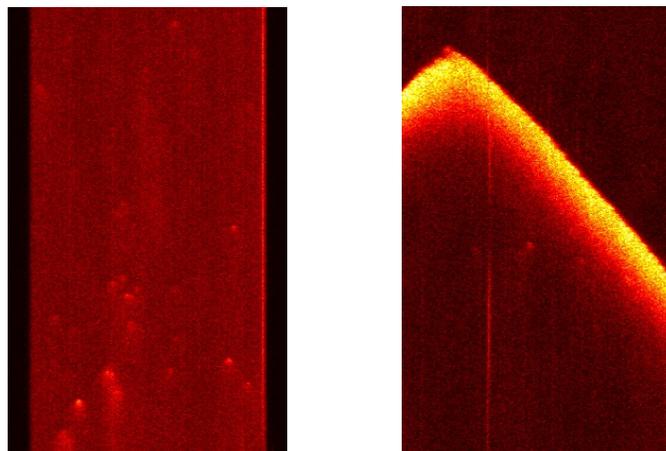


Fig 15: Imágenes representativas de células sin marcapasear donde se puede observar la ocurrencia de chispas de Ca^{2+} en el panel izquierdo y de una onda de Ca^{2+} en el derecho. Ambos eventos se desarrollan durante el período diastólico.

El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el software *Image J*. Para el análisis de la frecuencia de chispas de Ca^{2+} se utilizó el complemento *Sparkmaster* que ha sido diseñado y validado para el estudio de la frecuencia y características individuales de las chispas de Ca^{2+} [191].

Para el análisis de la velocidad de las ondas de Ca^{2+} se realizó la división: distancia (μm)/tiempo (seg) a partir de la conversión de pixeles a μm o segundos según el plano correspondiente.

10. Inmunodetección por análisis de Western blot

Cardiomiocitos aislados de rata fueron incubados en SI o SH, en ausencia o presencia del inhibidor de la GCs: ODQ (10 μM) o del inhibidor de PKG: KT5823 (1 μM). Luego de 20 minutos de tratamiento en sus respectivas soluciones, se colectaron los miocitos y se los lisó con buffer de lisis (en mmol/L: 50 Tris-HCl, 5 EGTA, 2 EDTA, 100 FNa, 1 NaVO_4 , 0.05% Tritón X-100 a pH 7.5) durante 30 minutos. La concentración de proteínas fue medida con el método de Bradford usando distintas concentraciones de albúmina (BSA) como medida estándar.

Posteriormente, se les adicionó buffer de carga a los lisados ((10% (v/v) de glicerol, 1-3% (v/v) 2-mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 0.5% (p/v) de azul de bromofenol, 75 mM Tris, pH

6.8)) e inhibidores de proteasas (*MiniComplete Tablets, Roche*) y se los sembró (aproximadamente 90 ug de proteína) en un gel 10% de SDS-poliacrilamida junto al marcador de peso molecular (*Dual Color BIORAD*). Luego de que las proteínas de interés se separaron en base a su peso molecular, se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) por electroforesis (SDS-PAGE). Las membranas fueron bloqueadas con una solución buffer con Tris (TBS: 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl pH 7.5) y leche al 10% para luego incubarlas toda la noche con el anticuerpo que reconoce el sitio de fosforilación Ser2808 del RyR2 (1:5000; anti fosfo-Ser2808-RyR2) y anti GAPDH (1:10000) para normalizar. Al día siguiente, luego de sucesivos lavados con TBS, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios (1:10000; anti-IgG de conejo hecho en burro y anti-IgG de ratón hecho en oveja respectivamente, ambos conjugados a peroxidasa de rábano).

La inmunoreactividad fue visualizada por detección con un kit de quimioluminiscencia basada en una reacción enzimática y la intensidad de la señal de las bandas fue cuantificada por densitometría usando el software de *Image J*.

11. Estudio de la viabilidad celular durante el hinchamiento hipotónico

Se estudió la viabilidad celular de miocitos cardíacos, sembrados en placas de Petri y expuestos durante 10 hs a SI o SH en ausencia o presencia del inhibidor de las NOS (L-NAME), a través de un método morfométrico. Este método consiste en evaluar su morfología, de acuerdo a la relación largo/ancho de la células (una célula con una relación mayor o igual a 3 fue considerada viable), como fue previamente descrito [192]. En la figura 16 se puede observar la estructura de un miocito cardíaco viable, donde se observa un patrón sarcomérico conservado y bordes definidos, y un cardiomiocito muerto que ha perdido la relación de área y las típicas estriaciones, observándose en forma circular.

Para el recuento de los cardiomiocitos se tomaron fotos en un microscopio Nikon Diaphot 200 con una cámara acoplada Nikon y un objetivo Uplan FLN de 20X. Se fotografiaron 5 campos al azar por cada placa de Petri. Las imágenes fueron almacenadas en formato JPG y se realizó el recuento de manera manual sobre cada foto. Todos los datos de viabilidad celular se expresaron como porcentaje del número total de células.

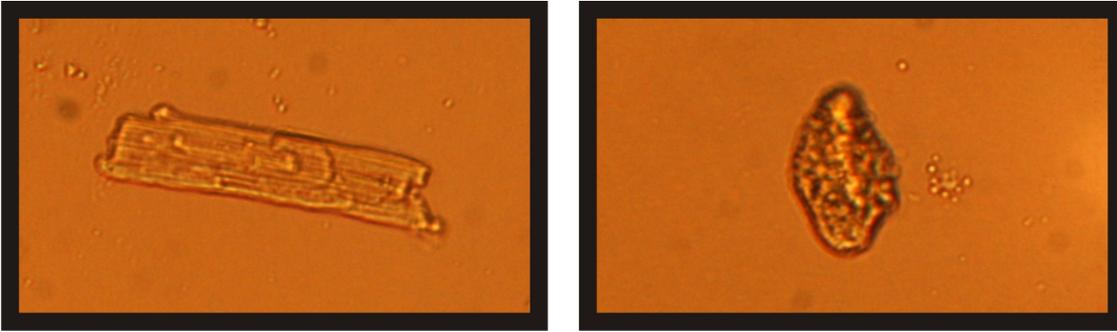


Fig 16: Imágenes representativas de un miocito cardíaco de rata vivo (izquierda) y otro muerto (derecha), con un 40X de aumento.

12. Analisis estadístico

Los resultados promedio se expresan como la media \pm error estándar. Para estudios de significación estadística se utilizó el test de t-Student en caso de dos muestras, y el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el post test de Newman-Keuls para comparar más de dos muestras. Además, se utilizó ANOVA de dos vías para la comparación de curvas de diferentes grupos experimentales luego de una intervención.

En todos los casos se consideró $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

FARMACOLOGIA UTILIZADA

ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO (CPA): inhibidor de la SERCA2a.

COLCHICINA (COLH): inhibidor de la polimerización de los microtúbulos.

DMSO: solvente para la preparación de ODQ.

DORSOMORFINA (DORSO): inhibidor de la proteína dependiente de AMP (AMPK).

KT5823: inhibidor de la proteína quinasa G (PKG).

L-NAME: inhibidor inespecífico de las isoformas de la NOS.

MPG: barredor de especies reactivas de oxígeno.

NITROGUANIDINA (NTG): inhibidor específico de nNOS.

ODQ: inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (GCs).

RIANODINA (RY): inhibidor del receptor de rianodina (RyR2).

WORTMANINA (WORT): inhibidor de PI3k. Utilizado como inhibidor de eNOS.

RESULTADOS

1. El hinchamiento hipotónico promueve aumento del ancho celular y la liberación de NO en miocitos ventriculares de rata.

Lo primero que evaluamos fue el efecto de la perfusión de miocitos cardíacos con SH sobre el grado de hinchamiento celular y sobre la producción de NO. En la Figura 17 se observan los resultados correspondientes al efecto que tiene la perfusión con SH y SI sobre el hinchamiento celular y la fluorescencia del indicador DAF-FM como indicativo de la producción de NO en miocitos ventriculares de ratas Wistar.

En el panel A se muestran imágenes típicas de campo claro donde se puede observar que luego de 20 minutos de perfusión con SH las células conservan una estructura sarcómera organizada. En las imágenes de campo claro, como así también en los resultados promedio, se puede observar que luego de 20 minutos, la perfusión con SH afecta el ancho pero no el largo celular indicando que el hinchamiento hipotónico en nuestras condiciones experimentales, cursa con cambios en el sentido radial de la célula en ausencia de estiramiento axial. Experimentos controles muestran que mantener las células en una SI durante el mismo período de tiempo no provoca cambios ni en el ancho ni en el largo celular.

En el panel B se muestran imágenes típicas de un miocito cargado con el indicador DAF-FM donde se puede observar que la fluorescencia del indicador, indicativo de producción de NO, aumenta cuando la célula es perfundida con SH. Los resultados promedio muestran que en miocitos estimulados a 0.5 Hz, cambiar la solución de perfusión de SI a SH induce un aumento gradual en la fluorescencia DAF-FM que se vuelve significativa después de 15 minutos de perfusión.

Estos resultados indican que el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en cardiomiocitos adultos. Interesantemente, el aumento en el ancho celular se desarrolla con anterioridad al aumento de la fluorescencia de DAF-FM sugiriendo que la producción de NO es consecuencia de la deformación de la membrana durante el hinchamiento hipotónico.

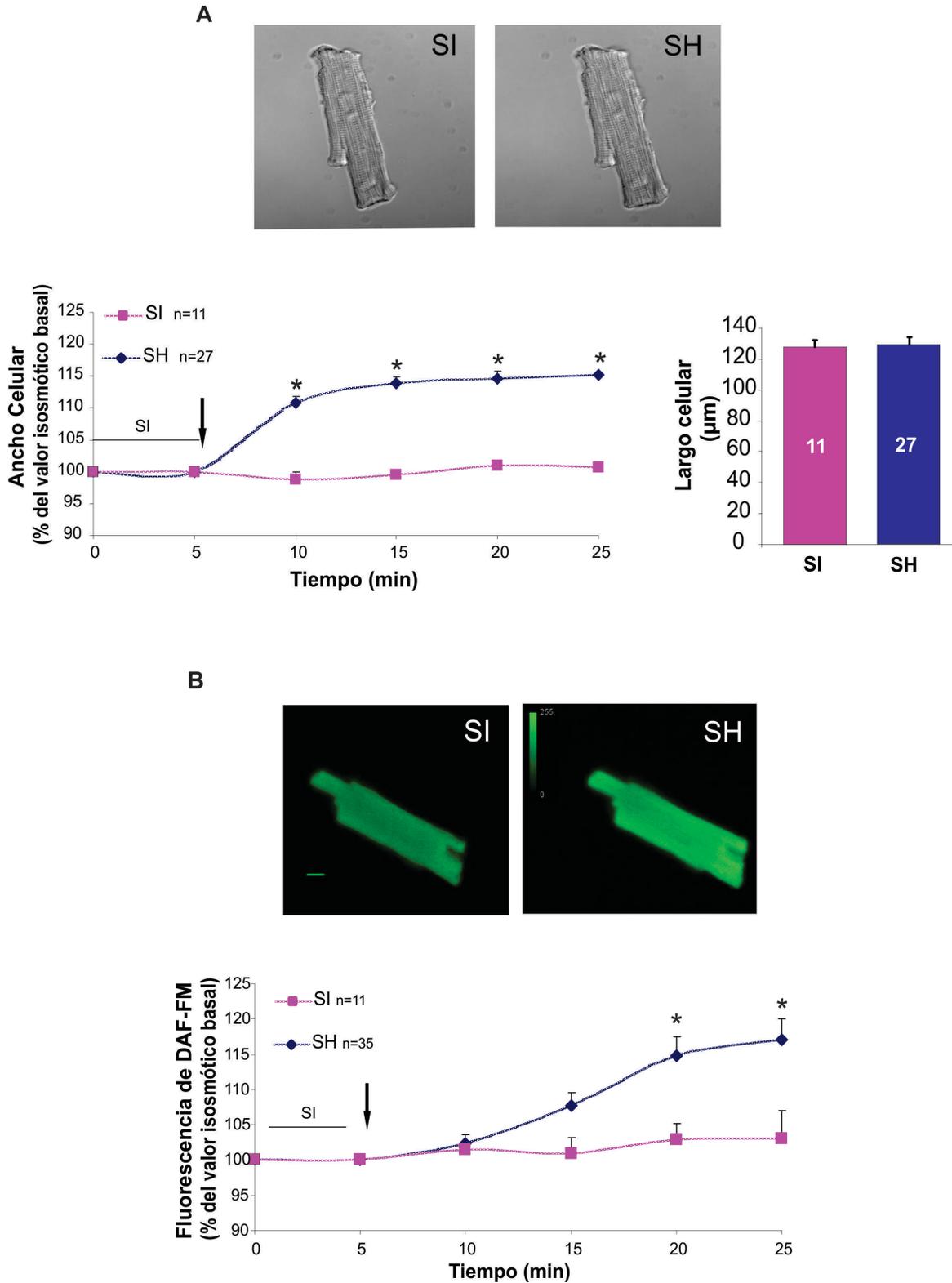


Fig 17: Imágenes representativas y resultados promedio del cambio en el ancho y largo celular (A) y de la fluorescencia de DAF-FM (B) durante el hinchamiento hipotónico. * $p \leq 0.05$ para SH vs SI a los mismos períodos de tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH (excepto las células que permanecen en SI).

2. La isoforma nNOS sería la responsable de la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico.

Como se mencionó en el apartado “Introducción”, hay tres isoformas productoras de NO: eNOS, nNOS e iNOS. Debido a que iNOS se induce en procesos inflamatorios, descartamos que esta isoforma sea la responsable de la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico debido a los tiempos agudos de nuestro protocolo.

Con el objetivo de identificar la fuente de producción de NO durante el hinchamiento hipotónico se midió la fluorescencia de DAF-FM en miocitos perfundidos con SH en ausencia o en presencia continua de 2.5 mM del inhibidor no-selectivo de la NOS (L-NAME) o 240 nM del inhibidor selectivo de nNOS (Nitroguanidina: NTG) o 1 μ M del inhibidor del eje PI3K/Akt (Wortmanina: WORT), el cual se ha demostrado que inhibe la activación de eNOS [25].

En la Figura 18 se pueden observar los resultados promedio mostrando el cambio en la fluorescencia de DAF-FM (panel A) y en el ancho celular (panel B) a lo largo del tiempo, de miocitos cardíacos de ratas perfundidos con SI y SH en ausencia y presencia de los inhibidores previamente mencionados. Además, en el panel C se muestra el cambio en la fluorescencia de DAF-FM producida por la perfusión con SI y SH en miocitos de ratones que tienen deletado funcionalmente el gen NOS1 de la isoforma nNOS (NOS1KO) con sus respectivos controles salvajes (WT).

En los resultados que se muestran en el panel A, se puede observar que tanto L-NAME como NTG inhiben completamente el aumento de la fluorescencia de DAF-FM inducida por SH. En contraste, WORT no inhibe la producción de NO inducida por el hinchamiento en miocitos cardíacos sugiriendo que la nNOS sería la isoforma responsable en la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico.

En el panel B se presentan los resultados promedio donde se puede observar que ninguno de los inhibidores utilizados afecta el grado de hinchamiento celular producido por el hinchamiento hipotónico. En otras palabras, los miocitos sufren el mismo grado de aumento en el ancho celular en presencia o ausencia de los inhibidores de las NOS confirmando que los cambios en la fluorescencia de DAF-FM son producto de la inhibición de la producción de NO y no debido a que los inhibidores impidan el hinchamiento celular.

Con el objetivo de confirmar la participación de la nNOS en la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico, a partir de una maniobra no-farmacológica, se midió la fluorescencia de DAF-FM en miocitos aislados de ratones que tienen deletado funcionalmente el gen NOS1 de la isoforma nNOS (NOS1KO: (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)) y en sus controles salvajes (C57BL/6: WT). Como se puede observar en la Figura 18, en el panel C, la perfusión con SH produjo un aumento significativo en la fluorescencia de DAF-FM en miocitos de ratones WT y este incremento no se observó en miocitos de ratones NOS1KO. Aunque no alcanza un nivel de significancia estadístico, se puede observar que los miocitos NOS1KO tratados con SH tienden a una mayor fluorescencia de DAF-FM comparado con miocitos NOS1KO tratados con SI. Estos resultados sugieren que la nNOS sería la principal fuente productora de NO en condiciones de hinchamiento hipotónico.

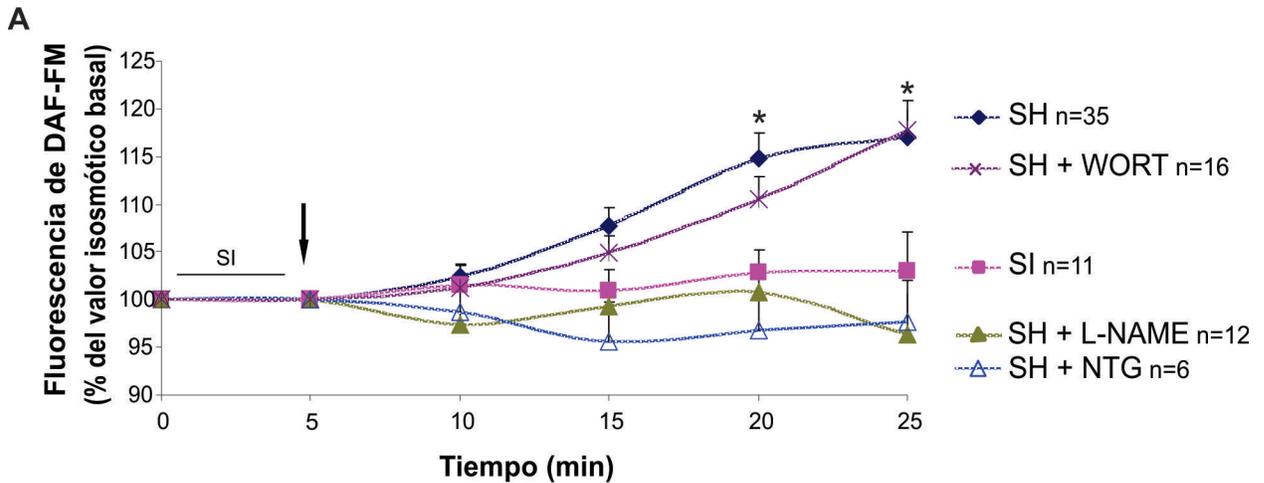


Fig 18 A: Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de inhibidores de las NOS en la fluorescencia de DAF-FM. * $p \leq 0.05$ para SH y SH+WORT vs SI, SH+L-NAME y SH+NTG a los mismos períodos de tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH o SH+inhibidores (excepto las células que permanecen en SI).

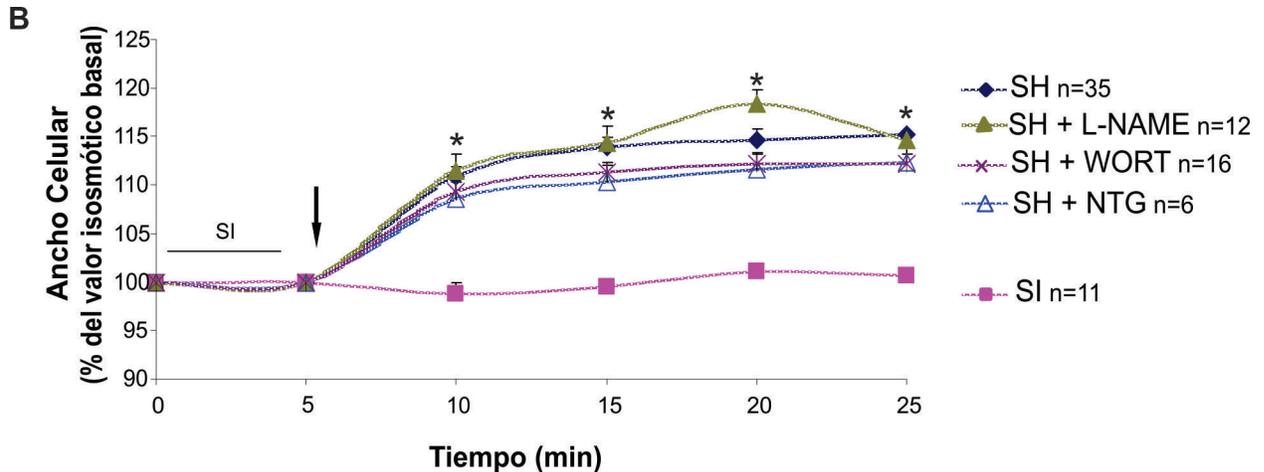


Fig 18 B: Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de inhibidores de las NOS en el ancho celular. * $p \leq 0.05$ para SH, SH+WORT, SH+L-NAME y SH+NTG vs SI a los mismos períodos de tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH o SH+inhibidores (excepto las células que permanecen en SI).

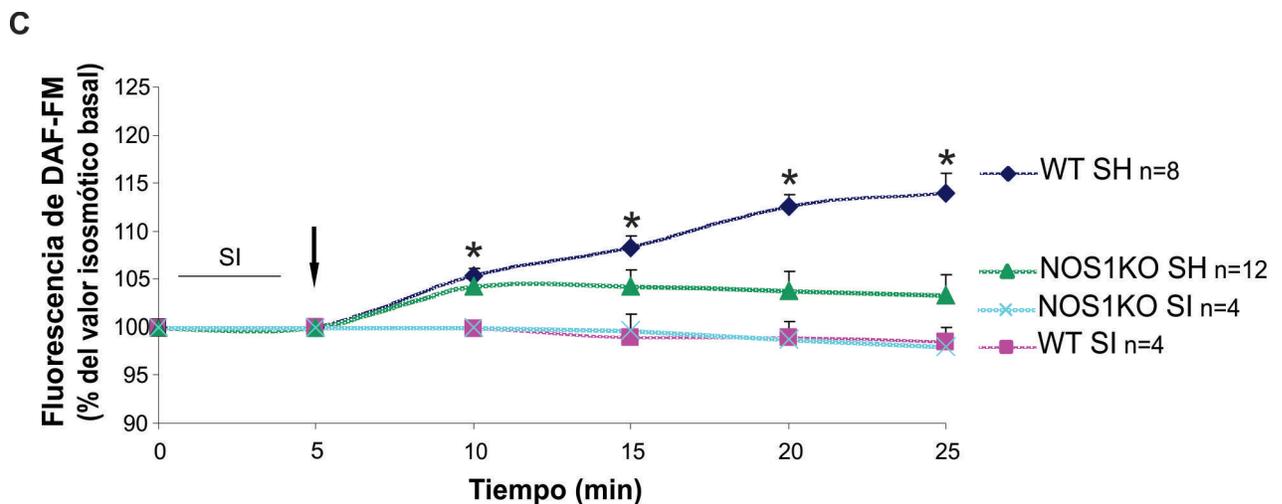


Fig 18 C: Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en miocitos de ratones NOS1KO y WT en la fluorescencia de DAF-FM. * $p \leq 0.05$ para WT SH vs WT SI a los mismos períodos de tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH (excepto las células que permanecen en SI).

3. La isoforma nNOS del RS sería la responsable de la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico.

Debido a que está publicado que la mitocondria se caracteriza por la presencia de isoformas de la NOS y que algunos autores afirman que podría ser la nNOS [22] evaluamos si la isoforma responsable de la liberación de NO durante el hinchamiento

hipotónico sería la nNOS ubicada en el RS o en la mitocondria. Para ello, pre-tratamos miocitos cardíacos durante media hora con 1 μM de Rianodina (RY) y 1 μM de Ácido Ciclopiazónico (CPA).

RY es un alcaloide que a dosis altas (1 μM) provoca que los RyR2 pierdan Ca^{2+} continuamente desde el RS y el CPA inhibe a la SERCA2a previniendo la recaptura de Ca^{2+} por el RS [193]. Dado que el funcionamiento de la nNOS que se localiza a nivel del RS depende de un adecuado manejo del Ca^{2+} a nivel de esta organela, utilizamos esta maniobra para abolir su funcionamiento y en estas condiciones examinar la actividad de la enzima.

La Figura 19 muestra el cambio de fluorescencia de DAF-FM a lo largo del tiempo durante la perfusión con SI, SH y SH+ (RY+CPA). Se puede observar que en ausencia de un RS funcional, se inhibe la producción de NO confirmando que la isoforma responsable en la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico es la nNOS ubicada en el RS.

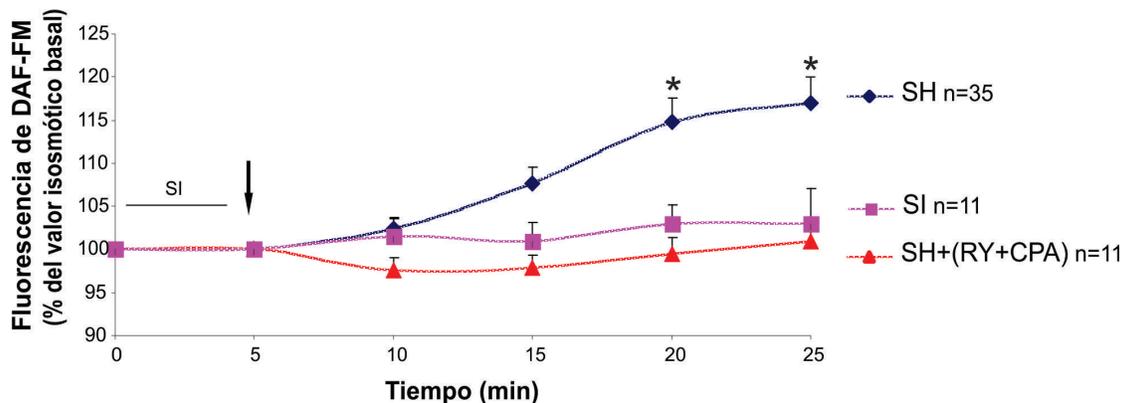


Fig 19: Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI, SH y SH+(RY+CPA) en la fluorescencia de DAF-FM. * $p \leq 0.05$ para SH vs SI y SH+(RY+CPA) a los mismos períodos de tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH o SH+ (RY+CPA) (excepto las células que permanecen en SI).

4. La integridad del citoesqueleto es requerida para la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico.

Teniendo en cuenta que el hinchamiento hipotónico produce la deformación de membranas celulares y del citoesqueleto subyacente, estudiamos cual sería el impacto de perfundir miocitos cardíacos con SH sobre la estructura de la membrana celular y sobre la arquitectura de los túbulos T.

La Figura 20 panel A muestra imágenes típicas de fluorescencia obtenidas en células cargadas con el indicador Di-8-ANNEPS, indicador que debido a su capacidad de ser lipofílico permite evaluar el estado de la membrana celular y el sistema de túbulos T [188]. Las imágenes representativas muestran que el hinchamiento hipotónico no afecta la integridad de las membranas ni la de los túbulos T.

Luego, éstas imágenes fueron procesadas con un software diseñado específicamente para evaluar la arquitectura de los túbulos T (Auto TT, Universidad de Iowa) [189]. Como se puede observar en los resultados promedio (panel B), la perfusión con SH produjo una tendencia a aumentar pero no alcanza valores significativos en el espacio entre los túbulos T (Espacio entre TT) y ninguna diferencia en el índice de integridad de TT (calculado como: la densidad de elementos transversales (TE) multiplicado por la regularidad de TE), confirmando que, bajo nuestras condiciones experimentales, las células mantienen integridad sarcolemal y de la red tubular. A pesar de que estos resultados sugieren que no hay detubulación durante el hinchamiento hipotónico, el aumento en el volumen celular debería promover la deformación de la red microtubular, lo cual es conocido por transmitir señales mecánicas desde la superficie celular hacia el complejo túbulo T-RS [194].

La implicancia potencial que tendrían los microtúbulos en la mecanotransducción a partir de la deformación de la célula inducida por el hinchamiento hipotónico para la activación de la nNOS se evaluó usando miocitos preincubados durante 2 hs con 10 μ M de colchicina, un poderoso agente antimitótico que se une a la tubulina y previene la polimerización de los microtúbulos [194]. En la figura 20 panel C se muestran resultados promedio del ancho celular y de la fluorescencia de DAF-FM en ausencia y presencia de colchicina, donde se puede observar que la inhibición de la polimerización microtubular, no afecta el grado de hinchamiento celular pero previene el aumento inducido por SH en la fluorescencia de DAF-FM. Estos resultados sugieren que la integridad del citoesqueleto es necesaria para la activación de la nNOS inducida por hinchamiento hipotónico y que el citoesqueleto estaría funcionando como un mecanotransductor para su activación.

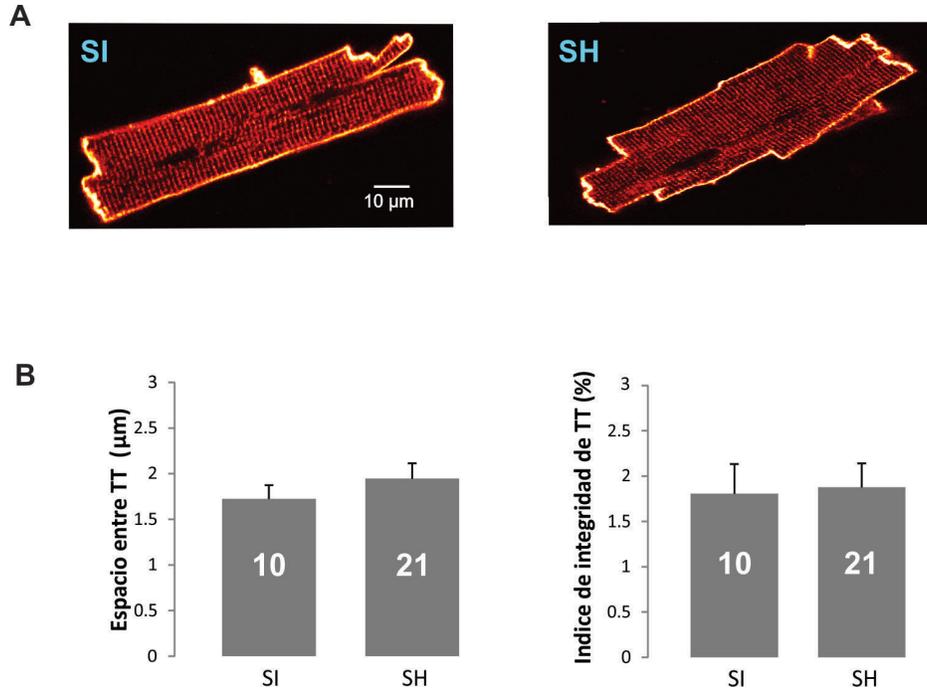


Fig 20: Imágenes representativas (panel A) y resultados promedio (B) que muestran el efecto de la perfusión con SI y SH en la integridad del sistema de túbulos *t* y de la membrana celular en células cargadas con Di-8-ANNEPS.

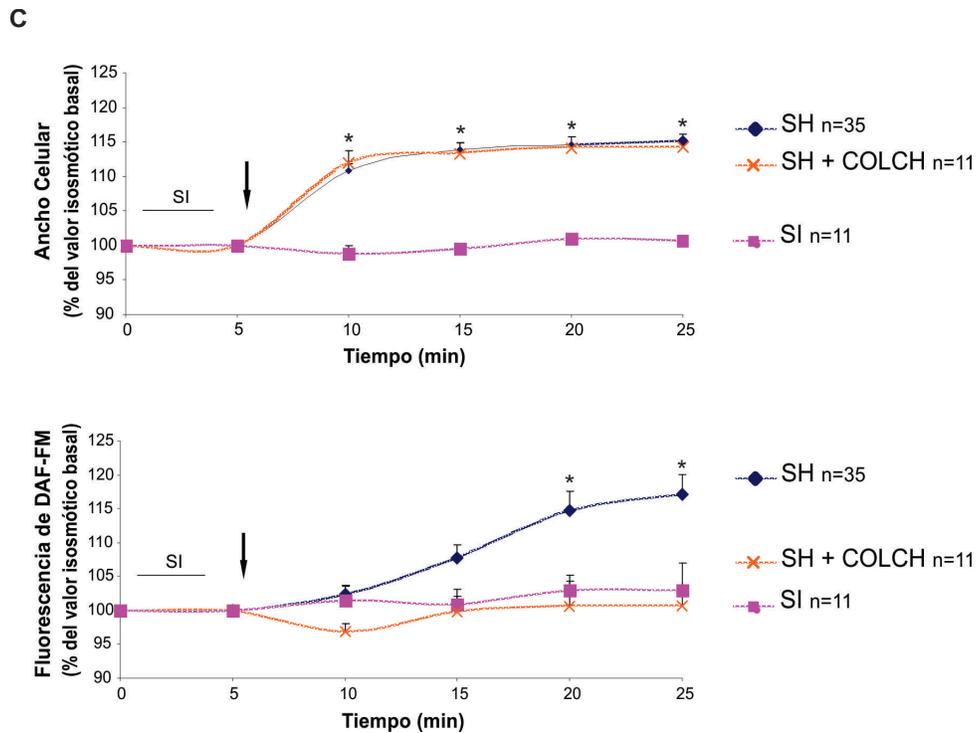


Fig 20 C: Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SI, SH y SH+COLCH en el ancho celular y la fluorescencia de DAF-FM. Para el ancho celular $*p \leq 0.05$ para SH y SH+COLCH vs SI y para la fluorescencia de DAF-FM $*p \leq 0.05$ para SH vs SH+COLCH y SI, a los mismos periodos de

tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH o SH+ COLCH (excepto las células que permanecen en SI).

5. La quinasa dependiente de AMP (AMPK) media la activación de nNOS durante el hinchamiento hipotónico.

Debido a que está descripto que la quinasa dependiente de AMP (AMPK) puede ser activada por estimulación mecánica en músculo cardíaco [104, 105] y que recientemente se demostró que promueve la fosforilación de nNOS aumentando la producción de NO [106], evaluamos la fluorescencia de DAF-FM en miocitos de rata expuestos a hinchamiento hipotónico en ausencia y presencia de 10 μ M del inhibidor específico de esta quinasa: Dorsomorfina (DORSO). Los miocitos fueron pre-incubados con esta droga como había sido previamente descripto [106].

Como se puede observar en la Figura 21, la perfusión con SH en presencia de DORSO inhibe el aumento de la fluorescencia de DAF-FM confirmando de este modo que la AMPK es la quinasa responsable de la activación de nNOS y en consecuencia de la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico.

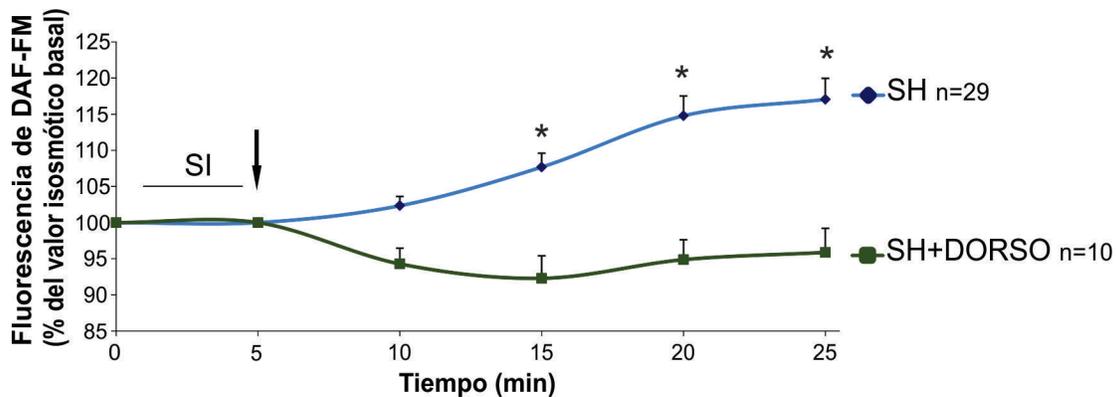


Fig 21: Resultados promedio que muestran el efecto de la perfusión con SH y SH+DORSO en la fluorescencia de DAF-FM. * $p \leq 0.05$ para SH vs SH+DORSO a los mismos períodos de tiempo. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH o SH+ DORSO.

6. El NO producido por la nNOS provee soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico.

Como se detalló en el apartado Introducción, ha sido previamente establecido que el hinchamiento hipotónico produce un efecto inotrópico negativo (EIN) en miocitos cardíacos adultos [64, 67, 69] y que, por otro lado, el NO modula la contractilidad cardíaca

[22]. Por ello, investigamos si la liberación de NO que se produce durante el hinchamiento hipotónico tendría algún impacto en el EIN asociado a este tipo de estrés osmótico.

La Figura 22 panel A muestra registros continuos del efecto de SH en ausencia y presencia de L-NAME sobre el acortamiento celular de miocitos contrayéndose mediante estimulación eléctrica a 0.5 Hz. Como se puede observar, el cambio de perfusión de una SI a una SH produce un EIN. Al mismo tiempo, se puede observar que al cabo de 25 minutos de perfusión con SH, la contractilidad se recupera llegando a valores similares a los obtenidos durante la perfusión con SI. Cuando los experimentos son desarrollados en presencia de L-NAME, el EIN se encuentra exacerbado y no se observa la recuperación en la contractilidad a los 25 minutos de perfusión.

En el panel B se muestran los resultados promedio del perfil de amplitud de contracción a lo largo del tiempo de miocitos expuestos a SH en ausencia y presencia de L-NAME. Se puede observar que la perfusión de miocitos cardíacos con SH produce un lento desarrollo del EIN que alcanza su máximo valor después de 15 minutos de perfusión y luego de 25 minutos comienza a recuperarse retornando a valores cercanos de contractilidad observados durante la perfusión con SI (Figura 22 A y B). Cuando los experimentos fueron realizados en presencia continua de 2,5 mM de L-NAME, esta reducción en la contractilidad se encuentra significativamente exacerbada y no se observa la recuperación después de 25 minutos de perfusión (Figura 22 A y B).

Resultados similares se observaron cuando se perfundieron miocitos cardíacos en presencia de 240 nM de NTG. Como se puede observar en la Figura 22, panel C, al igual que en los resultados obtenidos con L-NAME, la inhibición de la nNOS exagera el EIN producido durante el hinchamiento hipotónico e inhibe la recuperación que se produce luego de 25 minutos de exposición a SH.

Estos resultados en conjunto sugieren que el NO liberado por la nNOS provee soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico.

Luego evaluamos el mecanismo por el cual el NO estaría generando el soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico. Para ello, examinamos el efecto de este tipo de estrés sobre el manejo de Ca^{2+} intracelular en miocitos cargados con el indicador fluorescente Fura-2. En la Figura 23 se pueden observar trazos representativos de acortamiento celular con sus respectivos transitorios de Ca^{2+} de un miocito cardíaco estimulado a 0.5Hz

bajo condiciones isotónicas (n=7) y 15 minutos después de la perfusión con solución hipotónica en ausencia (n=16) y presencia de L-NAME (n=9) y NTG (n=11). Como se puede observar, la perfusión con SH reduce la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y la amplitud del acortamiento celular con respecto a la perfusión con SI. En presencia de L-NAME o NTG esta disminución se exagera sugiriendo que la liberación de NO dependiente de nNOS contribuye a sostener la función contráctil del miocito cardíaco durante el hinchamiento hipotónico mediante un mecanismo Ca^{2+} dependiente.

A

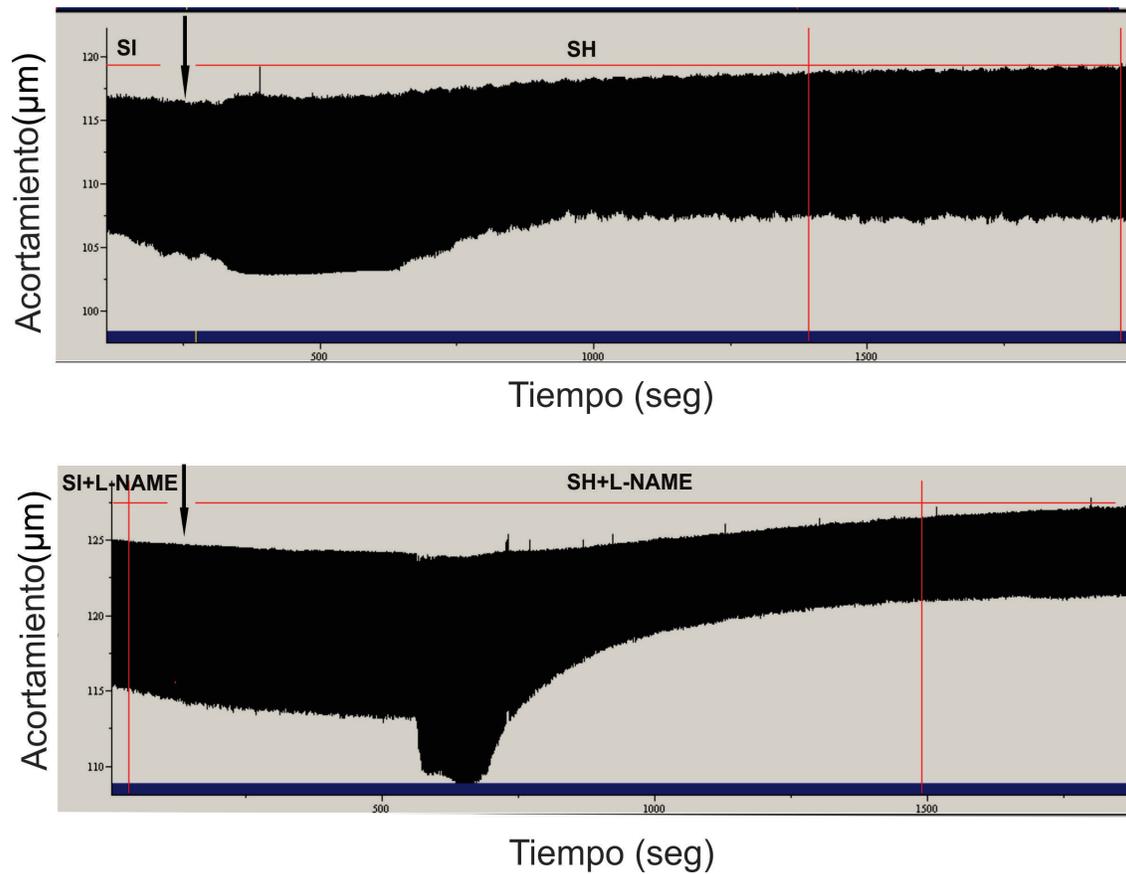


Fig 22 A: Registros continuos del efecto de SH en ausencia y presencia del inhibidor de las NOS (L-NAME) en el acortamiento celular de miocitos contrayéndose a 0.5 Hz. La flecha indica el momento de cambio de perfusión desde SI a SH o SI+L-NAME a SH+L-NAME.

B

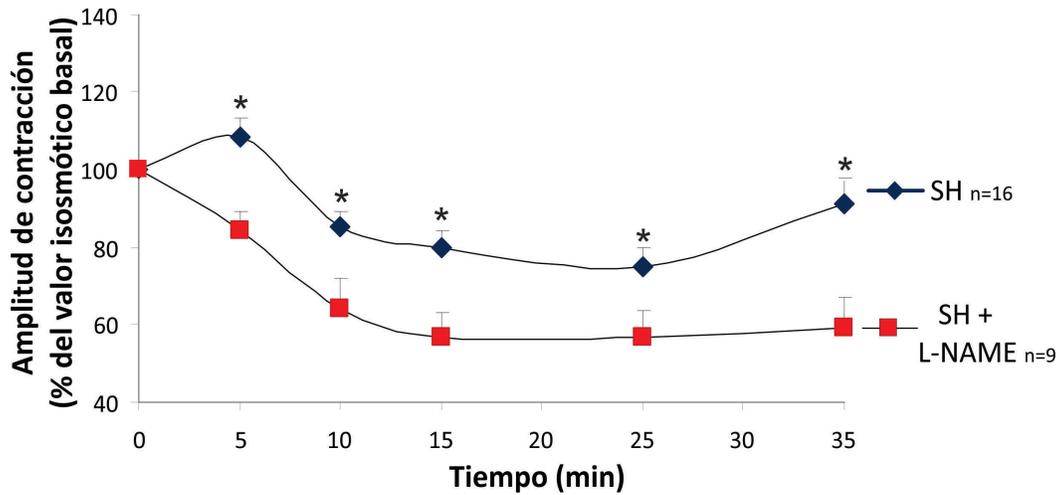


Fig 22 B: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos en SH en ausencia y presencia de L-NAME. * $p \leq 0.05$ para SH vs SH+L-NAME a los mismos periodos de tiempo.

C

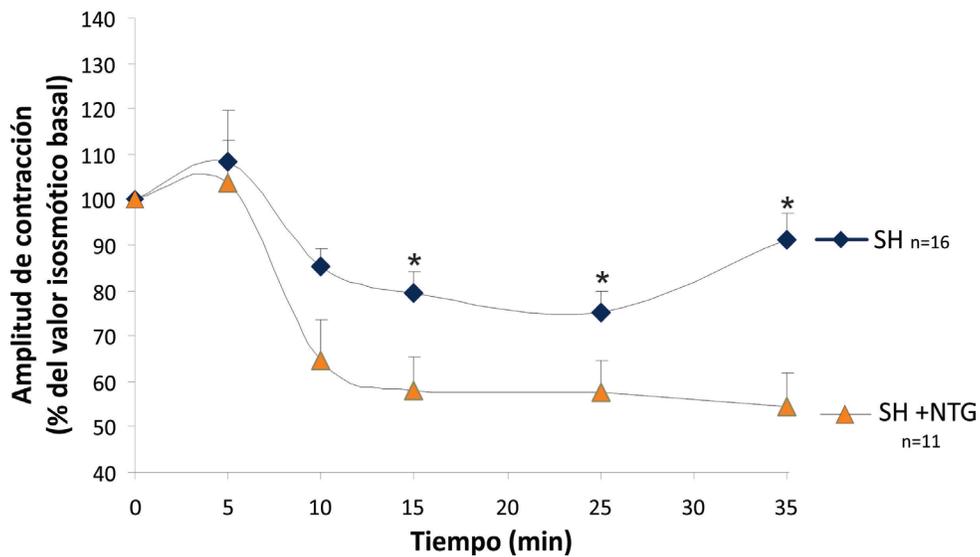


Fig 22 C: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos perfundidos con SH en ausencia y presencia de Nitroguanidina (NTG). * $p \leq 0.05$ para SH vs SH+NTG a los mismos periodos de tiempo.

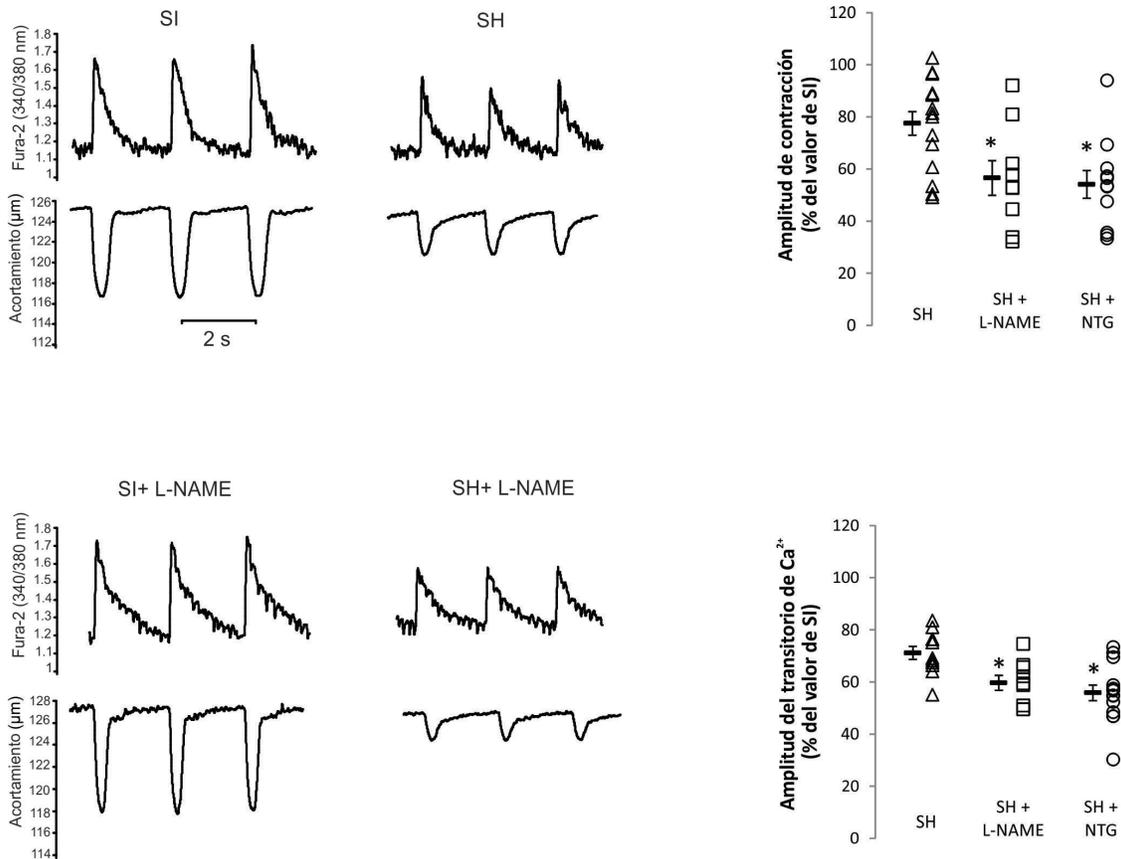


Fig 23: Trazos representativos y resultados promedio de los transitorios de Ca^{2+} y acortamiento celular durante el hinchamiento hipotónico en ausencia y presencia de L-NAME y NTG. Los resultados se muestran a los 15 min de perfusión expresados con respecto al valor en SI /SI+L-NAME/SI+NTG respectivamente. * $p \leq 0.05$ para SH vs SH+L-NAME y SH+NTG a los mismos períodos de tiempo

7. El soporte contráctil generado por el NO está dado por un mecanismo dependiente de GMPc.

Como se describió en el apartado “Introducción” el NO puede modular la función contráctil a partir de mecanismos dependientes e independientes de GMPc.

Uno de los mecanismos independientes de GMPc por los cuales el NO podría generar soporte inotrópico es a través de la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$). Está descrito que el NO liberado por la nNOS puede producir tanto NO como superóxido (O_2^-) [120] llevando a la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$) y que este radical libre en baja concentración es capaz de aumentar la contracción basal [169]. Con el objetivo de evaluar

si el soporte contráctil generado por el NO durante el hinchamiento hipotónico era debido a la producción de ONOO^- , realizamos experimentos en presencia de un barrador de radicales libres, MPG (N-2-mercaptopropionilglicina), con el objetivo de inhibir su producción.

En la Figura 24 se puede observar el curso en el tiempo en la amplitud de contracción de miocitos expuestos a SH en ausencia y presencia de MPG. Se puede observar que evitar la producción de O_2^- y por ende la de ONOO^- no afecta el EIN inducido por hinchamiento hipotónico sugiriendo que el NO estaría generando el soporte mediante otra vía.

Con el objetivo de evaluar si el soporte inotrópico era debido a nitrosilación o a un mecanismo dependiente de GMPc , realizamos experimentos en presencia y ausencia de $10 \mu\text{M}$ del inhibidor de la GCs: ODQ. Experimentos controles se realizaron en presencia de DMSO ya que es el solvente que permite la disolución del ODQ.

En la Figura 25 se puede observar el curso en el tiempo del cambio en la amplitud de contracción de miocitos expuestos a SH+DMSO y a SH+ODQ. Como se puede observar, la inhibición de la GCs exagera el EIN producido por la perfusión con SH sugiriendo que el soporte que provee el NO sobre la contractilidad sería a través de un mecanismo GMPc - dependiente.

Por otra parte, en la Figura 26 se muestran trazos representativos de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , acortamiento celular y resultados promedio de células expuestas a SI+DMSO (n= 7), SI+ODQ (n=7), SH+DMSO (n=7) o a SH+ODQ (n=8). Consistentemente con las Figuras 22 y 23, la exposición de miocitos a SH reduce la amplitud de contracción y el transitorio de Ca^{2+} con respecto a la perfusión con SI. La disminución en ambos parámetros se exagera en presencia de ODQ sugiriendo que el NO estaría generando el soporte contráctil previniendo una mayor disminución en el transitorio de Ca^{2+} en condiciones de hinchamiento hipotónico, bajo un mecanismo dependiente de GMPc .

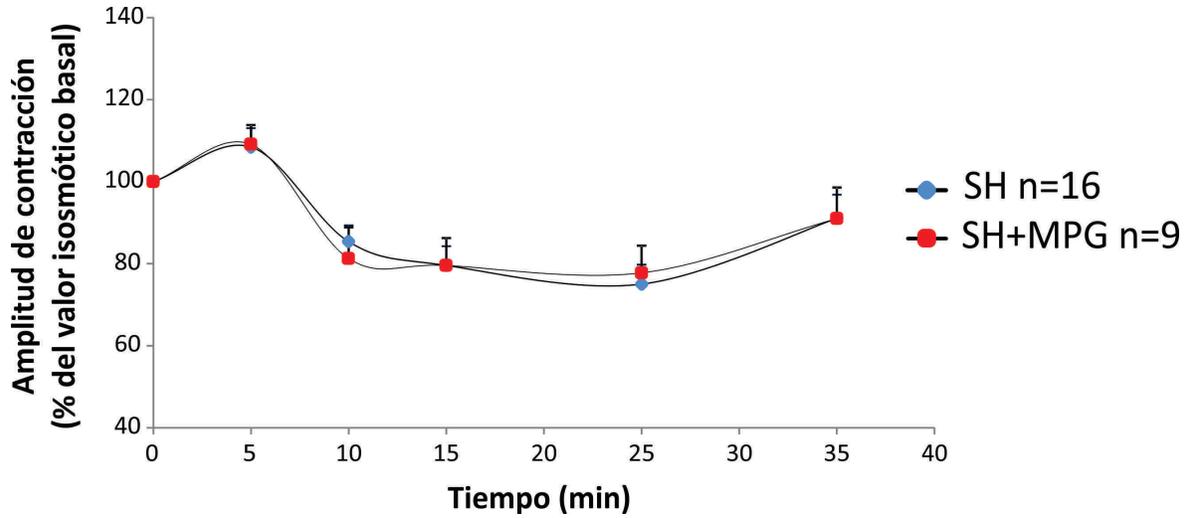


Fig 24: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos en SH y SH+MPG.

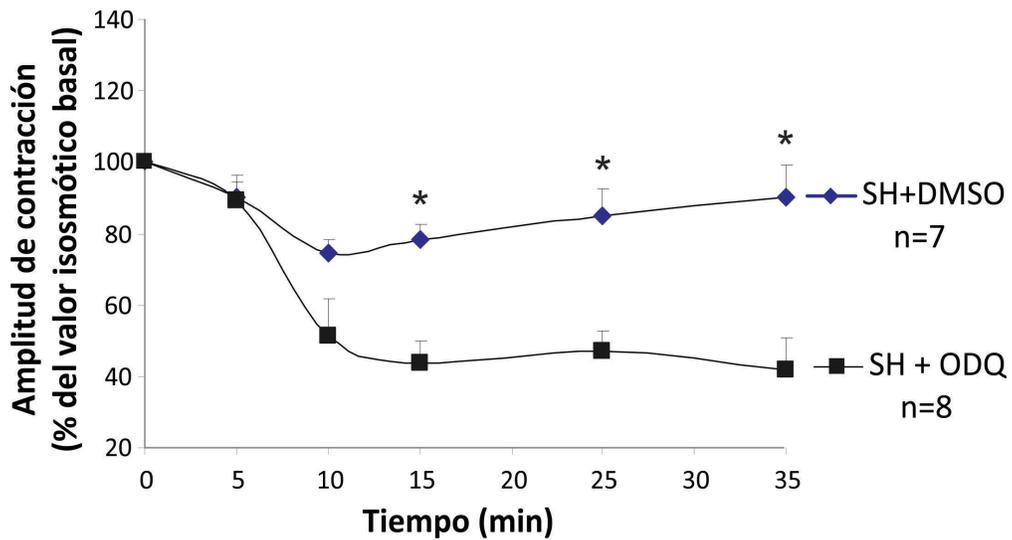


Fig 25: Resultados promedio donde se muestra el perfil contráctil de miocitos en SH+DMSO y SH+ODQ. * $p \leq 0.05$ para SH+DMSO vs SH+ODQ a los mismos períodos de tiempo.

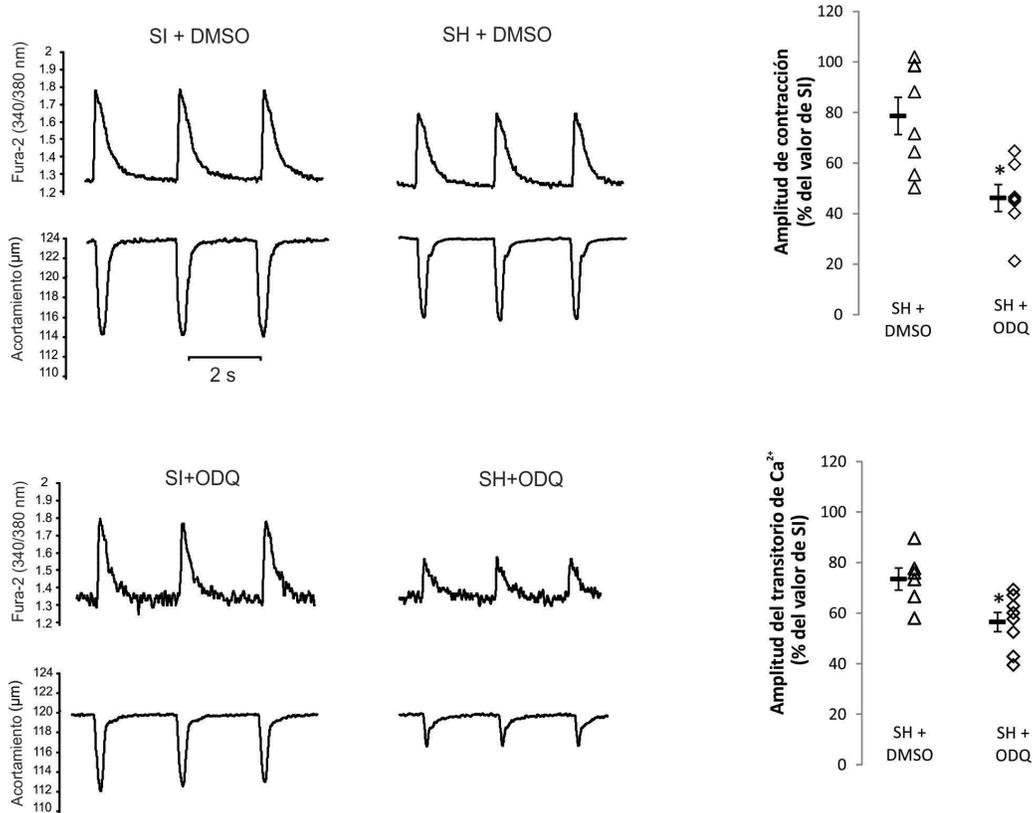


Fig 26: Trazos representativos y resultados promedio de acortamiento celular y transitorios de Ca^{2+} en ausencia y presencia de ODQ. Los resultados se muestran a los 15 min de perfusión expresados con respecto al valor en SI+DMSO/SI+ODQ respectivamente. * $p \leq 0.05$ para SH+DMSO vs SH+ODQ a los mismos periodos de tiempo.

8. El soporte contráctil del NO durante el hinchamiento hipotónico es a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente.

Debido a que está descrito que en el sistema cardiovascular el GMPc ejerce acciones fisiológicas a través de la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc o a través de la activación/inhibición de fosfodiesterasas [195], evaluamos la amplitud de contracción y la de los transitorios de Ca^{2+} en miocitos perfundidos con SH en ausencia y presencia del inhibidor específico de PKG: KT5823 para evaluar el mecanismo por el cual el GMPc estaría generando soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico.

En la Figura 27 se observan resultados promedio de la amplitud de contracción y del transitorio de Ca^{2+} de miocitos perfundidos con SH en ausencia y presencia de KT5823. Como se puede observar, inhibir a PKG exagera el EIN y disminuye la amplitud del transitorio de Ca^{2+} durante el hinchamiento hipotónico en igual magnitud a lo observado con L-NAME (Figura 22 A, B y 23), NTG (Figura 22 C y 23) y ODQ (Figuras 25 y 26)

confirmando que el mecanismo por el cual el NO derivado de la nNOS ejerce soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico es a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG.

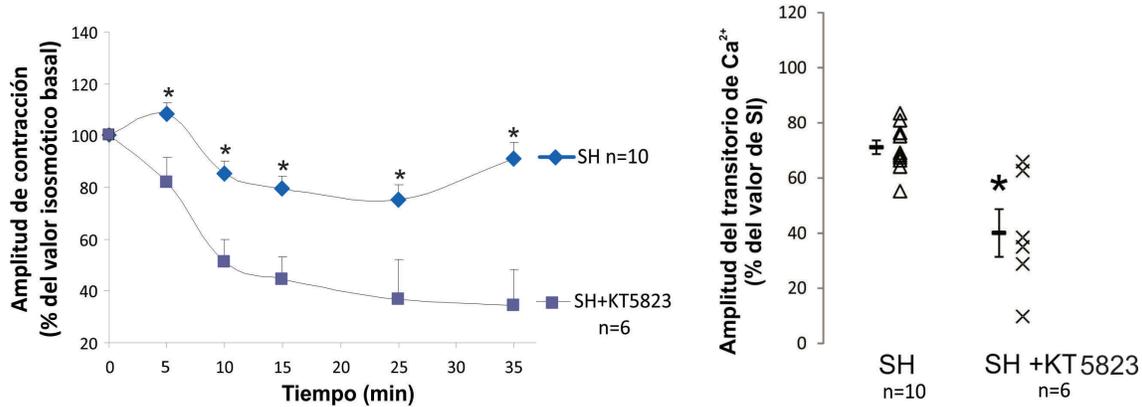


Fig 27: Resultados promedio mostrando el efecto de la perfusión con SH en el acortamiento celular y amplitud del transitorio de Ca²⁺ en ausencia y presencia del inhibidor de PKG (KT5823). *p ≤ 0.05 SH vs SH+KT5823 a los mismos períodos de tiempo.

9. El soporte contráctil brindado por el NO no se debe a cambios en el contenido de Ca²⁺ del RS.

Uno de los posibles mecanismos por los cuales el NO puede generar soporte contráctil es promoviendo un aumento en el contenido de Ca²⁺ del RS lo que aumentaría la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (“calcium induced-calcium release”) y así promovería una mayor cantidad de Ca²⁺ para la contracción.

Con el objetivo de examinar si el NO afecta el contenido de Ca²⁺ del RS expusimos a los miocitos a una alta concentración de cafeína (15 mM), maniobra conocida por producir la descarga total del contenido de Ca²⁺ del RS e inhibir su retoma hacia el RS a través de la SERCA2a. Luego evaluamos este parámetro a través de **1)** la medición de la amplitud del transitorio de Ca²⁺ a partir de la fluorescencia emitida por Fura-2 y **2)** el estudio de la integral de la corriente hacia adentro (“inward”) del NCX.

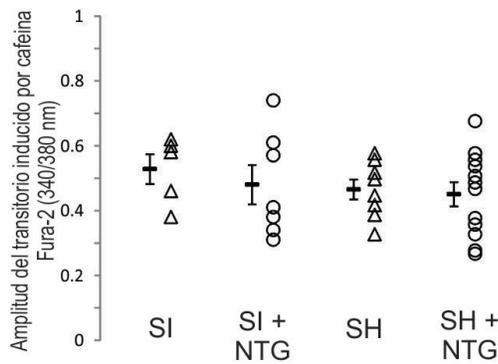
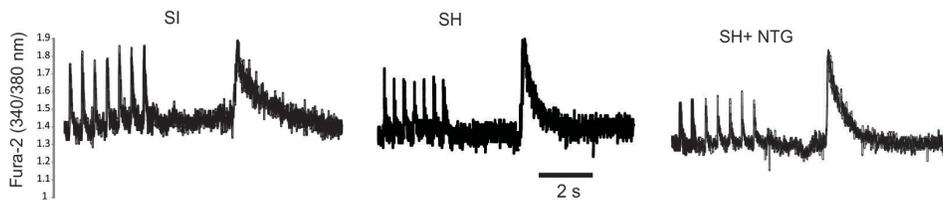
En la Figura 28 panel A se muestran trazos representativos y resultados promedio de la amplitud del transitorio de Ca²⁺ inducido por cafeína medido a partir de la fluorescencia de Fura-2 donde se observan los efectos de la perfusión con SI (n=5), SI+NTG (n=7), SH (n=8) y SH+NTG (n=12) en la liberación de Ca²⁺ del RS inducida por cafeína. En

concordancia con Brette et al. [64], la perfusión de miocitos con SH produjo una tendencia a una reducción en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína, pero ésta no fue significativa. Se puede observar que la perfusión en presencia de NTG tampoco generó ningún cambio en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} luego del pulso de cafeína.

Del mismo modo, en el panel B se muestran resultados promedio donde se puede observar que el transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína tampoco se ve modificado en presencia del inhibidor de GCs (ODQ).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el hinchamiento hipotónico no cursaría con cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS y que éste tampoco es modulado por la vía NO/GCs.

A



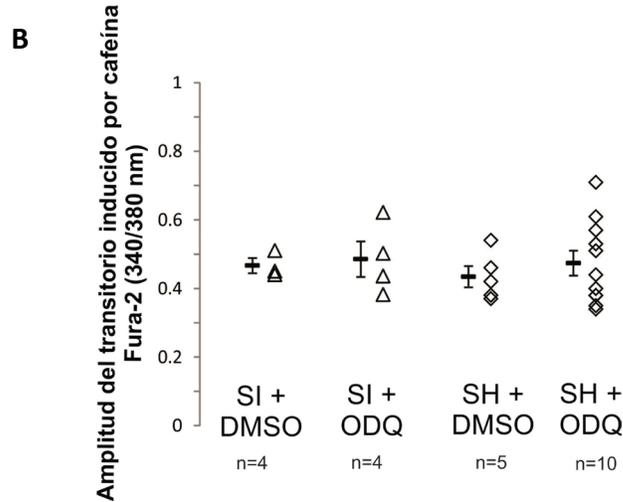


Fig 28: Panel A: trazos representativos y resultados promedio que muestran la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína durante la perfusión con SI y con SH en ausencia y presencia de NTG. Panel B: resultados promedio de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína durante la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de ODQ.

Debido a la posibilidad de que el hinchamiento celular promueva la dilución del indicador Fura-2 provocando que la carga de Ca^{2+} del RS esté subestimada, como otra estrategia para examinar si hay cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS durante el hinchamiento hipotónico evaluamos la integral de la corriente del NCX inducida por cafeína (I_{NCX}). En la Figura 29 se muestran registros típicos de la corriente del NCX inducida por cafeína y resultados promedio del estudio de la integral de la corriente del NCX que muestran que la I_{NCX} no se modifica durante la perfusión con SH+DMSO en comparación con SI+DMSO y que inhibir a la GCs no tiene ningún efecto sugiriendo que ni el hinchamiento hipotónico ni el NO estarían modulando esta corriente y por consiguiente el contenido de Ca^{2+} del RS.

Tomados en conjunto, estas dos maniobras confirman que ni el EIN producido por el hinchamiento hipotónico ni el soporte contráctil promovido por el eje NO/GMPc están determinados por alteraciones en el contenido de Ca^{2+} del RS.

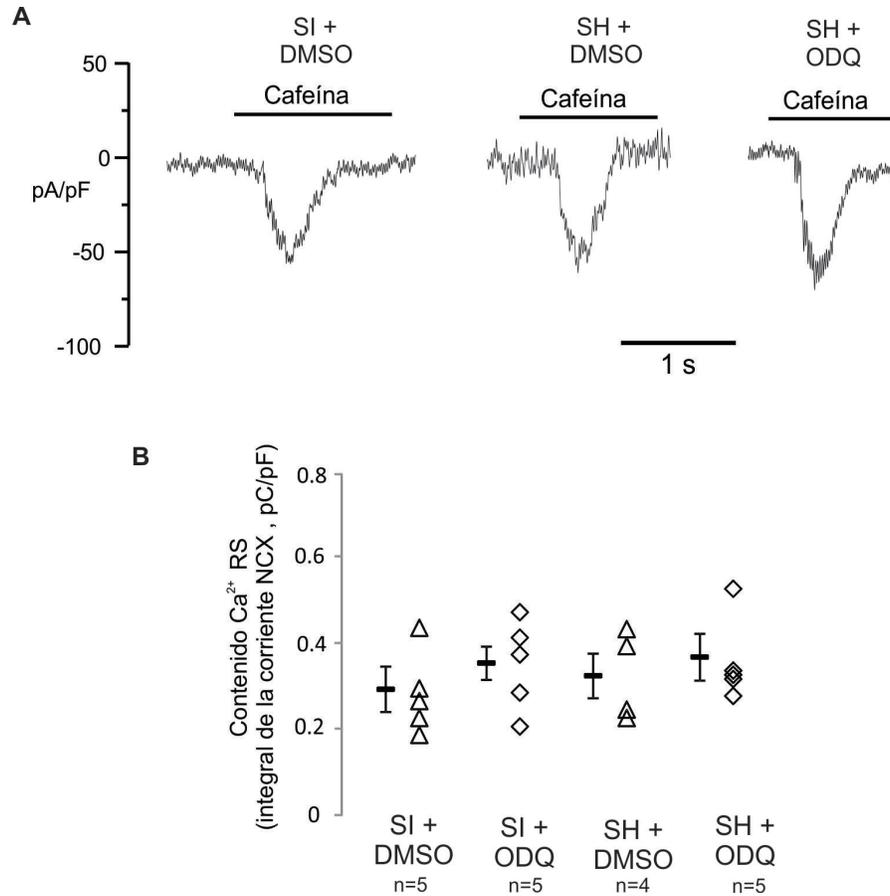


Fig 29: Registros típicos de la corriente del NCX inducida por cafeína (A) y resultados promedio del estudio de la integral de la corriente del NCX inducida por cafeína (B) durante la perfusión con SI y SH en ausencia y presencia de ODQ.

10. El soporte contráctil se debe a una mayor sensibilidad del RyR2 para un dado Ca^{2+} citosólico.

Teniendo en cuenta que la corriente de Ca^{2+} tipo L se encuentra disminuida durante el hinchamiento hipotónico [64] y que está descrito que la producción de NO ejerce efectos negativos sobre esta corriente [72], y que no observamos cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS, debe existir otro mecanismo por el cual el NO esté ejerciendo un soporte contráctil durante este tipo de estrés. Dado que la nNOS se localiza en el RS hipotetizamos que el NO liberado durante el hinchamiento hipotónico podría estar afectando al RyR2 y en consecuencia a la liberación de Ca^{2+} desde el RS. Para poner a prueba esta hipótesis, estudiamos las chispas y ondas de Ca^{2+} como indicativo de las propiedades de apertura del RyR2 en respuesta a un dado Ca^{2+} citosólico.

En la Figura 30 panel A se muestran imágenes representativas de chispas de Ca^{2+} y resultados promedio de la frecuencia de las mismas producidas durante la perfusión con SI, SI+ODQ, SH y SH+ODQ (SI y SH fueron suplementadas con DMSO como control del vehículo usado en la preparación de ODQ). Se puede observar que la perfusión con SH produce una disminución significativa en la frecuencia de aparición de chispas de Ca^{2+} con respecto a la perfusión con SI, como había sido descrito previamente [123]. Aunque la diferencia no llega a ser significativa, la frecuencia de chispas de Ca^{2+} se reduce aún más en presencia de SH+ODQ. Debido a que no pudimos observar una diferencia significativa en la frecuencia de chispas entre SH y SH+ODQ, esto podría deberse al hecho de que el hinchamiento hipotónico por sí solo produce una disminución en su frecuencia y una disminución mayor en presencia de ODQ sería difícil de detectar. Por ello, evaluamos la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{2+} como una medida de la propiedad de apertura del RyR2 en respuesta al Ca^{2+} citosólico.

En el panel B se pueden observar imágenes representativas de ondas de Ca^{2+} producidas debido a la perfusión de miocitos cardíacos con SH, y SH+ODQ, y los resultados promedio de la velocidad de propagación de estas ondas de Ca^{2+} a los 15 minutos de perfusión con SI, SI+ODQ, SH y SH+ODQ. Como se puede observar, cuando los miocitos fueron perfundidos con SH+DMSO, la velocidad de estas ondas fue mayor comparado a la perfusión con SI+DMSO sugiriendo que durante el hinchamiento hipotónico el RyR2 estaría sensibilizado para un dado Ca^{2+} citosólico. La perfusión con SH en presencia del inhibidor de la GCs revierte este aumento sugiriendo que el NO estaría sensibilizando al RyR2 mediante un mecanismo GMPc dependiente y generando de esta manera soporte contráctil durante el hinchamiento hipotónico.

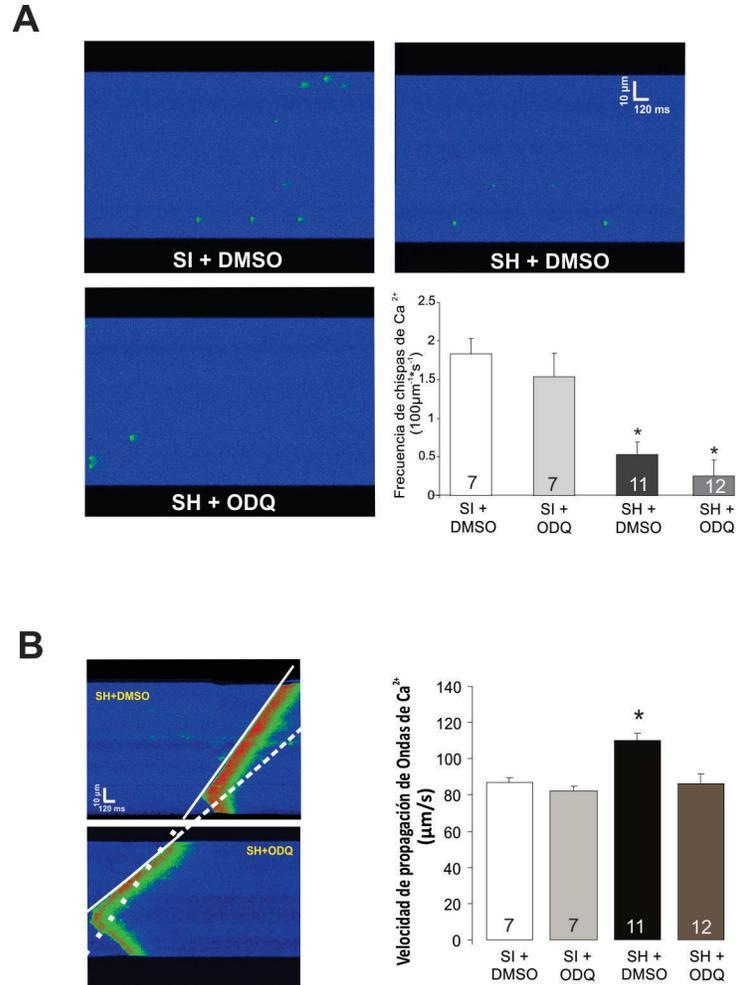


Fig 30: Imágenes típicas y resultados promedio de la frecuencia de chispas de Ca²⁺ (A) e imágenes típicas de ondas de Ca²⁺ y resultados promedio de la velocidad de propagación de las ondas de Ca²⁺ (B) durante la perfusión con SI+DMSO, SI+ODQ, SH+DMSO y SH+ODQ. Dentro de las barras se detalla el número de células analizadas para cada experimento. *p ≤ 0.05 SH+DMSO y SH+ODQ vs SI+DMSO a los mismos períodos de tiempo.

11. El sitio Ser2808 de RyR2 se encuentra fosforilado a través de un mecanismo GMPc/PKG dependiente.

Con el objetivo de evaluar cual sería el mecanismo subyacente por el cual el GMPc estaría afectando la función del RyR2 y conociendo el antecedente de que la proteína quinasa G (PKG) puede fosforilar el sitio Ser2808 *in vitro* [49], evaluamos el estado de fosforilación de este sitio del RyR2 durante el hinchamiento hipotónico.

La Figura 31 muestra los western blots representativos de la fosforilación del sitio Ser2808, en muestras de miocitos cardíacos aislados, luego de exponerlos durante 15 minutos a SI o a SH en ausencia o presencia de 10 μM de ODQ o 1 μM del inhibidor de

PKG (KT5823). Se utilizó la proteína de expresión constitutiva GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) como control de carga y normalización de los niveles de fosforilación.

A partir de los western blots representativos y de los resultados promedio, se puede observar que el sitio Ser2808 se encuentra fosforilado significativamente en presencia de SH comparado con SI. Este incremento en la fosforilación se inhibe en presencia de ODQ y de KT5823 sugiriendo que la función del RyR2 estaría afectada a través de la fosforilación del sitio Ser2808 por un mecanismo GMPc/PKG dependiente.

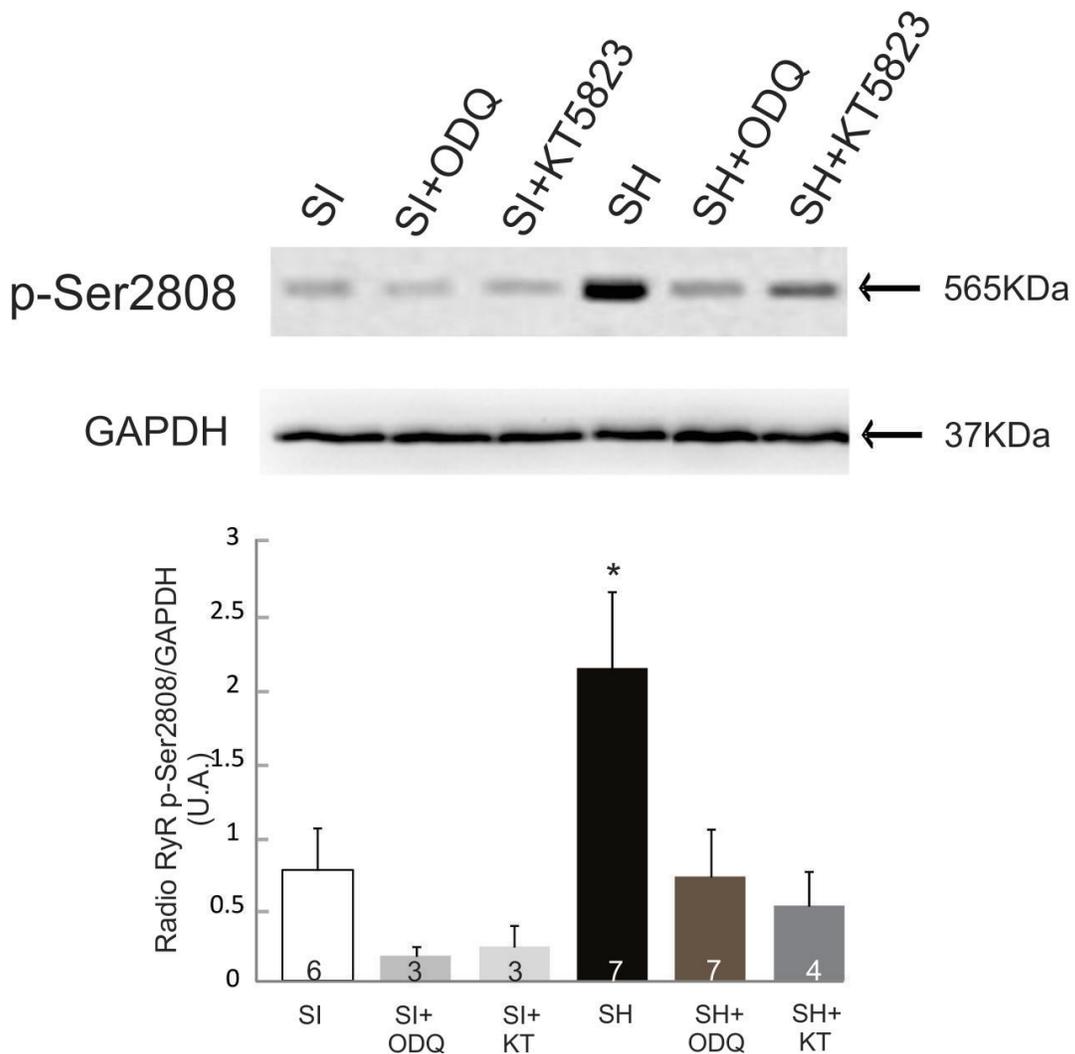


Fig 31: Western blots representativos y resultados promedio de la fosforilación del sitio Ser2808 de RyR2 en SI y SH en ausencia y presencia de ODQ y KT5823. Dentro de las barras se detalla el número de corazones de los cuales se extrajeron los miocitos para cada grupo experimental. *p ≤ 0.05 SH vs todos los grupos.

12. Exponer a miocitos cardíacos a una solución hipotónica evita su muerte debida al paso del tiempo. El NO no estaría jugando ningún papel durante este proceso.

Debido a que está descrito que la exposición de miocitos a SH promueve muerte celular [174, 176], estudiamos si el hinchamiento hipotónico en nuestras condiciones experimentales, afectaba la viabilidad celular. Para ello expusimos a los miocitos aislados de ratas adultas durante 10 hs en SI y SH y luego de ese tiempo evaluamos la viabilidad celular a través del estudio de su morfología como fue descrito en el apartado “Materiales y Métodos”.

En la Figura 32 panel A se pueden observar fotos representativas que muestran el efecto de la exposición a SI y SH al tiempo 0 y al cabo de 10 hs sobre la viabilidad celular. Como se puede observar, exponer a los miocitos aislados a SI disminuye su viabilidad al cabo de 10 hs. Sin embargo, cuando los miocitos se mantienen en SH esta muerte celular se previene.

En el panel B se muestran los resultados promedio donde se observa el cambio en el porcentaje de la viabilidad celular al cabo de 10 horas en SI y SH. Estos resultados sugieren que el hinchamiento hipotónico evitaría la muerte celular de miocitos cardíacos debida al paso del tiempo.

Teniendo en cuenta que el NO se ha descrito como una molécula que puede tener efectos antiapoptóticos [180, 182], examinamos si el aumento en la supervivencia observada en SH podría deberse a la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico. Para esto, realizamos el mismo protocolo detallado en la figura anterior pero en presencia de 2.5 mM de L-NAME. Como muestran los resultados promedio, pudimos observar que inhibir al NO no produce ningún efecto en la viabilidad celular en nuestras condiciones experimentales ya que no se observan diferencias entre los miocitos expuestos a SH y aquellos expuestos a SH+L-NAME al cabo de 10 hs sugiriendo que el NO no estaría involucrado en mantener la supervivencia de los miocitos provocada por la exposición a SH (Figura 33).

A

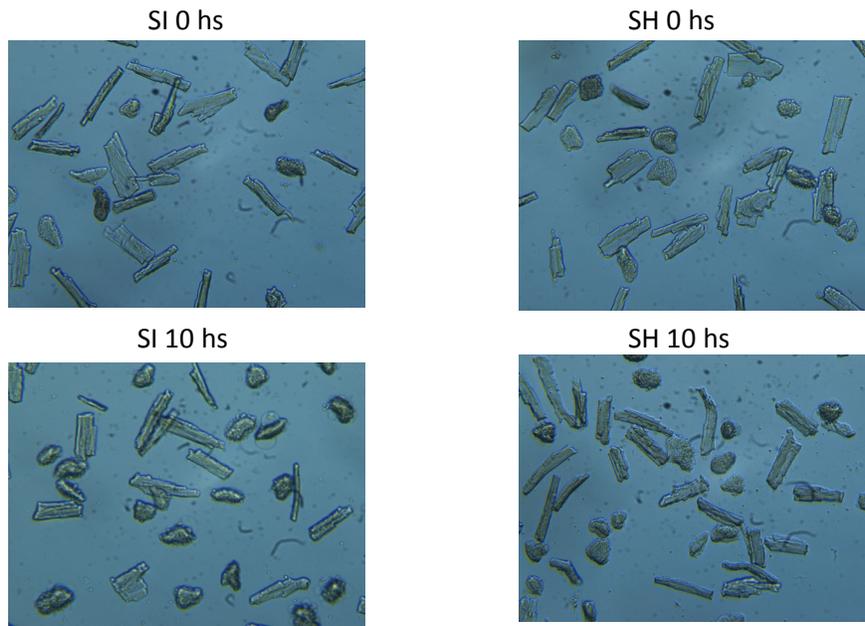


Fig 32 A: Fotos representativas de la exposición a SI y SH al tiempo 0 y al cabo de 10 hs sobre la viabilidad celular.

B

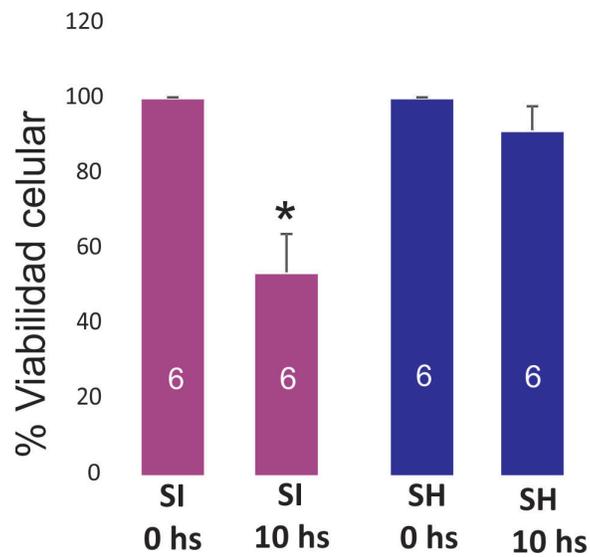


Fig 32 B: Resultados promedio mostrando el efecto de mantener a miocitos cardiacos durante 10 hs en SI y SH. Dentro de las barras se detallan el número de corazones de donde se extrajeron las células para cada experimento. *p < 0.05 para SI 10 hs vs SI 0 hs.

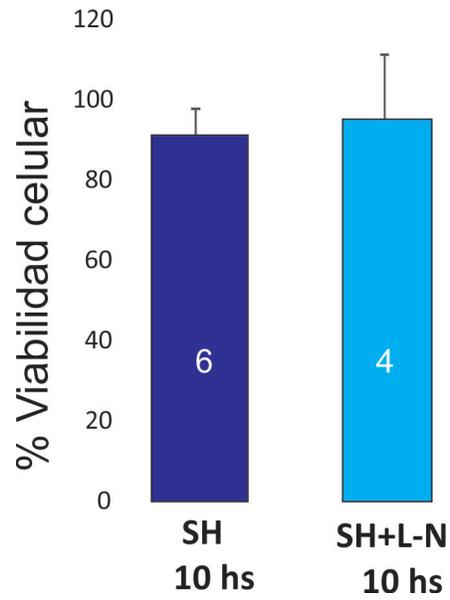


Fig 33: Resultados promedio mostrando el efecto de mantener a miocitos cardíacos durante 10 hs en SH y SH+L-NAME. Dentro de las barras se detallan el número de corazones de donde se extrajeron las células para cada experimento.

DISCUSSION

1. El hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en miocitos ventriculares de rata.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue determinar si el hinchamiento hipotónico promovía la liberación de NO en miocitos cardíacos adultos. Hay evidencia previa en otros tipos celulares (no cardíacos) donde se describe que el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO [25, 27]. Por otro lado, Vila Petroff et al. demostraron que el estiramiento axial de miocitos cardíacos promueve la liberación de NO [26]. Estos antecedentes sugieren que el estrés mecánico, con la consecuente deformación de la membrana, podría cursar con un aumento en la producción de NO. Sin embargo, si el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en miocitos cardíacos de rata no había sido estudiado hasta el momento. En este trabajo de tesis se demuestra que perfundir miocitos cardíacos adultos con una SH promueve el aumento en el ancho celular y la liberación de NO en comparación con la perfusión con una SI (Fig 17). Interesantemente, el aumento en el ancho celular se desarrolla con anterioridad al aumento de fluorescencia de DAF-FM, indicativo de la producción de NO, sugiriendo que la liberación de NO es consecuencia de la deformación de la membrana durante el hinchamiento hipotónico (Fig 17).

Existen tres isoformas de la NOS capaces de producir NO en el miocardio: nNOS, eNOS e iNOS. Las primeras dos isoformas mencionadas se expresan constitutivamente y producen bajos niveles de NO mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} y calmodulina [15], mientras que la iNOS se expresa durante procesos inflamatorios y produce mayor cantidad de NO que las otras isoformas bajo un mecanismo independiente de Ca^{2+} [157]. Debido a estas características y a los tiempos agudos de nuestro protocolo descartamos que la iNOS sea la responsable de la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico.

Con el objetivo de determinar cual/es de las isoformas era la responsable de la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico evaluamos la fluorescencia de DAF-FM en miocitos perfundidos con SI y SH en ausencia y presencia de un inhibidor inespecífico de las NOS (L-NAME), de un inhibidor específico de la nNOS (NTG: nitroguanidina) y de un inhibidor del eje PI3k/Akt (WORT: wortmanina) como inhibidor de la eNOS. La utilización de wortmanina como inhibidor de eNOS se realizó considerando que el hinchamiento hipotónico en miocitos cardíacos está asociado con una reducción en el transitorio de

Ca^{+2} [64, 69] y a que hay evidencia reciente que demuestra que Akt fosforila a esta isoforma por un mecanismo independiente de Ca^{2+} [132].

Los resultados que se exponen en la Figura 18 A demuestran que la perfusión de miocitos cardíacos con SH en presencia de L-NAME o NTG previnieron completamente el aumento de fluorescencia de DAF-FM, mientras que en presencia de WORT la liberación de NO no se vio afectada. Dado que los inhibidores (L-NAME y NTG) no afectaron el grado de hinchamiento celular durante la perfusión con SH, descarta que la ausencia en los cambios en la fluorescencia observadas en presencia de los mismos, sea debida a un artefacto causado por que estos inhibidores hayan impedido el hinchamiento celular, confirmando que los resultados obtenidos se pueden atribuir al efecto inhibitorio de estos agentes sobre las enzimas (Fig 18 B).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la nNOS es la principal enzima involucrada en la liberación de NO durante el hinchamiento hipotónico. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con un reporte donde se indica que, en células endoteliales, la producción de NO inducida por hinchamiento hipotónico es mediada por la activación de eNOS independientemente de Ca^{+2} [25]. Debido a esto, evaluamos la fluorescencia de DAF-FM en miocitos provenientes de ratones que no expresan la nNOS (NOS1KO) y sus respectivos controles (C57BL/6: WT) durante la perfusión con SI y SH. Pudimos observar que la producción de NO se inhibió en miocitos provenientes de ratones NOS1KO perfundidos con SH (Fig 18 C). Sin embargo, esta inhibición no fue total, por lo que no nos permite descartar que alguna otra isoforma de la NOS esté contribuyendo al aumento de NO durante el hinchamiento hipotónico, de igual modo, la nNOS sería la isoforma principal en la producción de NO.

Por otro lado, debido a que está descrito que la nNOS está presente en el RS [88] y en la mitocondria [21], evaluamos la fluorescencia de DAF-FM en miocitos perfundidos con SI y SH en ausencia y presencia de rianodina (RY) y ácido ciclopiazónico (CPA) para poder discernir cuál de las isoformas de la nNOS era la involucrada en la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico. La utilización de estas drogas, provoca la inhibición de la función del RS ya que RY a dosis altas (1 μM) provoca que los RyR2 pierdan Ca^{2+} continuamente desde el RS y el CPA inhibe a la SERCA2a previniendo la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS promoviendo el vaciamiento del contenido de Ca^{2+} de esta organela [193]. Dado que la nNOS se localiza a nivel del RS y su funcionamiento depende

de un adecuado manejo del Ca^{2+} a nivel de esta organela, utilizamos esta maniobra para abolir su funcionamiento y en estas condiciones examinar la actividad de la enzima.

Pudimos observar, que la producción de NO inducida por hinchamiento hipotónico se previno en presencia de RY+CPA (Fig 19) sugiriendo que la isoforma nNOS del RS, y no la de la mitocondria [21], sería la responsable de la producción de NO durante el hinchamiento hipotónico.

2. El hinchamiento hipotónico no afecta la integridad del sarcolema.

En este trabajo pudimos observar que la perfusión de miocitos cardíacos con SH promueve un aumento en el ancho pero no en el largo celular (Fig 17 A). Estos resultados son consistentes con los publicados por Bell et al. [4]. Por otro lado, Brette et al. también demostraron que la perfusión con SH promueve un aumento en el ancho celular sin embargo, ellos observaron que el largo celular también se ve afectado aunque en menor medida [64]. Esta diferencia entre nuestros resultados y los de Brette et al. podría deberse a diferencias en la osmolaridad de la SH, ya que la solución utilizada por Brette et al. es de menor osmolaridad (180 mOsm) que la utilizada en nuestro trabajo (217 mOsm) sugiriendo que el aumento en estos parámetros celulares podría ser dependiente del grado de osmolaridad de la solución. Perfundir los miocitos con solución isotónica no afecta el grado de hinchamiento celular (Fig 17 A).

Está descrito que el estrés osmótico puede producir la ruptura de los túbulos T (TT) de miocitos cardíacos de rata promoviendo efectos deletéreos sobre importantes proteínas involucradas en el AEC [196]. Brette et al. observaron que exponer a los miocitos a una solución hipotónica promueve la formación de vesículas sarcolemales pero no observaron una pérdida en la estriación celular indicativo de detubulación. Sin embargo, observaron que el espacio entre los TT estaba aumentado en células expuestas a SH en comparación con células expuestas a SI y lo atribuyeron al aumento que habían observado en el largo celular durante el hinchamiento hipotónico [64].

En este trabajo pudimos observar en miocitos cargados con el indicador lipofílico Di-8-ANNEPS que, consistentemente con Brette et al., exponer a miocitos cardíacos a una SH no promueve detubulación ya que observamos que el hinchamiento hipotónico no afecta la integridad de las membranas ni la de los TT (Fig 20 A y B). Sin embargo y contrariamente a lo expuesto por este grupo, no observamos la presencia de vesículas sarcolemales ni la diferencia en el espacio entre los TT (Fig 20 A y B) probablemente

debido a que nosotros no observamos cambios en el largo celular durante el hinchamiento hipotónico.

3. El citoesqueleto sensoría la deformación de la membrana durante el hinchamiento hipotónico y, a través de la AMPK, lo traduciría en la activación de nNOS.

Teniendo como antecedente que está descripto que el aumento en el volumen celular promueve la deformación de la red microtubular y que este hecho es conocido por transmitir señales mecánicas desde la superficie celular hacia el complejo TT-RS [194] evaluamos el mecanismo que subyace a la activación de nNOS y la consecuente producción de NO y la implicancia que tendrían los microtúbulos en la mecano-transducción debido a la deformación celular inducida por hinchamiento hipotónico. Observamos que perfundir a los miocitos con SH en presencia de un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, colchicina, inhibió la liberación de NO sugiriendo que la integridad del citoesqueleto es requerida para la activación de nNOS y la consecuente liberación de NO (Fig 20 C). Los mecanismos por los cuales el citoesqueleto podría promover la activación de nNOS no son claros pero, dada la proximidad de los microtúbulos con el RS (10^{-8}m) se puede pensar que los microtúbulos podrían intervenir en la transmisión física del estrés mecánico desde el sarcolema hasta el RS resultando en la activación de nNOS. En concordancia con lo expuesto, se ha visto que varios componentes de la red del citoesqueleto pueden modular la actividad de la NOS y la producción de NO [197].

Se sabe que el citoesqueleto y la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) pueden interactuar directamente en músculo cardíaco [198]. Por otro lado, está descripto que el estrés mecánico puede activar a esta quinasa en músculo cardíaco [104, 105] y que es capaz de fosforilar a nNOS en diferentes tipos celulares [106, 199].

Evaluamos si esta quinasa era la responsable de la activación de nNOS durante el hinchamiento hipotónico a partir de la pre-incubación y perfusión de miocitos cardíacos con SH en presencia de dorsomorfina, inhibidor de la AMPK. Como se puede observar en la Figura 21, este inhibidor previno la fluorescencia de DAF-FM confirmando de este modo que el hinchamiento hipotónico y la consecuente deformación del citoesqueleto activarían a la AMPK y esto promovería la activación de nNOS llevando a la producción de NO.

4. Prevenir la liberación de NO exagera el efecto inotrópico negativo producido por hinchamiento hipotónico.

Ha sido demostrado que el hinchamiento hipotónico produce un efecto inotrópico negativo (EIN) en miocitos cardíacos adultos [64, 69]. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este proceso no están completamente estudiados. Brette et al. [64] demostraron que la reducción en el transitorio de Ca^{2+} inducida por el hinchamiento hipotónico es mediada por una reducción en la $I_{Ca,L}$ y una disminución en la liberación de Ca^{2+} del RS en ausencia de cambios en el contenido de Ca^{2+} del mismo. Consistentemente, nuestros resultados demuestran que el hinchamiento hipotónico produce una reducción en la contractilidad asociada a una disminución en los transitorios de Ca^{2+} (Fig 23). Interesantemente, también se demostró en presencia continua de SH, que después de alcanzar el máximo EIN, la contractilidad comienza a recuperarse (Fig 22). Al igual que Bell et al. [4], no hubo evidencia de una disminución del volumen celular a través del mecanismo de RVD (por sus siglas en inglés: *regulatory volumen decrease*) durante toda la duración del protocolo (Fig 17 A) de modo que este mecanismo no podría explicar la recuperación de la contractilidad observada hacia el final del protocolo experimental.

Debido a que está descrito que el NO tiene varios efectos sobre el AEC cardíaco, determinados al menos en parte, por la diferente compartimentalización subcelular de las isoformas de la NOS [88], examinamos si la liberación de NO inducida por el hinchamiento hipotónico tendría algún impacto funcional en el EIN observado durante este proceso. En este trabajo se demuestra que la inhibición de la producción de NO con el inhibidor inespecífico de las NOS (L-NAME) y con el inhibidor específico de la nNOS (nitroguanidina) exagera el EIN inducido durante el hinchamiento hipotónico (Fig 22) e impide la recuperación contráctil observada cuando las células se mantienen en solución hipotónica durante períodos de tiempo prolongados (Fig 22). Aunque este trabajo de tesis no estuvo dirigido a dilucidar los mecanismos que promueven el EIN inducido por hinchamiento hipotónico, los resultados aquí presentados sugieren que el NO derivado de la nNOS provee un mecanismo de soporte contráctil que previene un mayor impacto del hinchamiento celular sobre la función contráctil cardíaca a través de la modulación del Ca^{2+}_i previniendo que éste disminuya excesivamente (Fig 23).

5. El soporte contráctil está mediado a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG.

Está bien establecido que el NO puede modular el AEC cardíaco a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de GMPc [70]. Con el objetivo de evaluar la cascada de señalización mediante la cual el NO podría estar generando soporte inotrópico durante el hinchamiento hipotónico realizamos experimentos en presencia del inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (GCs): ODQ y en presencia de un barrador de radicales libres: MPG. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la GCs (Fig 25 y 26) mimetiza el efecto obtenido inhibiendo la NOS con L-NAME Y NTG (Fig 22 y 23). Debido a que la perfusión con SH en presencia de MPG no tuvo impacto sobre el EIN producido por el hinchamiento hipotónico (Fig 24), estos resultados sugieren que mecanismos dependientes de GMPc estarían mediando el soporte y la recuperación contráctil y que no sería a través de mecanismos independientes de GMPc.

Debido a que está descrito que GMPc puede modular la contractilidad a través de la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc o a través de la activación/inhibición de fosfodiesterasas [195], evaluamos la amplitud de contracción y la de los transitorios de Ca^{2+} en miocitos perfundidos con SH en ausencia y presencia del inhibidor específico de PKG: KT5823. La perfusión de miocitos con SH en presencia de KT5823 exagera el EIN producido por el hinchamiento hipotónico (Fig 27) confirmando que el soporte contráctil estaría mediado por un mecanismo GMPc/PKG dependiente.

6. El soporte contráctil brindado por el NO no se debe a cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS.

Consistentemente con otras publicaciones [64], a partir del estudio de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína, pudimos observar que el hinchamiento hipotónico se asocia con una tendencia, no significativa, a una reducción en los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína, sugiriendo que el hinchamiento hipotónico no afecta el contenido de Ca^{2+} del RS y que éste tampoco es modulado por NO (Fig 28 A). Debido a que existe la posibilidad de que el aumento del volumen celular por la perfusión con SH tenga efectos sobre la correcta detección de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína, provocada por una posible dilución del indicador Fura-2 y por ende el contenido de Ca^{2+} del RS esté subestimado, evaluamos la integral de la corriente del NCX inducida

por cafeína como un estimativo del contenido de Ca^{2+} del RS [65] y observamos que no se veía modificada durante el hinchamiento hipotónico (Fig 29). Estas dos maniobras permitieron confirmar que ni el EIN producido por el hinchamiento hipotónico ni el soporte contráctil promovido por el eje NO/GMPc estarían determinados por alteraciones en el contenido de Ca^{2+} del RS.

7. El soporte contráctil brindado por el NO se debe a una mayor sensibilización del RyR2 para un dado Ca^{2+} citosólico.

Para verificar si el soporte contráctil promovido por el NO se debe, al menos en parte, a un efecto estimulador dependiente de GMPc en la liberación de Ca^{2+} por el RyR2, monitoreamos la dinámica de las chispas de Ca^{2+} bajo condiciones isotónicas e hipotónicas en ausencia y presencia de ODQ. Observamos que el hinchamiento hipotónico redujo la frecuencia de chispas de Ca^{2+} como había sido publicado anteriormente [123] pero no detectamos una disminución significativa en la frecuencia de éstas en presencia de ODQ (Fig 30 A). Sin embargo, encontramos que, durante el hinchamiento hipotónico, cuando aparecen ondas de Ca^{2+} , su velocidad de propagación estaba significativamente aumentada comparado con la condición isotónica y que este aumento se inhibía en presencia de ODQ (Fig 30 B). Las ondas de Ca^{2+} representan la liberación masiva de Ca^{2+} del RS hacia el citosol, mediante la apertura sucesiva de múltiples canales de RyR2, que se propaga a lo largo de la célula mediante el fenómeno de “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ”, en el cual el aumento local en la concentración citosólica de Ca^{2+} en una zona sirve como estímulo para desencadenar la apertura de RyR2 en zonas vecinas. La velocidad con la que estas ondas se propagan depende de dos factores: el contenido de Ca^{2+} del RS (que impacta en la magnitud de Ca^{2+} liberado hacia el citosol) y la sensibilidad con la que los RyR2 responden al Ca^{2+} citosólico. Por lo tanto, la velocidad de las ondas de Ca^{2+} puede ser utilizada como un índice de las propiedades de apertura de los RyR2 durante la liberación de Ca^{2+} desencadenada por Ca^{2+} citosólico [200]. Debido a que no observamos cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS (Fig 28 y 29), estos resultados sugieren que el NO a través de un mecanismo dependiente de GMPc podría estar sensibilizando al RyR2 y así favoreciendo la liberación de Ca^{2+} del RS para una dada cantidad de Ca^{2+} citosólico.

Por otro lado, la posibilidad de que el NO vía GMPc pueda estar actuando a nivel de la $I_{\text{Ca,L}}$ aumentando la entrada de Ca^{2+} y por ende la contractilidad, tampoco parece probable

debido a que está descrito que las acciones del NO sobre esta corriente promueven una disminución de su actividad [114] y además, en un trabajo reciente se demostró que el hinchamiento hipotónico modula la función del canal de Ca^{2+} tipo L por un mecanismo independiente de GMPc y dependiente de PKC [201]. De esta manera, en el contexto de hinchamiento hipotónico, un aumento en la sensibilidad de los RyR2 podría estar ayudando a sostener la liberación de Ca^{2+} por el RS a pesar de estar reducida la corriente de Ca^{2+} tipo L [64, 69, 201] y por lo tanto contribuyendo a sostener la función contráctil. Cabe destacar que un aumento en la probabilidad de apertura de los RyR2 como el único mecanismo responsable del efecto inotrópico positivo está actualmente bajo debate [202]. Aunque nuestros resultados sugieren que la sensibilización de los RyR2 podría tener un papel importante en el soporte inotrópico proporcionado por NO, no podemos descartar que el NO también tenga otros blancos que podrían estar contribuyendo a mantener la función contráctil durante el hinchamiento hipotónico.

Se ha demostrado que la fosforilación de los RyR2 en el sitio Ser2808 aumenta la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{2+} [203]. Interesantemente, se considera que este sitio es fosforilado por PKA. Sin embargo, experimentos *in vitro* sugieren que el sitio Ser2808 también puede ser fosforilado por PKG [49]. Nuestros resultados demuestran que la fosforilación del sitio Ser2808 aumenta por el hinchamiento hipotónico y que este aumento se previene al inhibir a la GCs (Fig 31), sugiriendo que la fosforilación dependiente de NO/GCs/GMPc de este sitio podría ser responsable de sensibilizar el RyR2 al Ca^{2+} citosólico durante el hinchamiento hipotónico. La fosforilación dependiente de GMPc de Ser2808 puede ser mediada por la activación directa de PKG o PKA dado que se ha demostrado que GMPc inhibe fosfodiesterasas (PDEs) aumentando la disponibilidad de AMPc y por lo tanto activando PKA [204]. Es importante destacar que, nuestros resultados utilizando el inhibidor específico de PKG, KT5823, muestran que PKG fosforila el sitio Ser2808 de RyR2, demostrando por primera vez la fosforilación dependiente de PKG de este sitio en un modelo celular cardíaco (Fig 31). Nuestros resultados muestran que KT5823, de manera similar a L-NAME, nitroguanidina y ODQ, exacerba el efecto inotrópico negativo inducido por el hinchamiento hipotónico (Fig 27) indicando que el NO proporciona soporte contráctil, en el contexto de hinchamiento hipotónico, a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG. Interesantemente, la recuperación contráctil tardía observada con la perfusión prolongada con SH también se previno con el tratamiento con KT5823 sugiriendo que esta recuperación también está

mediada por mecanismos dependientes de cGMP/PKG. Sin embargo, no podemos excluir que otros mecanismos dependientes de PKG, aparte del aquí descrito (el aumento de la sensibilidad de los RyR2 al Ca^{2+}), puedan estar involucrados en esta recuperación.

8. Exponer a miocitos cardíacos adultos a SH mejora su supervivencia.

Durante el proceso de isquemia se produce un aumento en las especies reactivas del oxígeno (ROS), una liberación abrupta de NO [205], acidosis metabólica y sobrecarga de Ca^{2+} , entre otras cosas, generando en los miocitos estrés metabólico que es capaz de promover muerte celular [206]. El edema miocárdico inducido por la reperfusión puede afectar la supervivencia de los miocitos, en parte, a través de efectos directos del hinchamiento de los mismos [172]. Consistentemente, el consenso general de los trabajos vincula al hinchamiento hipotónico con el proceso de muerte celular [173-178]. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, pudimos observar que los miocitos adultos mantenidos en SI exhibían una disminución del 50% en la viabilidad celular producto del tiempo de cultivo (10 hs) mientras que, exponerlos a SH mejoraba su supervivencia (Fig 32). La diferencia entre lo que está descrito y los resultados que en este trabajo se exponen puede ser atribuible, en parte, al modelo experimental utilizado ya que la mayoría de estos trabajos fueron realizados en cardiomiocitos neonatales.

Por otro lado, Ruiz Meana et al. observaron que la exposición de miocitos adultos a SH promovía muerte celular [174]. Sin embargo, la SH que se utilizó en este trabajo es de una hiposmolaridad menor que la utilizada en nuestro trabajo (80 mOsm vs 217 mOsm) mientras que la SI era de una osmolaridad similar (312 mOsm vs 309 mOsm) provocando que la diferencia de osmolaridad entre las soluciones utilizadas por Ruiz Meana et al. (232 mOsm) sea mucho mas abrupta que la nuestra (92 mOsm) pudiendo justificar las diferencias observadas en los resultados de viabilidad celular. Es importante destacar que según lo publicado por Vandenberg et al. [7], el gradiente osmótico más significativo se alcanza durante la reperfusión donde el fluido extracelular hipertónico (360 mOsm) se lava con una osmolaridad normal (290 mOsm) provocando una diferencia osmótica de 70 mOsm, valor semejante al utilizado en este trabajo de tesis.

Nuestros resultados no nos permiten inferir el mecanismo por el cual mantener a miocitos en una SH mejora la supervivencia celular. Sin embargo, teniendo en cuenta que el hinchamiento hipotónico se asocia con una disminución en la frecuencia de chispas de

Ca^{2+} provenientes del RyR2 (Fig 30 A) [123] podría sugerir un mecanismo posible. Desde hace varios años se conoce que la interacción entre el RS y la mitocondria está implicada en el desencadenamiento de señales apoptóticas [207]. Además, Zhang et al. observaron que el aumento de la fosforilación del RyR2 conduce a un aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS que eleva el Ca^{2+} mitocondrial resultando en la apertura del PTPM y en un aumento en la muerte celular [208]. El hecho de que el hinchamiento hipotónico curse con una disminución en la liberación espontánea de chispas de Ca^{2+} no generaría la apertura del PTPM y por ende no promovería muerte celular.

Otra posibilidad es que la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) esté generando, en nuestras condiciones experimentales, que los miocitos adultos permanezcan más viables en SH vs SI a lo largo del tiempo ya que está descrito que esta quinasa está involucrada en la supervivencia celular [209] y se ha observado que promueve protección durante la injuria por isquemia y reperfusión [105]. Además, hay estudios que demuestran que la activación de AMPK contribuye a la atenuación del estrés del RS mejorando la supervivencia de los cardiomiocitos [210].

Por otro lado, si bien está descrito que el NO puede ejercer tanto efectos apoptóticos [179] como antiapoptóticos [182] en miocitos aislados, nuestros resultados demuestran que el NO no estaría jugando ningún papel en el efecto protector observado en los miocitos cultivados en SH luego de 10 hs ya que, en presencia del inhibidor de las NOS (L-NAME) no observamos diferencias con respecto a los miocitos expuestos a SH en ausencia del inhibidor en los mismos períodos de tiempo (Fig 33).

Actualmente, nuestro laboratorio se encuentra evaluando el mecanismo por el cual el hinchamiento hipotónico podría estar promoviendo la mejora en la supervivencia de los miocitos cardíacos adultos.

En resumen, nuestros resultados muestran, por primera vez, que durante el hinchamiento hipotónico, el citoesqueleto sensoría la deformación de la membrana celular y lo traduciría en la producción de NO mediado por la nNOS a través de su activación por AMPK. Este NO estaría generando soporte contráctil durante el EIN asociado con el hinchamiento hipotónico a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG. Este soporte contráctil se debería a la fosforilación dependiente de GMPc/PKG del sitio Ser2808 del RyR2

promoviendo un aumento en la sensibilidad del RyR2 a un dado Ca^{2+} citosólico y por lo tanto contribuiría a mantener el transitorio de Ca^{2+} a pesar de la reducción en la $I_{Ca,L}$ asociada con el hinchamiento hipotónico.

Por otro lado, proponemos que el hinchamiento hipotónico mejora la supervivencia en miocitos adultos a través de un mecanismo independiente de NO.

Más allá de la relevancia básica de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, que contribuyen a conocer en profundidad los mecanismos moleculares que ocurren durante el hinchamiento hipotónico que se manifiesta en diversas situaciones patológicas, los resultados también tendrían relevancia clínica dado que la liberación de NO podría ayudar a sostener la función contráctil durante diferentes situaciones patológicas como por ejemplo la I/R. Especulamos que la disfunción contráctil que se asocia al hinchamiento hipotónico podría estar exacerbada en patologías asociadas con una baja disponibilidad de NO como por ejemplo la hipertensión arterial.

Por otra parte, los resultados obtenidos que muestran que mantener a miocitos en una solución hipotónica mejora su supervivencia en el tiempo, nos lleva a plantearnos el interrogante de si el uso de soluciones hipotónicas no sería una buena herramienta para ser utilizada como solución cardiopléjica para preservar el corazón en el contexto de un trasplante. Actualmente, la solución cardiopléjica utilizada para preservar al corazón antes del trasplante es la "Solución Celsior" que tiene una osmolaridad de 320 mOsm. El corazón, a la espera del trasplante, se mantiene en esta solución a baja temperatura para reducir el metabolismo cardíaco. Teniendo en cuenta que la solución hipotónica examinada en el presente estudio disminuye la contractilidad y mejora la supervivencia de miocitos adultos sugiere que su uso como solución cardiopléjica podría tener beneficios adicionales al uso de la tradicional solución Celsior.

CONCLUSIONES

Los resultados en este trabajo indican que:

1. El hinchamiento hipotónico promueve la liberación de NO en miocitos cardíacos adultos.
2. La isoforma responsable en la producción de NO sería la nNOS ubicada en el RS.
3. El citoesqueleto funcionaría como mecanotransductor durante el hinchamiento hipotónico. Sensaría la deformación de la membrana producto del aumento celular y lo traduciría en la activación de la nNOS con la consecuente producción de NO.
4. La AMPK sería la quinasa responsable en la activación de la nNOS
5. El NO que se produce durante el hinchamiento hipotónico promueve soporte contráctil a través de un mecanismo dependiente de GMPc-PKG a través de la sensibilización del RyR2 al Ca^{2+} citosólico debido a la fosforilación del sitio Ser2808.
6. El hinchamiento hipotónico mejora la supervivencia de miocitos aislados por un mecanismo independiente de NO.

BIBLIOGRAFIA

1. Hoffmann, E.K. and L.O. Simonsen, *Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells*. *Physiol Rev*, 1989. **69**(2): p. 315-82.
2. Lang, F., et al., *Functional significance of cell volume regulatory mechanisms*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(1): p. 247-306.
3. Zhang, J., et al., *A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells*. *J Physiol*, 1993. **472**: p. 801-20.
4. Bell, J.R., et al., *Cell volume control in phospholemman (PLM) knockout mice: do cardiac myocytes demonstrate a regulatory volume decrease and is this influenced by deletion of PLM?* *Exp Physiol*, 2009. **94**(3): p. 330-43.
5. Opie, L.H., *Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia*. *Circ Res*, 1976. **38**(5 Suppl 1): p. 152-74.
6. Tranum-Jensen, J., et al., *Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart*. *Circ Res*, 1981. **49**(2): p. 364-81.
7. Vandenberg, J.I., et al., *Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes*. *Cardiovasc Res*, 1996. **32**(1): p. 85-97.
8. Hayakawa, K., H. Tatsumi, and M. Sokabe, *Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 4): p. 496-503.
9. Garcia-Dorado, D., et al., *Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2012. **94**(2): p. 168-80.
10. Demoncheaux, E.A., et al., *Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide*. *Clin Sci (Lond)*, 2002. **102**(1): p. 77-83.
11. Li, H., et al., *Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 16939-46.
12. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. *Nature*, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
13. Masters, B.S., et al., *Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal*. *FASEB J*, 1996. **10**(5): p. 552-8.
14. Albrecht, E.W., et al., *Protective role of endothelial nitric oxide synthase*. *J Pathol*, 2003. **199**(1): p. 8-17.
15. Wang, Y. and P.A. Marsden, *Nitric oxide synthases: gene structure and regulation*. *Adv Pharmacol*, 1995. **34**: p. 71-90.
16. Xie, Q. and C. Nathan, *The high-output nitric oxide pathway: role and regulation*. *J Leukoc Biol*, 1994. **56**(5): p. 576-82.
17. Nathan, C., *Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?* *J Clin Invest*, 1997. **100**(10): p. 2417-23.
18. Ullrich, R., et al., *Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice*. *Circulation*, 2000. **102**(12): p. 1440-6.
19. Zanella, B., et al., *Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria*. *Basic Res Cardiol*, 2004. **99**(3): p. 159-64.

20. Gonzales, G.F., et al., *Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2568-73.
21. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 4): p. 851-72.
22. Hare, J.M., *Nitric oxide and excitation-contraction coupling*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(7): p. 719-29.
23. Khan, S.A., et al., *Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases*. Circ Res, 2003. **92**(12): p. 1322-9.
24. Vila-Petroff, M.G., et al., *Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes*. Circ Res, 1999. **84**(9): p. 1020-31.
25. Kimura, C., et al., *Hypotonic stress-induced NO production in endothelium depends on endogenous ATP*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(3): p. 736-40.
26. Petroff, M.G., et al., *Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(10): p. 867-73.
27. Takeda-Nakazawa, H., et al., *Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide production in outer hair cells of the guinea pig cochlea*. Hear Res, 2007. **230**(1-2): p. 93-104.
28. Fabiato, A. and F. Fabiato, *Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells*. J Physiol, 1975. **249**(3): p. 469-95.
29. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 566-77.
30. Mundina-Weilenmann, C., et al., *Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33561-7.
31. Brittsan, A.G., et al., *Maximal inhibition of SERCA2 Ca²⁺ affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12129-35.
32. Mattiazzi, A. and E.G. Kranias, *The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 5.
33. Goldhaber, J.I. and K.D. Philipson, *Cardiac sodium-calcium exchange and efficient excitation-contraction coupling: implications for heart disease*. Adv Exp Med Biol, 2013. **961**: p. 355-64.
34. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
35. Bers, D.M., *Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 380-7.
36. Wilkins, B.J. and J.D. Molkenin, *Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1178-91.
37. Clusin, W.T., *Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2003. **40**(3): p. 337-75.
38. Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Calcium and mitochondria in the regulation of cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **460**(1): p. 72-81.
39. Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, and V. Ramesh, *Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles*. Biophys J, 1999. **77**(3): p. 1528-39.
40. Gyorko, S. and D. Terentyev, *Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 245-55.

41. Niggli, E., et al., *Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca²⁺ signaling and EC-coupling*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(4): p. 866-75.
42. Meissner, G., *Regulation of Ryanodine Receptor Ion Channels Through Posttranslational Modifications*. *Curr Top Membr*, 2010. **66**: p. 91-113.
43. Donoso, P., et al., *Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. **16**: p. 553-67.
44. Valdivia, H.H., *Ryanodine receptor phosphorylation and heart failure: phasing out S2808 and "criminalizing" S2814*. *Circ Res*, 2012. **110**(11): p. 1398-402.
45. O'Brien, F., E. Venturi, and R. Sitsapesan, *The ryanodine receptor provides high throughput Ca²⁺-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: a focus on proteins relevant to phosphorylation*. *Biochem Soc Trans*, 2015. **43**(3): p. 426-33.
46. Marx, S.O., et al., *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 365-76.
47. Ferrero, P., et al., *Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(3): p. 281-91.
48. Wehrens, X.H., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor*. *Circ Res*, 2004. **94**(6): p. e61-70.
49. Xiao, B., et al., *Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts*. *Biochem J*, 2006. **396**(1): p. 7-16.
50. Gyorke, I. and S. Gyorke, *Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites*. *Biophys J*, 1998. **75**(6): p. 2801-10.
51. Bers, D.M. and T. Guo, *Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1047**: p. 86-98.
52. Cheng, H., W.J. Lederer, and M.B. Cannell, *Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle*. *Science*, 1993. **262**(5134): p. 740-4.
53. Sobie, E.A., et al., *The Ca²⁺ leak paradox and rogue ryanodine receptors: SR Ca²⁺ efflux theory and practice*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006. **90**(1-3): p. 172-85.
54. Shannon, T.R., K.S. Ginsburg, and D.M. Bers, *Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship*. *Circ Res*, 2002. **91**(7): p. 594-600.
55. MacLennan, D.H. and S.R. Chen, *Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 13): p. 3113-5.
56. Priori, S.G. and S.R. Chen, *Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis*. *Circ Res*, 2011. **108**(7): p. 871-83.
57. Chen, W., et al., *The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias*. *Nat Med*, 2014. **20**(2): p. 184-92.
58. Keizer, J., et al., *Saltatory propagation of Ca²⁺ waves by Ca²⁺ sparks*. *Biophys J*, 1998. **75**(2): p. 595-600.
59. Weiss, J.N., et al., *Alternans and arrhythmias: from cell to heart*. *Circ Res*, 2011. **108**(1): p. 98-112.
60. Gonano, L.A., et al., *Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011. **4**(6): p. 947-57.
61. Wright, A.R. and S.A. Rees, *Cardiac cell volume: crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types*. *Pharmacol Ther*, 1998. **80**(1): p. 89-121.

62. Foglia, R.P., et al., *Iatrogenic myocardial edema with crystalloid primes: effects on left ventricular compliance, performance, and perfusion*. Surg Forum, 1978. **29**: p. 312-5.
63. Carmeliet, E., *Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias*. Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 917-1017.
64. Brette, F., et al., *Biphasic effects of hyposmotic challenge on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(4): p. H1963-71.
65. Varro, A., et al., *An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes*. Pflugers Arch, 1993. **423**(1-2): p. 158-60.
66. Macquaide, N., V. Bito, and K.R. Sipido, *Measuring sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, fractional release, and Ca²⁺ buffering in cardiac myocytes*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(4): p. 403-7.
67. Vandenberg, J.I., G.C. Bett, and T. Powell, *Contribution of a swelling-activated chloride current to changes in the cardiac action potential*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. C541-7.
68. Hiraoka, M., et al., *Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(1): p. 23-33.
69. Li, G.R., et al., *Biphasic effects of cell volume on excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(4): p. H1270-7.
70. Ziolo, M.T., *The fork in the nitric oxide road: cyclic GMP or nitrosylation?* Nitric Oxide, 2008. **18**(3): p. 153-6.
71. Shah, A.M., et al., *8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes*. Circ Res, 1994. **74**(5): p. 970-8.
72. Mery, P.F., et al., *Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1197-201.
73. Kirstein, M., et al., *Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 794-802.
74. Wahler, G.M. and S.J. Dollinger, *Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase*. Am J Physiol, 1995. **268**(1 Pt 1): p. C45-54.
75. Takimoto, E., et al., *cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism*. Circ Res, 2005. **96**(1): p. 100-9.
76. Ziolo, M.T., et al., *Inhibition of cyclic GMP hydrolysis with zaprinast reduces basal and cyclic AMP-elevated L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(5): p. 986-94.
77. Wink, D.A., et al., *Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction*. Chem Res Toxicol, 1994. **7**(4): p. 519-25.
78. Takasago, T., et al., *Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation*. J Biochem, 1991. **109**(1): p. 163-70.
79. Raeymaekers, L., F. Hofmann, and R. Casteels, *Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle*. Biochem J, 1988. **252**(1): p. 269-73.
80. Kranias, E.G. and R.J. Hajjar, *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. Circ Res, 2012. **110**(12): p. 1646-60.
81. Furukawa, K., et al., *Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12337-41.

82. Reppel, M., et al., *Regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in the murine embryonic heart*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(1): p. 99-108.
83. Berry, C.E. and J.M. Hare, *Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications*. J Physiol, 2004. **555**(Pt 3): p. 589-606.
84. Chiamvimonvat, N., et al., *Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca²⁺ and Na⁺ channels*. Circ Res, 1995. **76**(3): p. 325-34.
85. Campbell, D.L., J.S. Stamler, and H.C. Strauss, *Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols*. J Gen Physiol, 1996. **108**(4): p. 277-93.
86. Stoyanovsky, D., et al., *Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors*. Cell Calcium, 1997. **21**(1): p. 19-29.
87. Xu, L., et al., *Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation*. Science, 1998. **279**(5348): p. 234-7.
88. Barouch, L.A., et al., *Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 337-9.
89. Muller-Strahl, G., et al., *Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart*. J Physiol, 2000. **522 Pt 2**: p. 311-20.
90. Knowles, R.G., et al., *Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5159-62.
91. Song, T., et al., *Nitric oxide prevents phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at serine1412 by inhibiting the Akt/PKB and CaM-K II signaling pathways*. Int J Mol Med, 2012. **30**(1): p. 15-20.
92. Rameau, G.A., et al., *Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death*. J Neurosci, 2007. **27**(13): p. 3445-55.
93. Adak, S., et al., *Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1244-52.
94. Wolff, D.J. and G.A. Datto, *Identification and characterization of a calmodulin-dependent nitric oxide synthase from GH3 pituitary cells*. Biochem J, 1992. **285 (Pt 1)**: p. 201-6.
95. Lekontseva, O., et al., *Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **339**(2): p. 367-75.
96. Rodriguez, F., et al., *Sex differences in nitrosative stress during renal ischemia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(5): p. R1387-95.
97. Niu, X., et al., *beta3-Adrenoreceptor stimulation protects against myocardial infarction injury via eNOS and nNOS activation*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98713.
98. Song, T., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation*. FEBS Lett, 2004. **570**(1-3): p. 133-7.
99. Song, T., et al., *Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by phosphorylation at Threonine1296 in NG108-15 neuronal cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5658-62.
100. Komeima, K., et al., *Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28139-43.

101. Chen, Z.P., et al., *AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **279**(5): p. E1202-6.
102. Murphy, B.A., et al., *AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(3): p. C750-8.
103. Thomas, M.M., et al., *Muscle-specific AMPK beta1beta2-null mice display a myopathy due to loss of capillary density in nonpostural muscles*. *FASEB J*, 2014. **28**(5): p. 2098-107.
104. Kakinuma, Y., et al., *Effect of electrical modification of cardiomyocytes on transcriptional activity through 5'-AMP-activated protein kinase*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. **44 Suppl 1**: p. S435-8.
105. Hao, J., et al., *Mechanical Stretch-Induced Protection against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Involves AMP-Activated Protein Kinase*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2010. **14**(1): p. 1-9.
106. Garbincius, J.F. and D.E. Michele, *Dystrophin-glycoprotein complex regulates muscle nitric oxide production through mechanoregulation of AMPK signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(44): p. 13663-8.
107. Kar, R., D.L. Kellogg, 3rd, and L.J. Roman, *Oxidative stress induces phosphorylation of neuronal NOS in cardiomyocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **459**(3): p. 393-7.
108. Wang, H., et al., *Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **294**(6): p. C1566-75.
109. Vandsburger, M.H., et al., *Multi-parameter in vivo cardiac magnetic resonance imaging demonstrates normal perfusion reserve despite severely attenuated beta-adrenergic functional response in neuronal nitric oxide synthase knockout mice*. *Eur Heart J*, 2007. **28**(22): p. 2792-8.
110. Saraiva, R.M., et al., *Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium*. *Circulation*, 2005. **112**(22): p. 3415-22.
111. Dawson, D., et al., *nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction*. *Circulation*, 2005. **112**(24): p. 3729-37.
112. Sears, C.E., et al., *Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling*. *Circ Res*, 2003. **92**(5): p. e52-9.
113. Gallo, M.P., et al., *Regulation of cardiac calcium current by NO and cGMP-modulating agents*. *Pflugers Arch*, 2001. **441**(5): p. 621-8.
114. Sumii, K. and N. Sperelakis, *cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes*. *Circ Res*, 1995. **77**(4): p. 803-12.
115. Hu, H., et al., *Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors*. *Circ Res*, 1997. **81**(5): p. 742-52.
116. Fearon, I.M., et al., *Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca²⁺ channel alpha1C subunits by redox agents and hypoxia*. *J Physiol*, 1999. **514 (Pt 3)**: p. 629-37.
117. Zhang, Y.H., et al., *Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice*. *Circ Res*, 2008. **102**(2): p. 242-9.
118. Burger, D.E., et al., *Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice*. *Circulation*, 2009. **120**(14): p. 1345-54.

119. Adachi, T., et al., *S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1200-7.
120. Pou, S., et al., *Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24173-6.
121. Gonzalez, D.R., et al., *Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20612-7.
122. Wang, H., et al., *Regulation of myocyte contraction via neuronal nitric oxide synthase: role of ryanodine receptor S-nitrosylation*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 15): p. 2905-17.
123. Xie, H. and P.H. Zhu, *Effect of osmotic stress on spontaneous calcium sparks in rat ventricular myocytes*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(7): p. 877-87.
124. Curran, J., et al., *Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87495.
125. Feron, O., et al., *Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22810-4.
126. Sessa, W.C., C.M. Barber, and K.R. Lynch, *Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein*. Circ Res, 1993. **72**(4): p. 921-4.
127. Chen, Z.P., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. FEBS Lett, 1999. **443**(3): p. 285-9.
128. Boo, Y.C., et al., *Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1819-28.
129. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
130. Butt, E., et al., *Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 5179-87.
131. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
132. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
133. Mitchell, B.J., et al., *The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase*. Curr Biol, 1999. **9**(15): p. 845-8.
134. Mitchell, B.J., et al., *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17625-8.
135. Harris, M.B., et al., *Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H560-6.
136. Boo, Y.C., et al., *Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(7): p. 729-41.
137. Mitchell, B.J., et al., *Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42344-51.

138. Matsubara, M., et al., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C*. J Biochem, 2003. **133**(6): p. 773-81.
139. Bauer, P.M., et al., *Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14841-9.
140. Kou, R., D. Greif, and T. Michel, *Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29669-73.
141. Cho, D.H., et al., *Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independent signaling pathways*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2499-506.
142. Gallis, B., et al., *Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30101-8.
143. Champion, H.C., et al., *Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 657-63.
144. Godecke, A., et al., *Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts*. J Physiol, 2001. **532**(Pt 1): p. 195-204.
145. Brunner, F., et al., *Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3097-102.
146. Martin, S.R., et al., *Are myocardial eNOS and nNOS involved in the beta-adrenergic and muscarinic regulation of inotropy? A systematic investigation*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(1): p. 97-106.
147. Ruetten, H., et al., *Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(3): p. 444-53.
148. Kaye, D.M., S.D. Wiviott, and R.A. Kelly, *Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a Ca²⁺-independent manner in cardiac myocytes: role of troponin I phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(2): p. 398-403.
149. Bai, C.X., et al., *Role of nitric oxide in Ca²⁺ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current in cardiac myocytes*. Circ Res, 2005. **96**(1): p. 64-72.
150. Jiang, L.H., et al., *Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6135-43.
151. Sun, J., et al., *Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 403-11.
152. Bibli, S.I., et al., *Cardioprotection by H₂S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway*. Cardiovasc Res, 2015. **106**(3): p. 432-42.
153. Teubl, M., et al., *Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchange facilitates Ca⁽²⁺⁾-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29529-35.

154. Maczewski, M. and A. Beresewicz, *Role of nitric oxide and free radicals in cardioprotection by blocking Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange in rat heart*. Eur J Pharmacol, 2003. **461**(2-3): p. 139-47.
155. Zhao, J. and H. Majewski, *Endothelial nitric oxide attenuates Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated vasoconstriction in rat aorta*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(5): p. 982-90.
156. Mene, P., F. Pugliese, and G.A. Cinotti, *Cyclic nucleotides inhibit Na⁺/Ca²⁺ exchange in cultured human mesangial cells*. Exp Nephrol, 1993. **1**(4): p. 245-52.
157. Balligand, J.L., et al., *Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27580-8.
158. Wildhirt, S.M., et al., *Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 698-711.
159. Ichinose, F., et al., *A selective inducible NOS dimerization inhibitor prevents systemic, cardiac, and pulmonary hemodynamic dysfunction in endotoxemic mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2524-30.
160. Yang, B., D.F. Larson, and R.R. Watson, *Modulation of iNOS activity in age-related cardiac dysfunction*. Life Sci, 2004. **75**(6): p. 655-67.
161. Ziolo, M.T., et al., *Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta-adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca²⁺ transients*. Circulation, 2004. **109**(15): p. 1886-91.
162. Parlakpinar, H., M.K. Ozer, and A. Acet, *Effect of aminoguanidine on ischemia-reperfusion induced myocardial injury in rats*. Mol Cell Biochem, 2005. **277**(1-2): p. 137-42.
163. Yasuda, S. and W.Y. Lew, *Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca²⁺ in cardiac myocytes*. Circ Res, 1997. **81**(6): p. 1011-20.
164. Ziolo, M.T., et al., *Myocytes isolated from rejecting transplanted rat hearts exhibit a nitric oxide-mediated reduction in the calcium current*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(9): p. 1691-9.
165. Joe, E.K., et al., *Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(2): p. 303-15.
166. Xia, Y. and J.L. Zweier, *Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6954-8.
167. Cai, L., et al., *Inhibition of superoxide generation and associated nitrosative damage is involved in metallothionein prevention of diabetic cardiomyopathy*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1829-37.
168. Lokuta, A.J., et al., *Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure*. Circulation, 2005. **111**(8): p. 988-95.
169. Kohr, M.J., et al., *Biphasic effect of SIN-1 is reliant upon cardiomyocyte contractile state*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(1): p. 73-80.
170. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
171. Leung, A.W. and A.P. Halestrap, *Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 946-52.
172. Garcia-Dorado, D. and J. Oliveras, *Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury?* Cardiovasc Res, 1993. **27**(9): p. 1555-63.

173. Steenbergen, C., M.L. Hill, and R.B. Jennings, *Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity.* *Circ Res*, 1985. **57**(6): p. 864-75.
174. Ruiz-Meana, M., et al., *Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition.* *Cardiovasc Res*, 1995. **30**(1): p. 64-9.
175. Mizoguchi, K., et al., *Amelioration of myocardial global ischemia/reperfusion injury with volume-regulatory chloride channel inhibitors in vivo.* *Transplantation*, 2002. **73**(8): p. 1185-93.
176. Diaz-Elizondo, J., et al., *Reactive oxygen species inhibit hyposmotic stress-dependent volume regulation in cultured rat cardiomyocytes.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **350**(4): p. 1076-81.
177. Rojas-Rivera, D., et al., *Regulatory volume decrease in cardiomyocytes is modulated by calcium influx and reactive oxygen species.* *FEBS Lett*, 2009. **583**(21): p. 3485-92.
178. Kajimoto, K., et al., *Hypotonic swelling-induced activation of PKN1 mediates cell survival in cardiac myocytes.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **300**(1): p. H191-200.
179. Hofstaetter, B., et al., *Inhibition of apoptotic responses after ischemic stress in isolated hearts and cardiomyocytes.* *Basic Res Cardiol*, 2002. **97**(6): p. 479-88.
180. Taimor, G., B. Hofstaetter, and H.M. Piper, *Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia.* *Cardiovasc Res*, 2000. **45**(3): p. 588-94.
181. Piantadosi, C.A., L.G. Tatro, and A.R. Whorton, *Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition.* *Nitric Oxide*, 2002. **6**(1): p. 45-60.
182. Borutaite, V., et al., *Nitric oxide protects the heart from ischemia-induced apoptosis and mitochondrial damage via protein kinase G mediated blockage of permeability transition and cytochrome c release.* *J Biomed Sci*, 2009. **16**: p. 70.
183. Li, J., et al., *Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **240**(2): p. 419-24.
184. Maejima, Y., et al., *Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation.* *J Mol Cell Cardiol*, 2005. **38**(1): p. 163-74.
185. Palomeque, J., et al., *Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H96-106.
186. Shioya, T., *A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models.* *J Physiol Sci*, 2007. **57**(6): p. 327-35.
187. Kaye, D.M., et al., *Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes.* *Circ Res*, 1996. **78**(2): p. 217-24.
188. Louch, W.E., et al., *Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules—a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes.* *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(1): p. 63-73.
189. Guo, A. and L.S. Song, *AutoTT: automated detection and analysis of T-tubule architecture in cardiomyocytes.* *Biophys J*, 2014. **106**(12): p. 2729-36.
190. Li, Y. and D.M. Bers, *A cardiac dihydropyridine receptor II-III loop peptide inhibits resting Ca(2+) sparks in ferret ventricular myocytes.* *J Physiol*, 2001. **537**(Pt 1): p. 17-26.
191. Picht, E., et al., *SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ.* *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(3): p. C1073-81.
192. Vila-Petroff, M., et al., *CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury.* *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(4): p. 689-98.

193. Thastrup, O., et al., *Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2466-70.
194. Iribe, G., et al., *Axial stretch of rat single ventricular cardiomyocytes causes an acute and transient increase in Ca²⁺ spark rate*. Circ Res, 2009. **104**(6): p. 787-95.
195. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. Pharmacol Ther, 2009. **122**(3): p. 216-38.
196. Kawai, M., M. Hussain, and C.H. Orchard, *Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. H603-9.
197. Su, Y., D. Kondrikov, and E.R. Block, *Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase*. Cell Biochem Biophys, 2005. **43**(3): p. 439-49.
198. Fassett, J.T., et al., *AMPK attenuates microtubule proliferation in cardiac hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(5): p. H749-58.
199. Fryer, L.G., et al., *Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 1978-85.
200. Sacherer, M., et al., *JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+) leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium*. Br J Pharmacol, 2012. **167**(3): p. 493-504.
201. Luo, A.T., et al., *Hyposmotic challenge modulates function of L-type calcium channel in rat ventricular myocytes through protein kinase C*. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(11): p. 1438-46.
202. Eisner, D.A., et al., *How does CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor contribute to inotropy?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(31): p. E123; author reply E124.
203. Ullrich, N.D., H.H. Valdivia, and E. Niggli, *PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca²⁺ sensitivity*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(1): p. 33-42.
204. Fischmeister, R., et al., *Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2005. **142**(2): p. 136-43.
205. Csonka, C., et al., *Classic preconditioning decreases the harmful accumulation of nitric oxide during ischemia and reperfusion in rat hearts*. Circulation, 1999. **100**(22): p. 2260-6.
206. Ertracht, O., et al., *The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(1): p. 33-40.
207. Chen, X., et al., *Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes*. Circ Res, 2005. **97**(10): p. 1009-17.
208. Zhang, T., et al., *Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKII δ (C) transgenic mice*. Circ Res, 2010. **106**(2): p. 354-62.
209. Bairwa, S.C., N. Parajuli, and J.R. Dyck, *The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(12): p. 2199-2210.
210. Terai, K., et al., *AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9554-75.