

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio PERIODO 2014

1. **APELLIDO:** Ciocci Pardo

NOMBRES: Alejandro

Dirección Particular: Calle:

Localidad:

Dirección electrónica (donde desea recibir información):

2. **TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Contribución del co-transporte Na^+ - CO_3H^- y de la anhidrasa carbónica a las alteraciones por isquemia y reperfusión, rol de la mitocondria

3. **OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1° AÑO: Fecha de iniciación: 01/04/2014

2° AÑO: Fecha de iniciación:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1° AÑO: Fecha de iniciación:

2° AÑO: Fecha de iniciación:

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

Universidad y/o Centro: Centro de Investigaciones Cardiovasculares

Facultad: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 60 N°: S/N

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:** 54 221 4834833

5. **DIRECTOR DE BECA**

Apellido y Nombres: Mosca, Susana Maria

Dirección Particular:

Localidad:

Dirección electrónica:

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Tareas realizadas

Durante este periodo aprendí diferentes técnicas y la utilización de distintos equipos que paso a detallar

1. Técnicas y equipos

1.1. Medición de la presión arterial sistólica de ratas:

Las ratas se colocan en una cámara a 37°C durante 10 minutos y después se transfieren a una cámara acrílica que contiene una almohadilla de calefacción. En este momento se coloca un manguito y un sensor de pulso en la cola del animal (Narco Biosystems, Houston, TX). El manguito está conectado a un cilindro de aire comprimido a través de una disposición de las válvulas de entrada y salida que permiten inflarlo y desinflarlo a una velocidad constante. La presión en el manguito se registra continuamente con un sensor de presión (Sensym, Honeywell Sensing & Control, Inc.). Las señales de los sensores de pulso y la presión se amplifican y digitalizan con un tablero analógico-digital (DT16EZ, Data Translation, Inc., Marlboro, MA). Los archivos para su posterior procesamiento son obtenidos con el software correspondiente (Labtech Notebook Pro, Laboratorio Technology Corp., Wilmington, MA). Para cada determinación se registran las lecturas, así como el intervalo de compresión. Además del aprendizaje de esta técnica aprendí el procesamiento de esta información y su posterior análisis.

1.2. Mitocondrias

1.2.1. Aislamiento de mitocondrias:

Las mitocondrias se obtienen por centrifugación diferencial. El ventrículo izquierdo se lava en solución de aislamiento (SA) (sacarosa 75 mM, manitol 225 mM, y 0,01 mM EGTA neutralizado con tampón Trizma a pH 7,4) enfriada con hielo. La homogeneización se realiza con un homogeneizador manual en dos ciclos de 7 minutos. Por cada gramo de tejido se agrega 5 ml de SA y 0.8 mg de proteasa bacteriana (tipo XXIV, Sigma). El homogenato resultante de cada ciclo se transfiere a un tubo de centrifuga de policarbonato. Después de 5 min a 750 × g de se descarta el pellet (que contiene tejido intacto, núcleos, membranas y los componentes más pesados del citoplasma). El sobrenadante se centrifuga a 8.000 × g durante 10 min para sedimentar las mitocondrias. Este pellet se lava dos veces con SA y una tercera vez con solución de suspensión (SA sin EGTA) a 8000 × g durante 5 min. El residuo se lava y se re-suspende en una solución fría que contiene manitol y sacarosa. La concentración de proteínas mitocondriales se evalúa por el método de Bradford. La pureza de la muestra se determina por inmunodetección del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y por la ausencia de gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPD).

1.2.2. Estado mitocondrial

Aprendí y/o perfeccioné diferentes técnicas y la interpretación y análisis de los datos obtenidos.

1.2.2.1 -Capacidad de retención de Ca²⁺: Utilizando la sonda verde Calcium Green 5N, evaluamos la concentración de Ca²⁺ necesaria para abrir el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM). Tras el agregado de sucesivos pulsos de Ca²⁺ de concentración conocida, se producen modificaciones transitorias de la fluorescencia y se llega un punto en donde la concentración de dicho ion es suficiente para abrir el PPTM.

1.2.2.2 -Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$): este parámetro lo estimamos mediante la disminución de la fluorescencia de Rodamina 123 registrada tras el

agregado de las mitocondrias. Dicha disminución se debe a que el colorante ingresa en la mitocondria de una manera inversamente proporcional al $\Delta\psi_m$. Cuanto más colorante se acumula en su interior más polarizada se encuentra la organela. Posteriormente se realizan una serie de cálculos que permiten evaluar la concentración de rodamina en el interior de la matriz mitocondrial y en el medio para poder, finalmente, estimar el $\Delta\psi_m$.

1.2.2.3. -Hinchazón mitocondrial: se evalúa como la diferencia entre la dispersión de la luz antes y después del agregado de diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

1.3. Preparado de corazón aislado:

Las ratas son anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/ kg peso corporal). El corazón se extirpa rápidamente y se perfunde en un sistema Langendorff con una solución (8 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.35 CaCl₂, 20 NaCO₃H, y 11.1 dextrosa mmol/L) mantenida a pH=7.4 (con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂) y a 37°C. La frecuencia cardíaca es mantenida constante en un valor de 280 ± 10 lat /min. Un globo de látex atado al extremo de un tubo de polietileno se introduce en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral; a continuación, el extremo opuesto del tubo se conecta a un transductor de presión Statham P23XL. El globo se llena con agua para obtener una presión diastólica final de 8-12 mmHg. Este volumen permanece sin cambios en el resto del experimento. La presión de perfusión coronaria se monitorea en el punto de la canulación de la aorta y se ajusta a aproximadamente 60-70 mmHg. El flujo coronario, controlado con una bomba peristáltica, se mantiene en 11 ± 2 ml / min. La presión ventricular izquierda se obtiene mediante el uso de un convertidor analógico-digital y un software de adquisición (Gráfico V4.2.3 ADInstruments). Este preparado nos permite evaluar diferentes parámetros:

1.3.1. -Evaluación del tamaño del infarto: Al término del período de reperfusión los corazones son teñidos con trifeniltetrazolio y mediante un programa de computadora (Scion Image 1.62) se determinan las áreas de infarto y las áreas de riesgo.

1.3.2. -Contractilidad miocárdica: Es evaluada a través de la presión desarrollada (PD), y la máxima velocidad de desarrollo de la presión en el ventrículo izquierdo (PVI) (+dP/dtmax). La rigidez miocárdica durante la reperfusión y la contractura isquémica son evaluadas a través de la presión diastólica final (PDF).

2. Trabajos en los que participe durante el primer año de beca

2.1. Manejo del calcio mitocondrial en ratas normotensas y espontáneamente hipertensas: correlación con los niveles de presión arterial sistólica

En animales hipertensos la homeostasis de Ca^{2+} está alterada, pero los mecanismos involucrados no están totalmente dilucidados. El objetivo del trabajo fue evaluar la respuesta al Ca^{2+} de mitocondrias aisladas de ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) e hipertensas espontáneas (SHR) y establecer una posible relación con la presión arterial sistólica (PAS). Medimos la capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) por el método de Calcium green 5N, analizando el número de pulsos de Ca^{2+} (NP), el tiempo total (Tt, seg) y el tiempo de cada pulso (Tp, seg), necesarios para abrir el PPTM. La pendiente de la curva del cambio de fluorescencia en función del tiempo se usó para evaluar la velocidad de liberación de Ca^{2+} . Se determinó también la hinchazón mitocondrial producida por el agregado de 20, 50, 100, 200 y 500 μ M de Ca^{2+} y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) utilizando rodamina 123. Los resultados y conclusiones se encuentran en el siguiente trabajo y en una comunicación presentada en 2 eventos científicos:

Pardo AC, Rinaldi GJ, Mosca SM. Mitochondrial calcium handling in normotensive and spontaneously hypertensive rats: Correlation with systolic blood pressure levels. *Mitochondrion* 20: 75-81, 2015.

Respuesta al calcio de mitocondrias de ratas normotensas e hipertensas espontaneas: relación con la presión arterial. Alejandro Ciocci Pardo, Gustavo J Rinaldi, Susana M Mosca.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-CONICET, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. 9 y 10 de octubre de 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; y Jornadas de Medicina 2014, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

2.2. Participación de PKCe en la cardioprotección inducida por el pre y postcondicionamiento isquémico en ratas SHR: comparación con la Ciclosporina-A
El objetivo fue estudiar la participación de la PKCe en la cardioprotección generada por el pre y postcondicionamiento isquémico en ratas espontáneamente hipertensas y compararlos con la producida por la Ciclosporina-A. Se determinó el tamaño de infarto, TBARS –como índice de la peroxidación lipídica- y el contenido de glutatión reducido, niveles de P-Akt, P-GSK-3 β and P-PKCe y citocromo c en las fracciones citosólica y mitocondrial. En mitocondrias aisladas, se evaluó la apertura del PPTM en respuesta al Ca²⁺. Los resultados y conclusiones aparecen en el siguiente trabajo:

González Arbeláez LF, Ciocci Pardo A, Fantinelli JC, Mosca S M. Involvement of PKCe in ischemic pre and postconditioning –induced cardioprotection in SHR: comparison to Cyclosporine-A . Enviado a la revista: *International Journal of Cardiology*, 2015.

2.3. Cascada de señalización involucrada en la disminución del tamaño del infarto producida por un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*

El objetivo fue determinar la participación de la vía Akt/eNOS en los efectos de un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* (IP) en isquemia-reperusión. Para ello, corazones de rata aislados y perfundidos por el sistema de Langendorff fueron asignados a uno de los siguientes grupos: 1.-Control no isquémico: 120 min de perfusión; 2.- Control isquémico (CI): 40 min de oclusión coronaria (OC) y 60 min de reperusión (R); 3.- IP: 30 μ g/ml de IP fueron administrados en los primeros 10 min de R; 4.- L-NAME + IP: 1mM de L-NAME (inhibidor de NOS) fue administrado 10 min antes de la OC y durante la R e IP según el grupo 3. El tamaño del infarto (TI) se determinó por la tinción con 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). La función sistólica y diastólica fue determinada a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PD) y la presión diastólica final (PDF), respectivamente. El fenómeno de no-reflujo (FNR) fue evaluado a través de la resistencia coronaria (RC). El estrés oxidativo se evaluó a través del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el glutatión reducido (GSH). La expresión de P-eNOS, P-Akt y P-GSK-3 β se determinó por western blot. La hinchazón mitocondrial se determinó a través del cambio de la dispersión de la luz (DL) producido por el agregado de CaCl₂ 100 μ mol/L. Los resultados y conclusiones se encuentran en el siguiente trabajo y en una comunicación presentada en un Congreso:

Luisa F González Arbeláez, Juliana C Fantinelli, Ciocci Pardo A, Claudia I Caldiz, José Luis Ríos, Guillermo R Schinella, Susana M Mosca. Cascada de señalización involucrada en la disminución del tamaño del infarto producida por un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*. Enviado a la revista: *Phytomedicine*, 2014.

- Luisa F González Arbeláez, Juliana C Fantinelli, Ciocci Pardo A, Claudia I Caldiz, José Luis Ríos, Guillermo R Schinella, Susana M Mosca. Cascada de señalización involucrada en la disminución del tamaño del infarto producida por un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. 9 y 10 de octubre de 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; y Jornadas de Medicina 2014, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

2.4. Revisión sobre propiedades antioxidantes de los productos naturales y cardioprotección contra la lesión por reperfusión.

Trabajo terminado y aún no enviado:

Fantinelli JC, LF González Arbeláez, A Ciocci Pardo, G Schinella, Susana M Mosca. Is "in vitro" antioxidant capacity of natural products linked to the cardioprotection against reperfusion injury?

2.5. Bloqueo del cotransporte Na⁺/CO₃H⁻ con antiloop 3

Actualmente estoy realizando determinaciones con preparados de corazón aislados en un sistema Langendorff. El protocolo es: estabilización 20 min, una isquemia global normotérmica de 30 min y 60 min de reperfusión, administrándose en los primeros 10 minutos una dilución 1:500 de un anticuerpo contra el dominio extracelular 3 del NBC1. En estas determinaciones vimos que la recuperación de la función cardiaca post-isquémica es mayor y que el tamaño del infarto es menor que para el caso de los controles isquémicos y los corazones tratados con suero (control de los corazones tratados con el anticuerpo, se administra también durante los primeros 10 minutos de la reperfusión). Experimentos preliminares en suspensión de mitocondrias muestran que la función mitocondrial (evaluada a través de la capacidad de retención de calcio, el potencial mitocondrial y la hinchazón mitocondrial) está más preservada en los corazones tratados con el anticuerpo.

Dificultades durante este año de beca

La principal dificultad encontrada estuvo en la adquisición de insumos importados debido al tiempo que demoran en llegar al país, limitando en gran parte la realización de experimentos.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

Pardo AC, Rinaldi GJ, Mosca SM. Mitochondrial calcium handling in normotensive and spontaneously hypertensive rats: Correlation with systolic blood pressure levels. *Mitochondrion* 20(2015)75–81

The aim was to study the mitochondrial Ca²⁺ handling of mitochondria isolated from normotensive Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) hearts and to establish a possible correlation with systolic blood pressure (SBP). Mitochondrial swelling after Ca²⁺ addition, Ca²⁺-retention capacity (CRC) by calcium green method, and membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were assessed. SBP was 124 ± 1 (WKY) and 235 ± 6 mm Hg (SHR). CRC, Ca²⁺ response and $\Delta\Psi_m$ were lower in SHR than WKY

mitochondria. The conclusion is: the more depolarized state of SHR than WKY mitochondria results in an abnormal Ca²⁺ handling and this event is closely associated with the SBP

Autores: Ciocci Pardo Alejandro, Rinaldi Gustato J., Mosca Susana M.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.
(Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

**INVOLVEMENT OF PKCe IN ISCHEMIC PRE AND POSTCONDITIONING –INDUCED
CARDIOPROTECTION IN SHR: COMPARISON TO CYCLOSPORINE-A**

Luisa F González Arbeláez (a), Alejandro Ciocci Pardo (b), Juliana C Fantinelli (c),
Susana M Mosca (c)

a-Fellowship of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata, La
Plata, Buenos Aires, ARGENTINA.

b-Fellowship of Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos
Aires, Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata,
La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA.

c-Established Investigator of CONICET, Centro de Investigaciones Cardiovasculares,
Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA.

Running Title: PKCe and CsA and cardioprotection in SHR

Corresponding author: Dr Susana M Mosca, Centro de Investigaciones
Cardiovasculares. Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120, 1900 La Plata,
ARGENTINA. Tel and Fax: 54-221-4834833. E-mail: smosca@med.unlp.edu.ar

ABSTRACT

Objective: To examine the participation of PKCe in the cardioprotection achieved by ischemic pre (IP)- and postconditioning (IPC) in spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to cyclosporine-A (CsA). Methods: Isolated hearts were submitted to the following protocols: IC: 45 min global ischemia (GI) and 1 hour reperfusion (R); IP: a cycle of 5 min GI and 10 minutes of R prior to 45 min-GI; IPC: three cycles of 30 sec-GI/ 30 sec-R at the start of R. Other hearts received chelerythrine (Che, PKC inhibitor) or CsA. Infarct size (IS), TBARS -as index of lipid peroxidation- and reduced glutathione (GSH) content were measured and levels of P-Akt, P-GSK-3 β and P-PKCe and cytochrome c (Cyc) in cytosolic (C) and mitochondrial (M) fractions were determined. In

isolated mitochondria Ca^{2+} -induced mPTP opening was also assessed. Results: IS and TBARS decreased and GSH was partially preserved by IP and IPC and were reversed by Che. P-Akt, P-GSK-3 β and P-PKCe increased in C and decreased in M and the changes were greater in presence of CsA. Cyt release increased in IC hearts was diminished in IP, IPC and CsA groups and increased by Che. The response of mPTP to Ca^{2+} diminished in IC group, was improved by IP, IPC and CsA and decreased with Che. By coimmunoprecipitation a P-PKCe/VDAC interaction was detected after IP or IPC. Conclusion: These data show that, in SHR hearts, the attenuation of mitochondrial permeability cytosolic PKCe mediated appears as the main mechanism involved in the cardioprotective actions afforded by IP, IPC and CsA.

Key words: PKCe, CsA, Ischemic preconditioning, Ischemic postconditioning, Cytochrome c, mitochondrial swelling

SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE LIMITATION OF INFARCT SIZE ACHIEVED BY ILEX PARAGUARIENSIS EXTRACT

Luisa F González Arbeláez (a)*, Juliana C Fantinelli (a)*, Alejandro Ciocci Pardo (a), Claudia I Caldiz (a), José Luis Ríos (c), Guillermo R Schinella (b), Susana M Mosca (a)

a-Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata-CONICET, La Plata, Argentina.

b-Cátedra de Farmacología Básica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, CIC, Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina.

c-Departament de Farmacologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Valencia, Valencia, España

* These authors collaborated equally to the work

Address: Dr Susana M Mosca

Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120,

1900 La Plata, ARGENTINA. Tel and Fax: (54) 221-425-5861

e-mail: smosca@med.unlp.edu.ar

ABSTRACT

Background: NO-dependent pathways have been involved in the cardioprotection against reperfusion injury. Hypothesis/Purpose: To examine the contribution of that

mechanism to the effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (IP). Study Design: Model of regional ischemia. Methods: Isolated rat hearts were submitted to 40-min of coronary occlusion followed by 60 min of reperfusion (R). Other hearts were treated with IP or LG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)- a nitric oxide synthase inhibitor- prior to IP infusion. Infarct size (IS) was determined by TTC staining. Left ventricular developed pressure, +dP/dtmax, -dP/dtmax, and left ventricular end diastolic pressure were used to assess myocardial function. Coronary resistance served to evaluate no-reflow phenomenon. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), the expression of P-eNOS, P-Akt and P-GSK-3b and mitochondrial swelling were also measured. Results: IP treatment significantly decreased the IS and no-reflow phenomenon and improved postischemic myocardial function. TBARS decreased, GSH was partially preserved, levels of P-eNOS, P-Akt and P-GSK-3b increased and mitochondrial swelling diminished after IP. These changes- except the increases of P-Akt and P-GSK-3b- were abolished by L-NAME. Conclusion: These data demonstrates that IP decreases cell death, non-reflow phenomenon, oxidative damage and mitochondrial permeability caused by ischemia-reperfusion through PI3K/Akt/eNOS-dependent pathways.

Key words: *Ilex paraguariensis*, ischemia-reperfusion, TBARS, GSH, P-eNOS, P-Akt, mPTP

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.

(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Is "in vitro" antioxidant capacity of natural products linked to the cardioprotection against reperfusion injury?

When there is an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defence system, oxidative stress is established. In certain pathophysiological situations such as in ischemia-reperfusion there is an excessive ROS production. Previous results from our laboratory show that the treatment of isolated rat hearts submitted to 20 min of global ischemia and 60 min of reperfusion with a non-alcoholic Cabernet-Sauvignon (CS) and Malbec (M) red wine extracts or *Ilex paraguariensis* or *Ilex brasiliensis* aqueous extracts or *Viccinium meridionale* Swartz (mortiño) fermented extract improved the postischemic myocardial function and attenuated the oxidative damage. However others extract such as a non-alcoholic extract of a commercial mixture of CS, M and Merlot red wine, different fractions of cocoa and mortiño juice did not exert cardioprotection against reperfusion injury. Using "in vitro" assays all extracts exhibited a significant antioxidant power. Also, the cardioprotection on ischemic myocardium was lost when NO production and/or PKC activation and/or mitochondrial KATP channels opening were/was inhibited. These results are indicating that the antioxidant capacity of the extracts is not primarily responsible for the attenuation of myocardial stunning. The beneficial action of the plants

extracts used herein would be principally determined for activation or unmasking of cardioprotective signalling pathways NO-mediated.

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

-Cascada de señalización involucrada en la disminución del tamaño del infarto producida por un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*

Luisa F González Arbeláez¹, Juliana C Fantinelli¹, Ciocci Pardo A1, Claudia I Caldiz¹, José Luis Ríos², Guillermo R Schinella³, Susana M Mosca¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-CONICET, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); ² Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, España; Facultad de Ciencias Médicas, UNLP; ³Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

-Respuesta al calcio de mitocondrias de ratas normotensas e hipertensas espontaneas: relacion con la presión arterial

Alejandro Ciocci Pardo, Gustavo J Rinaldi, Susana M Mosca.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-CONICET, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

En este momento me encuentro realizando experimentos que forman parte del proyecto de mi tesis doctoral:

En un preparado Langendorff, luego de una estabilización de 20 min, se completan los diferentes protocolos de alguna de las siguientes maneras:

1-Control: los corazones serán perfundidos hasta completar 110 min.

2-Control isquémico: Se realizará una isquemia global normotérmica por 30 min y luego se reperfundirá durante 1 hora.

3-Bloqueo del NBC: Se realizará una isquemia global normotérmica por 30 min y se administrará durante los primeros 10 minutos de la reperusión una dilución 1:500 de un anticuerpo contra el dominio extracelular 3.

Parámetros medidos actualmente:

-Tamaño del infarto

-Contractilidad miocárdica

-Potencial de membrana mitocondrial

-Sensibilidad del mPTP al Ca²⁺

Parametros a medir en los proximos meses:

Determinaciones bioquímicas

1-Evaluación del daño oxidativo:

1a- Peroxidación lipídica

1b- Nitración de proteínas

1c- Sistemas antioxidantes

1c1- Contenido de glutatión reducido (GSH)

1c2- Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

2-Expresión de las cinasas p38, ERK1/2 y Akt y además del NBC y de la AC

Los resultados preliminares muestran que el bloqueo del NBC con antiloop 3:

-reduce el tamaño de infarto

-mejora la función cardiaca post-isquemica

-mejora la función mitocondrial

que los controles isquémicos los corazones tratados con suero (control de antiloop3, administrado de igual manera que este)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. 9 y 10 de octubre de 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Disertante

“Respuesta al calcio de mitocondrias de ratas normotensas e hipertensas espontaneas: relacion con la presión arterial”

Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. 9 y 10 de octubre de 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Coautor

“Cascada de señalización involucrada en la disminución del tamaño del infarto producida por un extracto acuoso de Ilex paraguariensis ”

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Ayudante diplomado Ah-Honorem, catedra de Fisiología y Física Biológica
01/07/2014 - actualidad

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA

 (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Contribución del co-transporte $\text{Na}^+\text{-CO}_3\text{H}^-$ y de la anhidrasa carbónica a las alteraciones por isquemia y reperfusión: rol de la mitocondria

1-Reperfusión ácida (RA): Se realizará una isquemia global normotérmica por 30 min y en los primeros 4 minutos de la reperfusión los corazones recibirán una solución de pH = 6.4. Se completarán los 60 min de reperfusión con la solución de pH = 7.4.

2-Bloqueo de la AC: Se realizará una isquemia global normotérmica por 30 min y se administrará durante los primeros 10 minutos de la reperfusión el bloqueante de la ACII, 6-

etoxolamida (ETZ, 100-150 μ M) (grupo 5.1) ó el bloqueante de las isoformas IV, IX y XIV, benzolamida (BZL, 10 μ M) (grupo 5.2).

Para examinar la participación del NBC y de la AC en la RA, se repetirá el protocolo 3 pero en presencia de bloqueantes de las isoformas del NBC y de la AC, que serán administrados durante los primeros 10 min de la reperfusión.

3-Bloqueo del NBC: Se realizará una isquemia global normotérmica por 30 min y se administrará durante los primeros 10 minutos de la reperfusión una dilución 1:500 de un anticuerpo contra el dominio extracelular 4 (grupo 4.2) del NBC1. En otro grupo (4.3) se usará el compuesto S0859 (10 microM) el que según un trabajo reciente (36) es un inhibidor selectivo del NBC1 y del NBC3.

Parámetros a medir

-Tamaño del infarto

Al término del período de reperfusión los corazones serán teñidos con trifeniltetrazolio y mediante un programa de computadora (Scion Image 1.62) se determinarán las áreas de infarto y las áreas de riesgo.

-Contractilidad miocárdica

La contractilidad será evaluada a través de la presión desarrollada (PD), obtenida restando el valor de PDF a la PVI pico y la máxima velocidad de desarrollo de la PVI (+dP/dtmax). La rigidez miocárdica durante la reperfusión y la contractura isquémica serán evaluadas a través de la PDF.

Determinaciones bioquímicas

-Evaluación del daño oxidativo:

a- Peroxidación lipídica: La peroxidación lipídica se estimará a través de la medición del contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por método espectrofotométrico (37) y será expresado en nmol/mg proteína.

b- Nitración de proteínas: La interacción de peroxinitrito con tirosina produce la formación de nitrotirosina, cuyo contenido será evaluado por Western blot (38).

c- Sistemas antioxidantes

c1- Contenido de glutatión reducido (GSH): El contenido de sulfidrilos no proteicos en el homogenato cardíaco será determinado siguiendo el método de Sedlak y Lindsay (39).

c2- Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD): En una muestra del homogenato se determinará la actividad de SOD por inhibición de la formación de formazan (producido por reducción del nitroblue tetrazolium por el anión superóxido) a pH 10.2 y 25° C (40).

-Expresión de las cinasas p38, ERK1/2 y Akt y además del NBC y de la AC

Trozos de tejido serán homogeneizados en un medio de lisis (Complete Mini Roche) y Tris-HCl 20 mM, pH 7.4. En el sobrenadante producto de la centrifugación del homogeneizado a 1000 x g se medirá la expresión de las distintas cinasas, del NBC y de la AC por Western blot.

36.- Ch'en FF-T, Villafuerte FC, Swietach P, Cobden PM, Vaughan-Jones RD. S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart. Br J Pharmacol 153: 972-982, 2008

37.-Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 52:302-309, 1978.

38.-Nadruz WJr, Lagosta VJ, Moreno HJr, Coelho OR, Franchini KG. Simvastatin prevents load-induced protein tyrosine nitration in overloaded hearts. Hypertension 43: 1060-1066, 2004.

39.-Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 25(1):192-205, 1968.

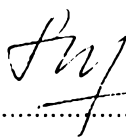
40.-Beauchamp Ch, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44: 276-287, 1971.

Condiciones de Presentación

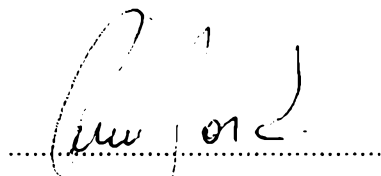
A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.



Firma del Director



Firma del Becario