

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE ESTUDIO

PERIODO 2014

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: 03/04/2013

2º AÑO: Fecha de iniciación: 03/04/2014

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

2º AÑO: Fecha de iniciación:

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad: CIENCIAS MEDICAS

Departamento: CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Cátedra: FISILOGIA Y FISICA BIOLÓGICA

Otros: CCT LA PLATA/CENTRO DE INV.CARDIOVASCULARES

Dirección: Calle: 120 **N°:** S/N

Localidad: LA PLATA **CP:** 1900 **Tel:** 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).

Durante este último tiempo continué la investigación en los dos proyectos que me encontraba involucrada: MECANISMOS SUBCELULARES INVOLUCRADOS EN LAS ARRITMIAS VENTRICULARES INDUCIDAS POR AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (Proyecto 1), y 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).

En cuanto a las técnicas utilizadas, realicé mis tareas con las técnicas aprendidas con anterioridad: 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. También, en esta etapa realicé experimentos bioquímicos utilizando la técnica Western Blot en el proyecto 1.

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 no correlación encontrada entre el ensayo de western blot y los experimentos funcionales en el Proyecto 1. En el ensayo mencionado, pudimos detectar la fosforilación del sitio Ser16 a concentraciones de 50 y 100 nM tanto del agonista beta adrenergico Isoproterenol como del Autoanticuerpo contra el receptor beta 1, ambos involucrados en la activación de la cascada beta adrenérgica. Cuando realicé experimentos funcionales en miocitos aislados con esas dosis pudimos observar un inotropismo positivo característico con Isoproterenol pero no con el anticuerpo. Así mismo, el Isoproterenol indujo un aumento significativo de contracciones espontáneas (indicativo de arritmias) en tanto, el Ac no produjo un aumento de este sustrato arritmogénico.

En cuanto al Proyecto 2, no surgieron problemáticas dificultosas de resolver. Este último proyecto nos llevó a poder generar un manuscrito que se encuentra en revisión en la revista Cardiovascular Research en la cuál comparto primera autoría.

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.)

Resumen del manuscrito enviado a la revista Cardiovascular Research

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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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.

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

(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

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.

2012 Luis Gonano, Malena Morell, , Marisa Sepúlveda and Martin Vila Petroff. "Hypotonic Swelling Promotes Nitric Oxide Release in Rat Cardiac Ventricular Myocyte: Impact on Swelling-Induced Negative Inotropic Effect". Reunión anual de la International Society for Heart Research, Santiago de Chile

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 Gonano L, Morell M, Vila Petroff M. "Hypotonic swelling promotes Nitric Oxide release in rat cardiac myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect". ISHR World Congress. San Diego, USA . Revista: Journal of Molecular and Cellular Cardiology.

2014 Gonano L, Morell M, Burgos JI. "Hypotonic Swelling Promotes Nitric Oxide Release in Cardiac Ventricular Myocytes". Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions. American Heart Association: Las Vegas, USA

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

Los resultados obtenidos hasta el día de hoy del tema de Investigación "Mecanismos subcelulares involucrados en las arritmias ventriculares inducidas por autoanticuerpos asociados con la enfermedad de Chagas" forman parte de un manuscrito en proceso de elaboración del cual adjunto resumen

Effect of beta1-adrenergic autoantibodies on ventricular cardiac myocyte arrhythmogenic activity. M. Morell, L. Sommese, L. Tasso, K. Gomez, J. Palomeque and M. Vila Petroff.

Recent evidence suggests that autoantibodies may be involved in the pathogenesis of arrhythmias associated with chagasic myocardopathy. Indeed, whole hearts perfused with sera containing anti beta1-adrenergic receptor antibodies (AB β 1) isolated from patients with chagasic myocardopathy have been shown to be arrhythmogenic. Here we explored whether monoclonal antibodies raised against the ribosomal P2 α protein of Trypanosoma cruzi which cross react and activate the beta1-adrenergic receptor (AB β 1) are proarrhythmogenic through direct effects on ventricular cardiac myocytes. Our results show that increasing concentrations of AB β 1 fail to promote arrhythmogenic activity in adult rat ventricular myocytes. In contrast, similar doses of the

beta-adrenergic agonist isoproterenol (ISO) produced a significant increase in spontaneous contractile activity and Ca²⁺ release. In addition AB \square I had no effect on PKA-sensitive phospholamban phosphorylation whereas this phosphorylation was significantly enhanced by ISO. We conclude that the arrhythmic activity induced by AB \square I is not mediated by direct effects on the cardiac myocyte.

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

8.1. DOCENCIA

julio 2014-Actualidad: Ayudante Ad honore, en la cátedra Fisiología y Física Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

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)

Curso de Cultivos Celulares realizado en el IMBICE (La Plata) con una duración de 60 hs y con la realización de actividades teóricas y prácticas

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)

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO INDUCIDA POR HINCHAMIENTO HIPOTONICO Y SU POTENCIAL IMPACTO SOBRE EL MANEJO DEL CALCIO INTRACELULAR, LA CONTRACTILIDAD MIOCÁRDICA Y LA VIABILIDAD CELULAR

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