

## INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

**BECA DE** Estudio **PERIODO** 2013

1. **APELLIDO:** Morell

**NOMBRES:** Malena

**Dirección Particular: Calle:** N°:

**Localidad:** La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

**Dirección electrónica (donde desea recibir información):** morellmalena@gmail.com

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

MECANISMOS SUBCELULARES INVOLUCRADOS EN LAS ARRITMIAS VENTRICULARES INDUCIDAS POR AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

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

**BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO:** Fecha de iniciación: 01/04/2013

**2º AÑO:** Fecha de iniciación:

**BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO:** Fecha de iniciación:

**2º AÑO:** Fecha de iniciación:

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

**Universidad y/o Centro:** Centro de Investigaciones Cardiovasculares

**Facultad:** Ciencias Médicas

**Departamento:** Ciencias Fisiológicas

**Cátedra:** Cátedra de Fisiología y Física Biológica, Facultad de Cs. Médicas, UNLP

**Otros:** Consejo Nac. de Invest. Cientif. y Técnicas / Ctro. Científico Tecnol. Conicet - La Plata

**Dirección: Calle:** : 60 y 120 **N°:**

**Localidad:** La PLata **CP:** 1900 **Tel:** (0221)4834833

5. **DIRECTOR DE BECA**

**Apellido y Nombres:** Vila Petroff Martin

**Dirección Particular: Calle:** N°:

**Localidad:** Hudson **CP:** 1890 **Tel:**

**Dirección electrónica:** mvila@aetos.med.unlp.edu.ar

**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).

A lo largo del corriente año estuve involucrada en dos proyectos diferentes, uno de los proyectos es mi proyecto de beca y se titula MECANISMOS SUBCELULARES INVOLUCRADOS EN LAS ARRITMIAS VENTRICULARES INDUCIDAS POR AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (Proyecto 1), y además, en otro proyecto cuyo título es 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 (Proyecto 2).

Para ambos proyectos aprendí técnicas como son: el aislamiento de miocitos, utilización de microscopio invertido de fluorescencia para medir contractilidad y  $Ca^{2+}$  intracelular con video detección de bordes en miocitos aislados y la utilización del microscopio confocal para medir  $Ca^{2+}$  citosólico y chispas de  $Ca^{2+}$  producidas por el receptor de rianodina del Retículo Sarcoplasmático.

El Proyecto 1 tiene como objetivo general el estudio de los mecanismos subcelulares involucrados en las arritmias inducidas por autoanticuerpos obtenidos de pacientes en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas y el Proyecto 2 propone examinar si el hinchamiento hipotónico de miocitos cardiacos promueve la liberación de NO y de ser así, evaluar su impacto sobre el acoplamiento excito-contráctil cardíaco.

En cuanto a las dificultades encontradas puedo mencionar aquella relacionada con la búsqueda de la concentración del Anticuerpo necesaria para generar un efecto inotrópico positivo similar al producido por los agonistas beta y que se asocia con una alta incidencia de arritmias.

En cuanto al Proyecto 2, no surgieron problemáticas dificultosas de resolver. Este último proyecto nos llevó a poder generar una publicación que será enviada en estos días a la revista Cardiovascular Research en la cuál figuro como coautora.

## **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.

**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.)

**7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)  
Hypotonic Swelling Promotes Nitric Oxide Release in Cardiac Ventricular Myocytes: Impact on Swelling-Induced Negative Inotropic Effect.

Luis Alberto Gonano\*, Malena Morell\*, Juan Ignacio Burgos, Raul Dulce, Joshua Hare and Martin Vila Petroff

\*contribuyen de manera similar al trabajo.

Cell swelling occurs in multiple pathological situations and has been shown to contribute to the deleterious effects of ischemia and reperfusion by promoting contractile dysfunction. Recent evidence from endothelial cells and outer hair cells of the cochlea shows that hypotonic swelling can induce nitric oxide (NO) release. Here we investigate whether hypotonic swelling promotes NO release in cardiac myocytes and if so, whether it impacts on swelling-induced contractile dysfunction.

Results: Perfusing rat cardiac myocytes, loaded with the NO sensor DAF-FM, with a hypotonic solution (HS; 217 mOsm), increased cell volume, reduced myocyte contraction and Ca<sup>2+</sup> transient amplitude and significantly increased DAF-FM fluorescence. When cells were exposed to the HS supplemented with 2.5 mM of the NO synthase inhibitor L-NAME, cell swelling occurred in the absence of NO release. Swelling-induced NO release was also prevented by the NOS1 inhibitor, Nitroguanidine, by inhibiting sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling with Ryanodine plus Cyclopiazonic Acid, and was absent in NOS1 knockout mice. In contrast, the increase in DAF-FM was not affected by the PI3K inhibitor Wortmannin, suggesting that NOS1 is the enzyme involved in HS-induced NO release. In addition, Colchicine (an inhibitor of microtubule polymerization) prevented the increase in DAF-FM fluorescence induced by HS indicating that microtubule integrity is necessary for swelling-induced NO release. Interestingly, swelling-induced negative inotropic effect was exacerbated in the presence of either L-NAME or Nitroguanidine suggesting that NOS1-derived NO provides contractile support. ODQ, the guanylate cyclase inhibitor, mimicked the effect of the NOS inhibitors, demonstrating that cGMP mediates NO-dependent contractile support. Moreover, ODQ reduced Ca<sup>2+</sup> wave velocity and the increment in ryanodine receptor (RyR2) phosphorylation at site Ser2808 induced by HS. These results suggest that hypotonic swelling-derived NO contributes to preserve contractile function via cGMP-dependent enhancement of RyR2 Ca<sup>2+</sup> release.

Conclusion: Our findings suggest a novel mechanism for NO release in cardiac myocytes with putative pathophysiological relevance in the context of ischemia and reperfusion, where it may serve a cardioprotective role by reducing the extent of contractile dysfunction associated with hypotonic swelling.

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

2012 Morell M, Gonano LA, Sepúlveda M and Vila Petroff M. "Hypotonic Swelling Promotes Nitric Oxide Release in Rat Cardiac Ventricular Myocyte: Impact on Swelling-Induced Negative Inotropic Effect". Gordon Conference, New London, New Hampshire, EEUU.

2013 Morell M, Gonano LA y Vila Petroff M. "El swelling hipotónico promueve un aumento de óxido nítrico en miocitos cardiacos de rata: El impacto en el swelling induce un efecto inotrópico negativo". Congreso FAC, Rosario, Argentina.

2013 Morell M, Vila Petroff M, Palomeque J, Somesse L. "Arritmias inducidas por autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas" Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico: CIC, septiembre de 2013, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2013 Morell M, Vila Petroff M, Gonano LA, Burgos JI. "El hinchamiento hipotónico promueve el aumento de Óxido Nítrico en Miocitos Cardíacos de Rata: impacto sobre el Efecto Inotrópico Negativo inducido por hinchamiento" XXXIV Reunión Científica Anual del

Consejo Argentino de Hipertensión Arterial. Sociedad Argentina de Cardiología, noviembre de 2013, Nordelta, El Tigre, Buenos Aires, Argentina.

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

Hasta el día de la fecha estuve trabajando con ambos proyectos mencionados previamente. Con respecto al proyecto de beca, me dedique a aprender diferentes técnicas para la realización de los experimentos que consistieron en la caracterización de los anticuerpos anti b-adrenérgicos monoclonales (ACb). Para ello, utilicé diferentes concentraciones del ACb (3, 30 y 100 nM) en células cardíacas de rata y estudié los efectos en cuanto al acortamiento celular, amplitud del transitorio de Calcio y generación de contracciones espontáneas.

Actualmente, estoy realizando experimentos con una dosis mayor del ACb con el objetivo de mimetizar los resultados encontrados con Isoproterenol (inotropismo positivo y alta incidencia de arritmias).

**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)

2013 Morell M, Vila Petroff M, Palomeque J, Somesse L. "Arritmias inducidas por autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas" Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico: CIC, septiembre de 2013, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2013 Morell M, Vila Petroff M, Gonano LA, Burgos JI. "El hinchamiento hipotónico promueve el aumento de Óxido Nítrico en Miocitos Cardíacos de Rata: impacto sobre el Efecto Inotrópico Negativo inducido por hinchamiento" XXXIV Reunión Científica Anual del Consejo Argentino de Hipertensión Arterial. Sociedad Argentina de Cardiología, noviembre de 2013, Nordelta, El Tigre, Buenos Aires, Argentina.

**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**

**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)  
El título del plan de trabajo a realizar en el período de prórroga seguirá siendo el mismo "MECANISMOS SUBCELULARES INVOLUCRADOS EN LAS ARRITMIAS VENTRICULARES INDUCIDAS POR AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS"

En esta nueva etapa me dedicaré, en primera instancia a seguir caracterizando el ACb a dosis más altas para luego trabajar con suero de pacientes Chagásicos intentando reproducir lo observado con el ACb monoclonal.

En conclusión, los objetivos planteados para esta segunda etapa serán:

- 1) Seguir trabajando con dosis más altas del ACb para una mejor caracterización de su efecto inotrópico y arritmogénico.
- 2) Determinar en cultivos celulares de miocitos provenientes de ratas normales el efecto de IgG obtenida de pacientes Chagásicos sobre la contractilidad, el manejo del Ca<sup>2+</sup>, la actividad del canal de rianodina, la liberación diastólica de Ca<sup>2+</sup> y la actividad arritmogénica.
- 3) Determinar si las alteraciones observadas a nivel celular inducidas por las IgG están asociadas con aumentos de AMPc y activación de PKA y si la inhibición de ésta quinasa previene la actividad arritmogénica.
- 4) Determinar si además de PKA, las IgG inducen activación de CaMKII reconocida como mediadora de arritmias, y si la inhibición de esta quinasa previene la inducción de arritmias.
- 5) Examinar si las IgG inducen arritmias y liberación diastólica de Ca<sup>2+</sup> en miocitos de animales transgénicos con los sitios de fosforilación para PKA y CaMKII, a nivel del RS, mutados para que no puedan ser fosforilados.
- 6) Determinar si la estabilización farmacológica del RyR previene liberación diastólica de Ca<sup>2+</sup> y las arritmias inducidas por IgG CH.
- 7) Examinar si los inhibidores de PKA, CaMKII y la estabilización farmacológica del RyR previene las arritmias en un modelo de ratas con enfermedad de Chagas en su etapa crónica.

La metodología que desarrollaremos será la siguiente:

Combinaremos estudios in vitro e in vivo, utilizando suero de pacientes Chagásicos y un modelo bien caracterizado de infección crónica. Se realizarán estudios bioquímicos, medidas de contractilidad y manejo del Ca<sup>2+</sup> por epifluorescencia y microscopia confocal en animales silvestres y transgénicos.

Para cumplir con el objetivo 2) purificaremos IgG humana: La fracción de IgG control (NCh) se obtendrá de pacientes destinados a cirugía ortopédica, considerados individuos sanos salvo por la afección que padecen. En cuando al suero de pacientes Chagásicos (Ch) será considerado solo el de individuos con signos y/o síntomas de IC. Las IgG totales serán purificadas por cromatografía estándar. La fracción de IgG se determinará por el método de Bradford.

Tanto el suero NCh como el de pacientes Chagásicos (Ch) se obtendrán con el consentimiento de los individuos involucrados. Los participantes de este proyecto adhieren a los principios de la Declaración de Helsinki y al Código de Regulaciones Federales de Estados Unidos, Protección de los Sujetos Humanos (revisado 2001; <http://ohrp.osophs.dhhs.gov/humansubjects/guidance/45cfr46.htm>). Es importante destacar

que ya hemos establecido una colaboración con el Dr. Oscar Bottasso de la Universidad de Rosario que nos proveerá de los sueros de los pacientes Chagásicos.

Se aislarán miocitos de rata Wistar y luego, las células serán resuspendidas en medio de cultivo. Los miocitos serán plaqueados a una densidad de  $\sim 2 \times 10^4$  células cilíndricas con claras estriaciones/ml en placas para cultivo por 1 h. Una vez adheridas las células, se procederá a cambiar el medio de cultivo por medio fresco con el agregado IgG Ch y NCh a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Las células serán incubadas en una estufa con una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% por 24-48 h. Luego de este periodo los miocitos serán removidos y se destinarán a los posteriores estudios.

Se tomarán medidas de contractilidad y  $\text{Ca}^{2+}$  en miocitos cultivados: para ello, los miocitos serán cargados con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescente Fura-2 A/M. Se realizarán pulsos de cafeína a fin de evaluar el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS y la función del NCX. La contractilidad se evaluará a través de un detector de bordes celular que mide el acortamiento de las células. Además, se obtendrán medidas de pérdida diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$  por microscopía confocal: para obtener imágenes confocales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, las células serán cargadas con el indicador fluo-3/AM durante 10 min (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ). En breve, los miocitos serán visualizados en el microscopio confocal, montado sobre un microscopio invertido. El fluo-3 será excitado a 488 nm utilizando un láser de argón y la fluorescencia será recolectada por un fotomultiplicador, a 515-565 nm. Las imágenes de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y de los eventos de liberación diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales de rianodina, denominadas chispas o sparks de  $\text{Ca}^{2+}$ , serán obtenidas escaneando una línea orientada sobre el eje mayor del miocito. Las imágenes serán procesadas usando el software Image J

Resultados esperados: se espera encontrar diferencias significativas en la contractilidad y el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cultivadas con la IgG Ch respecto de la NCh, recapitulando el deterioro de la función contráctil observada en la IC asociada con la enfermedad de Chagas. Esperamos que estas alteraciones estén asociadas con una pérdida diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , visualizadas como chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  asociadas con contracciones espontáneas indicativas de arritmias.

En cuanto al objetivo 3) tomaremos medida de AMPc: El AMPc celular se medirá de acuerdo a la técnica de radio inmuno ensayo, se medirá la actividad de PKA usando un Kit Gibco.

Se realizaran experimentos similares a los descritos en el objetivo 2) pero en presencia de inhibidores de PKA (H89) y del AMPc (Rp-8-CPT-cAMPS).

Resultados esperados: se espera encontrar aumento en la actividad de PKA y en los niveles de AMPc en los miocitos cultivados con la IgG Ch respecto de la NCh y que los inhibidores de PKA y AMPc prevengan las alteraciones funcionales observadas en el objetivo 2), específicamente las alteraciones asociadas con actividad arritmogénica.

Objetivo 4: Se medirá actividad de CaMKII: La actividad de la quinasa se evaluará a través de la inmunodetección de la misma, por Western Blot, en su estado fosforilado en el residuo Thr286 y de la activación (fosforilación) de uno de sus sustratos, el residuo Ser 2814 del canal de rianodina, por medio de anticuerpos específicos.

Se realizaran experimentos similares a los descritos en el objetivo 2) pero en presencia de inhibidores de CaMKII, KN93 y AIP.

Resultados esperados: Dado que la activación crónica de PKA conduce a la activación de CaMKII y esta promueve arritmias, especulamos encontrar activación de esta quinasa en los miocitos cultivados con la IgG Ch respecto de la NCh y que los inhibidores de la misma también prevengan las arritmias observadas en los miocitos con IgG Ch.

Objetivo 5: Se usaran ratones transgénicos mutantes para los sitios de fosforilación de PKA y CaMKII en el RyR, S2808A y S2814A, respectivamente y sus respectivos controles silvestres. Estos ratones ya están disponibles en nuestro Instituto fruto de nuestra colaboración con el Dr. Xander Wehrens de la Universidad de Baylor, Houston, Texas.

Aislaremos miocitos de estos ratones y realizaremos experimentos similares a los descritos en el objetivo 2) en los que evaluaremos el efecto del tratamiento con la IgG Ch respecto de la NCh sobre la inducción de arritmias.

Resultados esperados: se espera encontrar menor incidencia de arritmias en los ratones mutantes tratados con IgG Ch.

Objetivo 6: En estos experimentos usaremos 2 tratamientos, 1 uM carvedilol y 25 uM tetracaína para estabilizar el RyR y verificar si estos previenen la inducción de arritmias por tratamiento con IgG Ch. Para ello, repetiremos experimentos similares a los descritos en el objetivo 2 pero en presencia de 1 uM Carvedilol o tetracaína 25 uM.

Resultados esperados: Esperamos encontrar que la estabilización del RyR prevenga las arritmias inducidas por el tratamiento con IgG Ch.

Finalmente, examinaremos si los inhibidores de PKA, CaMKII y la estabilización del RyR previenen las arritmias en un modelo de ratas con enfermedad de Chagas en su etapa crónica.

Para cumplir este objetivo, las ratas serán criadas por personal capacitado en normas de bioseguridad y mantenidas de manera aislada en el bioterio de la Facultad de Medicina de La Plata. Los animales de 3 meses de edad serán inyectados subcutáneamente con 106 trypomastigotes de T.cruzi viables (línea Tulahuén). En este modelo, los parásitos circulantes desaparecen 30 días post inyección (PI) y las lesiones miocárdicas comienzan a ser detectables (o incluso ya están establecidas) a las 10 semanas PI. Los animales se estudiarán a las 12 semanas PI.

Las ratas Chagásicas y Sham serán tratadas con los inhibidores de PKA, CaMKII y estabilizadores del RyR a través de mini bombas osmóticas colocadas subcutáneamente desde los 30 días PI hasta las 12 semanas PI. Finalizado este periodo se les realizarán electrocardiogramas para verificar la presencia o ausencia de arritmias y luego serán sacrificadas para obtener miocitos y realizar experimentos similares a los descritos en el objetivo 2.

Resultados esperados: Se espera observar arritmias en las ratas con miocardiopatía Chagásica experimental y obtener resultados positivos para la prevención de las arritmias en las ratas tratadas con inhibidores de PKA y CaMKII y estabilizadores del RyR.

---

## 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