



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**SEÑALES DE Ca²⁺ EN EL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO
CARDIACO Y SEÑALES MITOCONDRIALES EN LA ISQUEMIA
Y REPERFUSIÓN**

Tesista: Mg. IB. Diana Catalina Alejandra Cely Ortiz

Director/a: Dra. Alicia Mattiazzi

Codirector/a: Dr. Ariel Escobar

Año: 2022

AGRADECIMIENTOS

En este espacio plasmo mi más sincero y profundo sentimiento de agradecimiento a cada una de las personas, grupos e instituciones que han apoyado y aportado para lograr el producto final de esta investigación.

En principio agradezco al Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio Cingolani, dirigido por el Dr. Martín Vila Petroff, por abrirme las puertas y brindarme el respaldo para iniciar, aprender y realizar esta investigación.

A todos(as) aquellos(as) amigos(as) y compañeros(as) de laboratorio, entre becarios(as) de doctorado y postdoctorado, profesionales y técnicos(as) de apoyo, e investigadores, como Gabriela Mazzochi, Alejandro Ciocci, Joshua Godoy, Guillermina Mangioni, Luciana Sapia, Omar Vélez R, Leandro Di Cianni, Omar Castillo, Ramiro Martínez, Fernanda Carrizo, Manuela Santalla, entre otros, quienes con su amistad y área de conocimiento me han enseñado y aportado no solo técnicas de experimentación, material y soluciones, mantenimiento y preservación del modelo animal, análisis de datos, software y demás herramientas necesarias para el desarrollo de esta investigación, sino también palabras de orientación y motivación que han contribuido en gran medida a mi crecimiento personal y profesional.

Agradezco a los Drs. Ariel Escobar y Carlos Valverde, investigadores que han sido esenciales en mi formación, transmitiéndome no sólo su conocimiento sino también su ejemplo al investigar.

De forma especial quiero agradecer, a quien le profeso mi más sincera admiración; a mi Directora e Investigadora Superior Emérita, Dra. Alicia Mattiazzí, que decidió armarse de paciencia para tomar esta “piedra en bruto” algo cuadrículada y emocional, para tallarla y guiarla en este mundo de la investigación. Gracias Doctora, ya que gracias a su talante, energía, diversas maneras de enseñar y sobre todo con su ejemplo, hoy e impreso 2 tesis de investigación, una de ellas como la que tiene en sus manos el lector.

Finalmente, quiero agradecer a los principales... a los motores de mi vida: a mis padres Luis Hernán Cely Prieto y Blanca Myriam Ortiz de Cely, ya que en cada uno de mis escalones han estado para brindarme ese apoyo incondicional y siendo mi motor en los diferentes momentos que tuvo estos años de investigación.

DC. Alejandra Cely Ortiz

Junio 2022

DEDICATORIA

El trabajo que el lector tiene en sus manos, lo dedico a toda mi familia, en especial a mis hermanas sobrinas y sobrinos, cuñados y concuñados, a mi cómplice de vida, a quienes siempre han tenido una palabra de motivación.

*En especial y principalmente dedico este trabajo de investigación a mis padres **Luis Hernán Cely P.** y **Blanca Myriam Ortiz de Cely**, quienes siempre me apoyaron y empujaron a seguir adelante en cada minuto de este proyecto al ser todo un reto que costo tiempo, esfuerzo y dedicación. A ellos, quienes dejé los últimos años de sus vidas y aunque no pudieron presenciar mi titulación de Magíster ni de Doctora, sé que hoy se sentirían muy orgullosos de los logros profesionales que he llegado a obtener.*

Por y para ellos.

DCACO
Junio 2022

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	11
1. CONSIDERACIONES FISIOLÓGICAS DE LA FIBRA MUSCULAR CARDÍACA.....	12
1.1. ACOPLAMIENTO EXCITO-CONTRÁCTIL (AEC)	13
1.1.1. Sarcolema y los túbulos T.....	15
1.1.2. Canales de Ca ²⁺ operados por voltaje (DHPR).....	15
1.1.3. Retículo sarcoplasmático (RS).....	16
1.1.4. Receptores de rianodina cardíacos (RyR2)	16
1.1.5. Bomba Ca ²⁺ ATPasa [SERCA2a].....	17
1.1.6. Fosfolamban (PLN).....	18
1.1.7. Intercambiador electrogénico Na ⁺ /Ca ²⁺ [NCX].....	18
1.1.8. CaMKII.....	19
1.2. MITOCONDRIA	20
1.3. RELACIÓN RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO / MITOCONDRIA	21
2. DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.....	23
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. GENERAL.....	28
4.2. ESPECÍFICOS.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5. MODELO EXPERIMENTAL - MODELO MURINO.....	29
5.1. C57BL/6 (<i>wild type</i> , WT).....	29
5.2. S2814A y S2814D	30
5.3. PLNKO.....	30
5.4. SDKO.....	30

5.5. SAKO.....	30
5.6. APROBACIÓN ÉTICA	31
6. MÉTODOS USADOS EN EL MODELO MURINO	31
6.1. TÉCNICA DE LANGENDORFF	32
6.2. TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE CARDIOMIOCITOS.....	33
6.2.1. Cinética de Ca ²⁺ intracelular en miocitos.	34
6.2.2. Medida de sparks de Ca ²⁺ en el corazón intacto.	36
6.3. PROTOCOLO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN	37
6.4. TÉCNICA DE TINCIÓN PARA EVALUAR EL ÁREA DEL INFARTO .	38
6.5. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS Y EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	39
6.5.1. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	40
6.5.2. <i>Swelling</i> mitocondrial (Determinación de la sensibilidad al Ca ²⁺ del poro de permeabilidad transitorio, mPTP).....	41
6.6. TÉCNICA DE WESTERN BLOT	42
6.6.1. Preparación de muestra proteica.....	43
6.6.2. Separación de proteínas por electroforesis.	43
6.6.3. Transferencia de proteínas a una membrana	44
6.6.4. Inmunotinción.....	44
6.6.5. Visualización de proteínas	45
7. ESTADISTICA	45
IV. RESULTADOS	46
8. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE RATÓN USADAS.....	46
8.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	46
8.2. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE Ca ²⁺ EN LOS MIOCITOS DE LAS DIFERENTES CEPAS.....	47
8.3. EFECTO DE LA ABLACIÓN DE PLN EN EL DAÑO POR I/R PRODUCIDO POR LA PSEUDOFOSFORILACIÓN CONSTITUTIVA DEL RESIDUO Ser ²⁸¹⁴ DEL RyR2 EN CORAZONES S2814D.....	49

8.4. EL AUMENTO DEL DAÑO MIOCÁRDICO EN SDKO RESPECTO A S2814D Y PLNKO ESTÁ ASOCIADO CON DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.	52
9. PÉRDIDA DE Ca^{2+} EN DIÁSTOLE	55
V. DISCUSIÓN	58
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1. Esquema de una fibra muscular cardiaca de mamífero. _____	12
Figura 2. Representación del Acoplamiento Excito-Contráctil de un Cardiomiocito. _____	14
Figura 3. Estructura del RyR2. _____	17
Figura 4. Esquema donde se muestran las fosforilaciones por CaMKII a distintas proteínas. _____	20
Figura 5. Comunicación entre mitocondria y RS. _____	22
Figura 6. Cambios en la dinámica del Ca^{2+} citosólico y del RS en pre-isquemia y reperfusión. _____	24
Figura 7. Activación de la CaMKII y fosforilación de Thr ¹⁷ de PLN y Ser ²⁸¹⁴ de RyR2 al inicio de la reperfusión. _____	25
Figura 8. Efecto en la función contráctil y daño miocárdico, por impedimento de la fosforilación de PLN. _____	26
Figura 9. Efectos opuestos del aumento del secuestro de Ca^{2+} sobre el Ca^{2+} citosólico _____	27
Figura 10. Representación esquemática de las alteraciones a nivel de proteínas del RS y del manejo de Ca^{2+} en las diferentes cepas. _____	29
Figura 11. Representación de las cruces de cepas para obtener las cepas SDKO y SAKO. _____	31
Figura 12. Canulación para técnica de Langendorff. _____	32
Figura 13. Aislamiento de cardiomiocitos de corazón de ratón por digestión enzimática. _____	33
Figura 14. Equipo Ion Optix y diagrama de flujo. _____	34
Figura 15. Fórmula estructural del Fura-2AM o Fura-2-acetoximetil éster. _____	36
Figura 16. Fórmula estructural del Fluo-4AM _____	37
Figura 17. Protocolo de isquemia y reperfusión (I/R). _____	37
Figura 18. Esquema del protocolo de I/R y determinación de infarto. _____	38
Figura 19. Ejemplo de cortes de corazón. _____	38
Figura 20. Esquema del protocolo de I/R y determinación de la función mitocondrial. _____	39
Figura 21. Trazo típico de una determinación de potencial de membrana mitocondrial con la técnica de R-123. _____	40
Figura 22. Trazado típico de los cambios en la dispersión de la luz. _____	42
Figura 23. Pasos para un Western Blot. _____	42
Figura 24. Genotipificación mediante PCR en tejido de cola de ratón SAKO. _____	46
Figura 25. Expresión de diferentes proteínas involucradas en el AEC en las distintas cepas usadas. _____	47
Figura 26. Características de la dinámica del Ca^{2+} en las diferentes cepas. _____	48
Figura 27. Registros mecánicos y áreas de infarto en I/R "largas" en las diferentes cepas estudiadas. _____	50
Figura 28. Registros mecánicos y de tamaño del infarto después de I/R Cortas, en las diferentes cepas. _____	52
Figura 29. A-B. Potencial de membrana mitocondrial. _____	53
Figura 30. Experimentos típicos y resultados totales del hinchamiento mitocondrial. _____	54
Figura 31. Pérdida de Ca^{2+} en diástole en diferentes cepas. _____	55
Figura 32. Frecuencia de sparks de Ca^{2+} y pérdida de Ca^{2+} en reperfusión. _____	56
Figura 33. Cascada de señales involucradas en el daño miocárdico por I/R. _____	58
Figura 34. Rol del secuestro de Ca^{2+} en la pérdida de Ca^{2+} . _____	61

ABREVIATURAS

- AEC: Acoplamiento Excito-Contráctil
- AMPc: Adenosina de monofosfato cíclico (AMP Cíclico)
- ATP: Adenosina trifosfato
- BBS: Solución fisiológica de bicarbonato
- Ca^{2+}_m : Calcio mitocondrial
- Ca^{2+}_{RS} : Calcio del retículo sarcoplasmático o Calcio reticular
- $[Ca^{2+}]$: Concentración de Ca^{2+}
- $[Ca^{2+}]_{EXT}$: Concentración de Ca^{2+} extracelular
- $[Ca^{2+}]_m$: Concentración de Ca^{2+} mitocondrial
- Ca^{2+}_{RS} : Calcio del retículo sarcoplasmático.
- CaM: Calmodulina.
- CaMKII: Quinasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina 2.
- CICR: Del inglés "*calcium induced calcium release*", se refiere a la "liberación de calcio inducida por calcio".
- DHP: Dihidropiridinas
- DHPR: Receptor de dihidropiridinas
- E_{NCX} : Potencial de equilibrio de NCX ($[E_{NCX} = 3E_{Na} - 2E_{Ca}]$)
- FADH₂: Flavín adenín dinucleótido
- HAX-1 una proteína que regula la actividad de PLN y el mPTP
- I_{CaL} : Corriente de Ca^{2+} del canal de Ca^{2+} tipo L.
- IM: Infarto de miocardio.
- IP₃R: Receptores de inositol 1,4, 5-trifosfato.
- I/R: Isquemia y reperfusión
- JSR: Cisterna terminal de unión o JSR por sus siglas en inglés "*Junctional Sarcoplasmic Reticulum*"
- K_D : Equilibrio de constante de disociación
- K_i : Coeficiente de permeabilidad de la membrana interna
- K_o : Coeficiente de permeabilidad de la membrana externa
- LTCC: Del inglés "L-type Ca^{2+} Channel", se refiere a canales de Ca^{2+} tipo L.
- LRS: Región longitudinal del RS.
- MCU: Del inglés "*mitochondrial calcium uniporter*" que se refiere a la proteína de membrana "uniportador de calcio mitocondrial"
- MF_n-2: Mitofusina 2
- MME: Membrana mitocondrial externa
- MMI: Membrana mitocondrial interna
- Mptp: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
- mRyR1: Receptor de rianodina mitocodrial.
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleótida, cofactor ayudante de enzimas.
- NCLX: Intercambiador $Na^+Ca^{2+}Li^+$ mitocondrial
- NCX1: Intercambiador Na^+/Ca^{2+} cardiaco.
- PA: Potencial de acción.
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Señales de calcio en el retículo sarcoplasmático cardiaco y señales mitocondriales en la isquemia y reperfusión.

- PKA: Proteína kinasa dependiente de AMPc
- PLN: Fosfolamban.
- PP1: Fosfoproteína fosfatasas-1, Representa el mayor grupo de serina/treonina proteína fosfatasas
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno.
- PDVI: Presión desarrollada del ventrículo izquierdo.
- ROS: Especies reactivas del oxígeno
- RS: Retículo Sarcoplasmático.
- RyR2: Receptor de rianodina cardiaco, también denominado canal liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático.
- SA: Solución fría de aislamiento.
- SERCA: Ca-ATPasa del RS o bomba de Ca^{2+} en su isoforma II, denominada SERCA.
- Ser²⁸¹⁴: Sitio fosforilable serina 2814.
- Tca²⁺: Transitorio de Ca^{2+} .
- Thr¹⁷: Sitio fosforilable treonina 17.
- TnC Troponina C.
- Tn-Tm Complejo troponina-tropomiosina.
- TTC: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio o simplemente cloruro de tetrazolio es un indicador redox utilizado para diferenciar tejidos metabólicamente activos e inactivos
- VDAC *Del inglés "Voltage-dependent anion channel" es el "canal aniónico sensible a potencial"*
- VI: *Ventrículo Izquierdo*
- Vm: Potencial de membrana.

I. INTRODUCCIÓN

El infarto de miocardio (IM) constituye una causa principal de morbilidad y mortalidad en los países occidentales (Mozaffarian D, 2016) y en el mundo (OMS, 2020). Ocurre debido a la obstrucción de una arteria coronaria y el consecuente riego sanguíneo insuficiente. Si bien la reperfusión temprana es la mejor estrategia para limitar el tamaño del infarto, la reperfusión por sí misma, induce injuria adicional (Beller, 2001; Piper, Abdallah, & Schäfer, 2004; Garcia-Dorado, Ruiz-Meana, Inserte, Rodriguez-Sinovas, & Piper, 2012). En este escenario, es ampliamente aceptado que, aunque las causas del efecto deletéreo del episodio isquémico seguido de reperfusión son multifactoriales, el manejo alterado del Ca^{2+} intracelular juega un papel clave en dicha injuria, participando en la producción de arritmias potencialmente letales y muerte celular. A pesar de su enorme importancia, el conocimiento de los mecanismos que determinan la injuria por isquemia y reperfusión (I/R) es todavía incompleto.

En nuestro laboratorio, se ha descrito el rol dual de la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) en la I/R: beneficioso en la I/R reversible, o *corazón atontado*, caracterizado por una disfunción post-isquémica completamente reversible (Said, y otros, 2003) y perjudicial en la I/R irreversible, con daño cardiaco y muerte celular por necrosis y apoptosis (Salas, y otros, 2010; Di Carlo, y otros, 2014). En experimentos previos también se ha descrito una liberación súbita de Ca^{2+} proveniente del retículo sarcoplasmático (RS) al inicio de la reperfusión (Valverde, y otros, 2010).

También se ha demostrado en nuestro y otros laboratorios que la pérdida de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (RyR2) del RS, constituye un factor principal tanto en la propensión a arritmias como en la producción de apoptosis y necrosis en la I/R (Salas, y otros, 2010; Van Oort, y otros, 2010; Said M. , y otros, 2011; Di Carlo, y otros, 2014; Mazzocchi, y otros, 2016). Esta pérdida de Ca^{2+} puede ocurrir por alteración de los RyR2 y/o por aumento del secuestro de Ca^{2+} y contenido de Ca^{2+} del RS. Si bien el rol deletéreo de la alteración de los RyR2 ha sido bien establecido, los estudios son contradictorios acerca de si el aumento del secuestro de Ca^{2+} por el RS resulta beneficioso o perjudicial tanto en el escenario de la I/R como de cualquier condición de sobrecarga de Ca^{2+} , se asocie o no con una alteración de los RyR2 (Cross HR, 2003; Del Monte, y otros, 2004; Yang

Y, 2006; Talukder MA, 2007; Zhou X, 2007; Nicolaou P, 2009; Stokke MK, 2010; Kho C, 2015; Valverde, y otros, 2019)

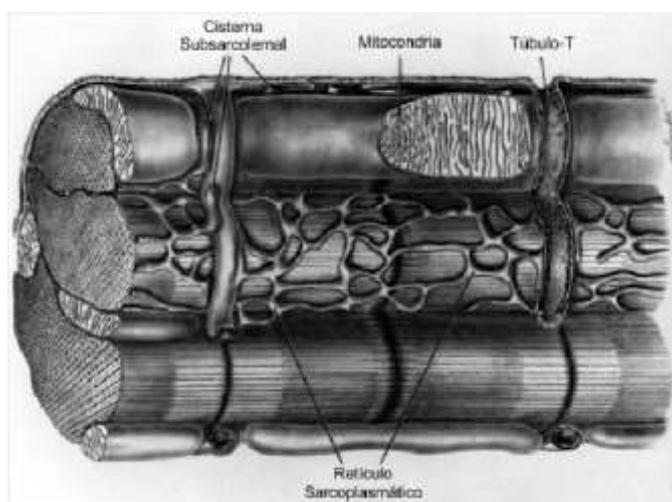
Uno de los factores determinantes del daño miocárdico puede ser la capacidad de la mitocondria de manejar el exceso de Ca^{2+} que libera el RS al inicio de la reperfusión.

En el presente trabajo, se realizaron experimentos en ratones genéticamente modificados en distintas proteínas que intervienen en el manejo del Ca^{2+} , a fin de explorar fundamentalmente el rol del aumento del secuestro de Ca^{2+} en el daño miocárdico durante la I/R, con especial énfasis en el estudio de la función mitocondrial, estudio que no habíamos abordado previamente en forma directa.

Como introducción el lector encontrará explicado a continuación, algunos elementos que intervienen en la actividad miocárdica y su posible vinculación con las alteraciones que ocurren durante la I/R.

1. CONSIDERACIONES FISIOLÓGICAS DE LA FIBRA MUSCULAR CARDÍACA

Las fibras musculares o *cardiomiocitos* son células cardíacas mononucleadas, de aspecto alargado y estriado, que poseen una estructura altamente organizada.



(Fawcett & McNutt, 1969)].

Figura 1. Esquema de una fibra muscular cardíaca de mamífero.

Se señalan: **los túbulos T**, invaginaciones sarcolemales perpendiculares a las líneas Z del sarcómero que en comparación con el músculo esquelético, tienen un diámetro mayor; el **retículo sarcoplasmático**, constituido por un conjunto de túbulos anastomosados entre sí, con pequeñas expansiones saculares terminales, llamadas cisternas subsarcolemales, que están en estrecho contacto con los tubos en T; y las **mitochondrias**, que son abundantes en estas células.

[Modificado de Fawcett, 1969]

Como se ve en la [Figura 1](#), el cardiomiocito está constituido por el *sarcolema*, una membrana plasmática con profundas invaginaciones hacia el interior de la célula (Túbulos T); el *sarcoplasma*, que es el citoplasma de este tipo de células; el *retículo sarcoplasmático (RS)*, constituido por túbulos y cisternas anastomosadas entre sí que constituye el reservorio de Ca^{2+} , y el *sarcómero*, la unidad contráctil del músculo.

Los cardiomiocitos se encuentran ensamblados entre sí por discos intercalares y comunicados por conexinas, hecho que favorece su comportamiento como un sincitio durante el proceso de contracción-relajación.

1.1. ACOPLAMIENTO EXCITO-CONTRÁCTIL (AEC)

El mecanismo del AEC en el cardiomiocito, articula un conjunto de fenómenos esquematizados en la [Figura 2](#), acoplando la actividad eléctrica con la actividad mecánica de la fibra muscular.

La membrana celular está polarizada, existiendo una diferencia de potencial, a través de ésta, de aproximadamente -80 mV en el miocito cardíaco. Un estímulo eléctrico o nervioso produce un cambio pasivo, electrotonico de la membrana celular. Este cambio despolariza la membrana hasta el umbral de excitabilidad que desencadena el potencial de acción (PA) por la apertura de los canales de Na^+ . El ingreso de Na^+ a través de canales rápidos de Na^+ , aumenta el potencial de membrana a valores aproximados de $+30$ mV a $+50$ mV. La despolarización de la membrana ocasiona la activación de los canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} tipo L, también conocidos como receptores de dihidropiridinas (DHPR - Ver [Figura 2](#)), y permite el paso de una pequeña corriente de Ca^{2+} . Estos iones se unen a los canales receptores de rianodina (RyR2) e inducen la liberación de más Ca^{2+} del RS ($\text{Ca}^{2+}_{\text{RS}}$). Este mecanismo es conocido con el nombre de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} , o en inglés: *Calcium Induced Calcium Release (CICR)* (Fabiato & Fabiato, 1975).

La liberación de Ca^{2+} desde el RS aumenta de forma transitoria el Ca^{2+} en el citosol (transitorio de Ca^{2+} - TCa^{2+}). El Ca^{2+} se une a la troponina C (TnC), provocando un cambio conformacional en el complejo troponina-tropomiosina

[Tn-Tm] que permite la interacción de los filamentos de actina-miosina y su desplazamiento entre sí. Como consecuencia el sarcómero se acorta y se produce la contracción del miocito.

El aumento del Ca^{2+} en el citosol también activa sistemas de transporte de Ca^{2+} . Uno de ellos es *la bomba Ca^{2+} -ATPasa* (SERCA2a) por donde gran parte del Ca^{2+} liberado reingresa al RS. La SERCA2a es modulada por el estado de fosforilación de otra proteína, llamada fosfolamban (PLN). Otro sistema importante en el manejo de Ca^{2+} es *el intercambiador electrogénico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$* (NCX) que extruye una fracción de Ca^{2+} , igual a la que entró por los DHPR intercambiándolo por Na^+ (en una relación de 1 Ca^{2+} a 3 Na^+). Este conjunto de sistemas produce la caída del transitorio de Ca^{2+} y la relajación del miocito.

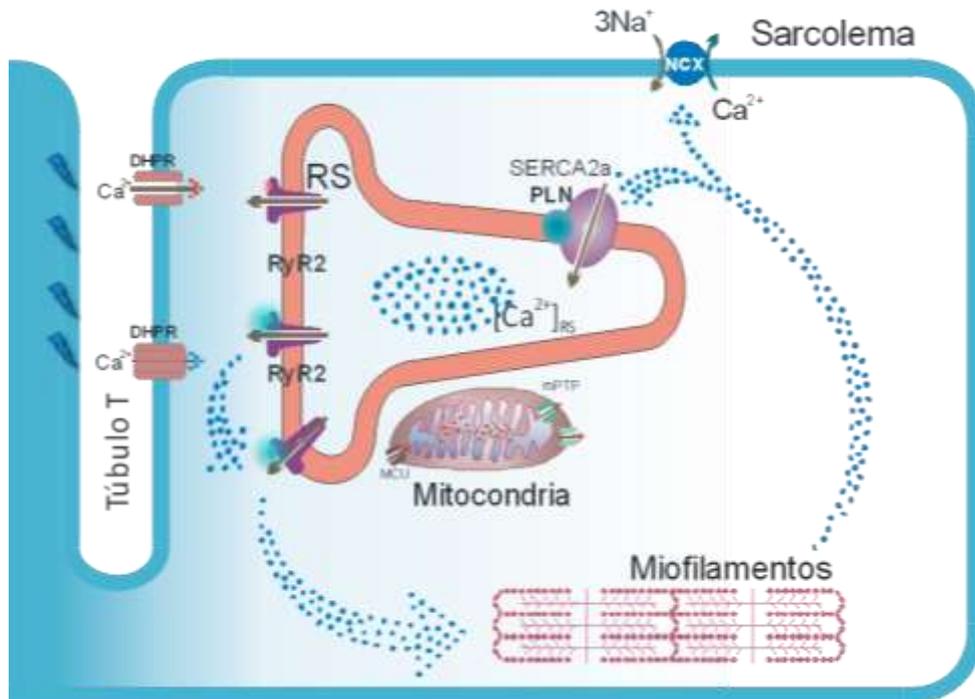


Figura 2. Representación del Acoplamiento Excito-Contráctil de un Cardiomiocito.

DHPR: Receptores de Dihidropiridinas o canales de Ca^{2+} tipo L; RS: Retículo Sarcoplasmático; RyR2: Receptores de rianodina o canales liberadores de Ca^{2+} del RS; SERCA2a: Ca -ATPasa del RS o bomba de Ca^{2+} en su isoforma II; PLN: fosfolamban, proteína reguladora de SERCA; NCX: Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Como se puede observar, hay diferentes elementos involucrados en el AEC cardíaco, y la interacción normal entre las diferentes proteínas responsables de la liberación y recaptura de Ca^{2+} por parte del RS, está altamente regulada por diferentes mecanismos que involucran quinasas, fosfatasa,

fosforilaciones, desfosforilaciones, y otras modificaciones postraduccionales

(Ver por ejemplo, revisiones de (Kranias & Hajjar, 2012; Federico, Valverde, Mattiazzi, & Palomeque, 2019).

Para explicar las alteraciones o “mal funcionamiento” del AEC, es imprescindible recordar algunos detalles particulares de la estructura y función de los actores esenciales del mismo.

1.1.1. SARCOLEMA Y LOS TÚBULOS T.

El sarcolema, como toda membrana, es una bicapa lipídica que conforma una barrera de permeabilidad selectiva entre el citosol y el espacio extracelular, que delimita el cardiomiocito y en la que se encuentran inmersas gran diversidad de proteínas con funciones biológicas específicas.

Su principal característica es poseer profundas invaginaciones que penetran al interior de la célula en forma perpendicular a su superficie, de un diámetro aproximado de 255 nm, denominadas Túbulos-T. Ocupan aproximadamente el 3.6% del volumen celular y se ubican en mayor medida (60 %) a nivel de la línea Z del sarcómero, en tanto que un 40% se distribuye a lo largo de las miofibrillas (Soller & Cannell, 1999). Esto permite la rápida propagación de la excitación hacia el interior de la célula (menos de 40 ms).

1.1.2. CANALES DE Ca^{2+} OPERADOS POR VOLTAJE (DHPR).

Los canales de Ca^{2+} tipo L son canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que se inactivan lentamente [*Long-Lasting*], y son característicamente sensibles a las dihidropiridinas (DHP) por lo que se les conoce como canales receptores de dihidropiridinas (DHPR). Se encuentran ubicados en los túbulos T del sarcolema y se activan con potenciales de membrana próximos a -40mV. Esto permite el ingreso de Ca^{2+} al interior del cardiomiocito, convirtiéndose en una pieza fundamental para dar inicio al proceso de CICR.

Los canales de Ca^{2+} también son permeables a otros cationes como Sr^{2+} y Ba^{2+} y es común que se usen como sustitutos iónicos en diferentes técnicas de investigación.

1.1.3. RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (RS)

El extenso sistema de membranas que rodea a cada miofibrilla es el retículo sarcoplasmático (RS), un compartimiento delimitado por una membrana totalmente intracelular que no es continua con el sarcolema, pero sí con la membrana nuclear (Bers & Shannon, 2013).

Su ultraestructura está constituida por regiones longitudinales (LRS) en las que se puede identificar zonas *reticulares* y zonas *corbulares*. La zona reticular se caracteriza por sus túbulos interconectados entre sí, rodeando a las miofibrillas. La zona corbular se identifica porque no interacciona con el sarcolema y aunque expresa RyR2, tiene presencia predominante de SERCA2a.

Cada fragmento del RS se inicia y termina en lo que se describe como una cisterna terminal de unión o JSR por sus siglas en inglés "*Junctional Sarcoplasmic Reticulum*". El conjunto formado por la cisterna terminal del RS y la membrana de los túbulos T donde se encuentran los canales de Ca^{2+} tipo L, se denomina diada. Esta disposición es un sitio estratégico para el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

En cuanto a la capacidad de almacenaje, se ha descrito que esta organela puede llegar a almacenar entre 50 y 250 μM de Ca^{2+} , cantidad que supera ampliamente el Ca^{2+} necesario para un ciclo de contracción (en el orden de 0.5 - 1 μM) (Bers D. , 2001).

1.1.4. RECEPTORES DE RIANODINA CARDÍACOS (RyR2)

El RyR2, con un peso molecular de ~550 kDa, es el canal proteico más grande conocido. Se caracteriza por su gran afinidad por el alcaloide vegetal rianodina, lo que le da el nombre de receptor de rianodina (RyR) y se puede encontrar en distintas isoformas (RyR1, RyR2 y RyR3) codificadas por genes diferentes. El monómero de los RyR2 es de casi 5.000 aminoácidos, organizados como una serie de dominios discretos, con el segmento carboxilo terminal cruzando la membrana del RS y formando el poro de permeabilidad al Ca^{2+} (Camors & Valdivia, 2014).

En el músculo cardíaco se encuentra la isoforma tipo 2 (RyR2). Tiene una estructura homotetramérica (ver [Figura 3](#)) que junto a moléculas reguladoras como la calmodulina (CaM), proteínas de unión Fk-506, fosfatasa (PP1, PP2a) y quinasas como CaMKII, forma un complejo macromolecular.

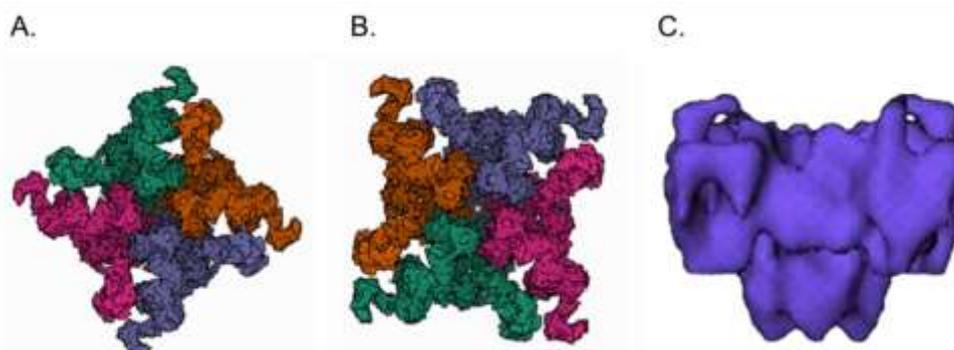


Figura 3. Estructura del RyR2.
A. en estado abierto. B. en estado cerrado (criomicroscopía electrónica). C. Estado cerrado, vista en 3D. [Tomado de Protein Data Bank].

Los RyR2 se ubican en la JSR del RS donde se enfrenta con los canales de Ca^{2+} tipo L. La mayor parte de la proteína (~ 90%) sobresale hacia el citosol dejando una brecha de ~ 15-20 nm entre las membranas del RS y el túbulo-T. Esta porción del RyR2 contiene principalmente sitios de activación e inactivación de Ca^{2+} , así como sitios de fosforilación (Camors & Valdivia, 2014).

Como se comentó anteriormente, la actividad de los RyR2 está regulada por fosforilaciones y otros cambios postraduccionales (Ej: nitrosilaciones y oxidaciones) (Köhler, Sag, & Maier, 2014). En este trabajo, una de las fosforilaciones de particular interés, es la fosforilación del sitio Ser^{2814} producida por la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII), que ocasiona un aumento de la actividad del canal (ganancia de función) (Wehrens X. , Lehnart, Reiken, & Marks, 2004) y su manipulación es una potencial herramienta experimental (ver [Capítulo II](#) - Materiales y Métodos).

1.1.5. BOMBA Ca^{2+} ATPASA [SERCA2A]

La bomba de Ca^{2+} o Ca-ATPasa del RS es una enzima de la familia de las ATPasas tipo P (capaces de autofosforilarse, de allí la P, de *Phosphorylated*), caracterizada por tener un peso molecular de ~110 kDa, y ser dependiente de ATP para cumplir su función de transportar Ca^{2+} al interior del RS.

La familia de ATPasas tipo P, están constituidas por el producto de 3 genes homólogos SERCA (denominada así por su sigla en inglés “*sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase*”) 1, 2 y 3. La isoforma que se expresa predominantemente en el músculo cardiaco es la SERCA2a (ATPasa2a), que cumple con la función esencial de retornar al RS el Ca^{2+} que ha sido liberado al citosol, produciendo así la relajación cardiaca.

1.1.6. FOSFOLAMBAN (PLN)

La fosfolamban (PLN), es una proteína de membrana que cuenta con 52 aminoácidos y se expresa fundamentalmente en el músculo cardiaco. Puede ser fosforilada por PKA, una proteína quinasa dependiente de AMPc, en su residuo Ser¹⁶ y por CaMKII en el sitio Thr¹⁷. Y puede ser desfosforilada principalmente por la fosfatasa reticular PP1 (MacDougall, Jones, & Cohen, 1991).

La PLN modula la actividad de la bomba de Ca^{2+} cardíaca. En su estado desfosforilado inhibe tónicamente a la SERCA2a y en su estado fosforilado libera dicha inhibición, aumenta la afinidad de la bomba al Ca^{2+} y permite el transporte del ion hacia el interior del RS y la consecuente relajación del sarcómero. El equilibrio dinámico entre la actividad de las quinatas y fosfatasas, resultan en aumentos o reducciones en la velocidad de captación de Ca^{2+} , la carga de Ca^{2+} en el RS, la liberación de Ca^{2+} por RS y la contractilidad miocárdica (Mundifia-Weilenmann, Vittone, Ortale, de Cingolani, & Mattiazzi, 1996)

1.1.7. INTERCAMBIADOR ELECTROGÉNICO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [NCX]

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es una proteína de membrana que cuenta con 970 aminoácidos y un peso molecular de ~110 kDa. De las tres isoformas existentes (NCX1-3), se ha descrito que la isoforma NCX1 es la del tipo cardiaco. Intercambia 3 iones Na^+ por un ion Ca^{2+} entre el exterior y el interior de la célula (Bers & Ginsburg, 2007), y como resultado de este transporte electrogénico, se genera una corriente iónica positiva hacia el interior de la célula, es decir, despolariza la membrana celular.

El modo en el que opera el intercambiador está definido por la relación de potencial de membrana (V_m) y el potencial de equilibrio NCX (E_{NCX}), donde el

E_{NCX} está determinado por los gradientes transmembrana de Na^+ y Ca^{2+} , como lo muestra la fórmula; $[E_{NCX} = 3E_{Na} - 2E_{Ca}]$ (Bers D. , 2002).

En el AEC, el intercambiador funciona en '*modo directo*', es decir, extruye Ca^{2+} del cardiomiocito ayudando a restaurar el Ca^{2+} intracelular diastólico, cuando el V_m es más negativo que su potencial de equilibrio (E_{NCX}). En ciertos casos, cuando la diferencia entre el V_m y el E_{NCX} es positiva, el flujo del Ca^{2+} puede ir hacia el interior de la célula, y se dice que funciona en '*modo inverso*'.

1.1.8. CaMKII

La CaMKII es una Ser/Thr quinasa con importantes funciones reguladoras en el corazón y el cerebro, con un peso de $\sim 16,6$ kDa, que se activa canónicamente por unión del complejo de Ca^{2+} y calmodulina. Sin embargo puede activarse también, por especies reactivas del O_2 (Erickson, y otros, 2008), glicosilación (Erickson, y otros, 2013) y nitrosilación (Erickson, y otros, 2015; Hegyi, Bers, & Bossuyt, 2019).

En el corazón predomina la isoforma δ , y una de sus variantes de *splicing*, δ_C , se ubica preferentemente en el citosol. Cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular está elevada, la unión del ion a CaM activa a CaMKII, al generar un cambio conformacional que expone el dominio catalítico de la enzima para la unión con el sustrato y su propia fosforilación. Así cumple la función de regular diferentes canales iónicos y proteínas de transporte involucradas en el AEC, como los DHRP, RyR2 y PLN, con los siguientes efectos:

- ▶ La fosforilación en DHRP media la facilitación de la corriente de Ca^{2+} del canal (I_{CaL}) (Blaich, y otros, 2010).
- ▶ La fosforilación de los RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴, produce un aumento de la actividad del canal, es decir, facilita la liberación del Ca^{2+} sistólico (Kohlhaas, y otros, 2005; Van Oort, y otros, 2010) y, también de Ca^{2+} en diástole, hecho este último que resulta en la propensión a arritmias.
- ▶ La fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN por CaMKII libera a la SERCA2a de la influencia inhibitoria de PLN y en consecuencia aumenta la recaptura de Ca^{2+} al RS (Wegener, Simmerman, Lindemann, & Jones, 1989; Mundiña-Weilenmann, Vittone, Ortale, de Cingolani, & Mattiazzi, 1996).

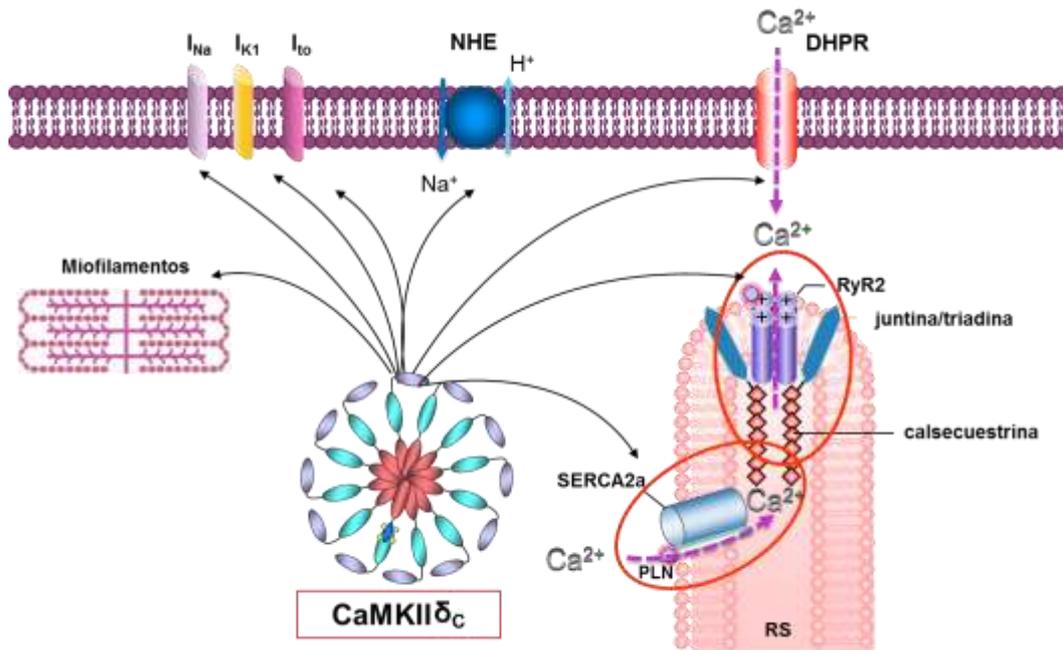


Figura 4. Esquema donde se muestran las fosforilaciones por CaMKII a distintas proteínas.

INa: corriente de Na^+ por los canales de Na^+ ; *IK1*: Corriente de K^+ por los canales de K^+ ; *Ito*, Corriente de K^+ de los canales de inactivación lenta; *NHE*: Intercambiador Na^+-H^+ ; *DHPR*: Canales de Ca^{2+} o receptores de dihidropiridinas; *RyR2*: Receptores de rianodina. *PLN*: fosfolamban; *RS*: Retículo sarcoplasmático.

1.2. MITOCONDRIA

La mitocondria es una organela celular esencial para el metabolismo energético y la defensa antioxidante de la célula, ocupando el 30% del volumen total de los cardiomiocitos y de acuerdo con su localización dentro de las fibras cardiacas se las conoce como mitocondrias internmiofibrilares, subsarcolemales y perinucleares (Lukyanenko, Chikando, & Lederer, 2009; Piquereau, y otros, 2013; Morciano, Maria Vitto, Bouhamida, Giorgi, & Pinton, 2021).

Las mitocondrias son las “centrales eléctricas” que abastecen a las células con trifosfato de adenosina (ATP) y cubren una de las demandas de energía más altas del organismo. Esto se logra mediante la fosforilación oxidativa -a través de una cadena transportadora de electrones con consumo de O_2 - y la entrada de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Ca^{2+m}), que actúa como un regulador esencial participando en la iniciación y activación de la respiración mitocondrial y la generación de ATP.

Además de cumplir con las funciones de oxidar metabolitos y modular la producción de ATP, también están involucradas en la homeostasis iónica, la producción de radicales libres y la muerte celular.

Para que el Ca^{2+} llegue a la matriz mitocondrial, debe atravesar las membranas mitocondriales interna y externa (MMI y MME) a través de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) y el complejo *uniporter* mitocondrial (MCU), respectivamente. Si bien se ha descrito que la concentración de Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) consigue el equilibrio principalmente por el MCU, que es la puerta de entrada al Ca^{2+} de la MMI y por el intercambiador $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}\text{Li}^+$ (NCLX), que es la puerta de salida del ion, en la captación de Ca^{2+} mitocondrial interviene además, VDAC (Sander, Gudermann, & Schredelseker, 2021). A su vez, participan en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+}_m , el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, de las siglas en inglés), que se ha propuesto como un mecanismo que ayuda cuando existe sobrecarga de Ca^{2+} (Lai & Qiu, 2020); así como el receptor de rianodina mitocondrial (mRyR1) que se ha descrito como una vía alternativa de captación de Ca^{2+}_m en los cardiomiocitos (Beutner, y otros, 2005; Altschafli, Beutner, Sharma, Sheu, & Valdivia, 2007), aunque su función fisiológica sigue siendo controvertida.

1.3. RELACIÓN RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO / MITOCONDRIA

El vínculo entre el acoplamiento excitación-contracción y el metabolismo energético, reside en el tránsito de Ca^{2+} entre el RS y la mitocondria. La transferencia de Ca^{2+} , estimula la producción de energía, ya que regula las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y el complejo piruvato-deshidrogenasa, al incrementar la producción de NADH y FADH₂ (Flavín adenín dinucleótido) y favorece la actividad de la cadena de transporte de electrones, que es el principal proceso celular que genera especies reactivas del oxígeno (ROS).

Estructuralmente, las mitocondrias y el RS están en estrecho contacto en múltiples sitios (aproximadamente a 15-50 nm de distancia), a los que llamaremos sitios de contacto. Estos sitios, constituyen dominios de alta concentración de Ca^{2+} liberado por IP3R o RyR2 que afectan la homeostasis,

la energía, el metabolismo y la dinámica mitocondrial del Ca^{2+} (Xu, Cui, Zhang, & Ren, 2020).

En estos sitios se encuentran proteínas que actúan como vínculos físicos que unen ambas organelas, como la mitofusina 2 (Mfn-2) (Naon, y otros, 2016) y GRP75, que enlazan el canal de Ca^{2+} IP3R, isoforma 2 (IP3R2), con VDAC (Szabadkai, y otros, 2006). VDAC también tiene interacciones físicas con RyR2, lo que, junto con la co-localización de MCU con RyR2, permite explicar cómo es posible el transporte de Ca^{2+} mitocondrial.

Esta íntima conexión RS-mitocondria favorece también el aumento de Ca^{2+} mitocondrial frente a la pérdida excesiva del Ca^{2+} del RS. La acumulación excesiva de Ca^{2+} en los cardiomiocitos resulta en una sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+}_m promueve un aumento en la generación de ROS, deterioro del potencial de membrana mitocondrial, apertura del mPTP y agotamiento de ATP, llevando así a la muerte celular.

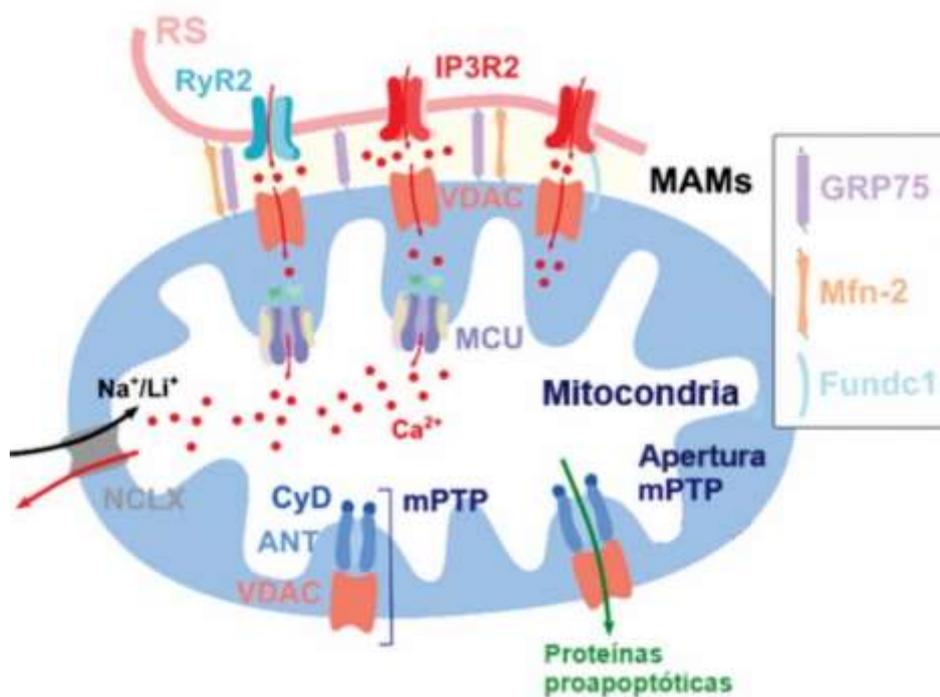


Figura 5. Comunicación entre mitocondria y RS. Las mitocondrias y el RS están conectados por varias proteínas, lo que da como resultado una comunicación óptima entre estas dos organelas para el transporte de Ca^{2+} . Fundc1, GRP75 y Mfn-2 sirven como proteínas de anclaje, estrechando el espacio entre IP3R2/RyR2 y VDAC. La estructura de mPTP no está clara y su apertura puede ser inducida por aumentos de ROS, de Ca^{2+} o disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), lo que da como resultado la liberación del contenido mitocondrial, incluidas las proteínas proapoptóticas. [Modificada de (Jaquenod De Giusti, Palomeque et al. 2022)].

2. DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

Los cardiomiocitos tienen una elevada demanda energética, que como es conocido depende del aporte de nutrientes y oxígeno proveniente de la irrigación arterial. En el infarto de miocardio (IM), la obstrucción de una arteria coronaria provoca un riego sanguíneo insuficiente, en donde el área isquémica pierde rápidamente su función contráctil. Si la isquemia se prolonga, se produce la muerte celular además de inestabilidad eléctrica que puede provocar fibrilación ventricular y derivar en muerte súbita (Buja 2013). La reversibilidad o irreversibilidad de la lesión isquémica dependerá del tiempo que dure la isquemia, por lo que la terapia de reperfusión temprana es el tratamiento estándar y la mejor estrategia para limitar el tamaño del infarto. Sin embargo, como ya se mencionó, la reperfusión por sí misma, induce daño celular (Beller, 2001; Piper, Abdallah, & Schäfer, 2004; Garcia-Dorado, Ruiz-Meana, Insete, Rodriguez-Sinovas, & Piper, 2012) un fenómeno conocido como injuria por I/R que puede llegar a desencadenar arritmias potencialmente mortales.

Como ya se mencionó también, aunque las causas del efecto deletéreo del episodio isquémico seguido de reperfusión (I/R) son multifactoriales, uno de los factores preponderantes involucrados en la lesión por I/R es la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} (Valverde, y otros, 2006; Valverde, y otros, 2010; Garcia-Dorado, Ruiz-Meana, Insete, Rodriguez-Sinovas, & Piper, 2012; Mattiazzi, y otros, Review: Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade, 2015). Estudios previos de nuestro y otros laboratorios, indican que por lo menos una de las cascadas de señales que contribuyen al daño por I/R involucra la alteración funcional del RyR2, con pérdida de Ca^{2+} , sobrecarga mitocondrial a través del uniporter de Ca^{2+} , MCU, liberación del citocromo c y activación de la caspasa-3 (Salas, y otros, 2010; Di Carlo, y otros, 2014; Kwong J. Q., y otros, 2015). La alteración funcional del RyR2 puede ocurrir por diferentes factores tales como la fosforilación del RyR2 por CaMKII (Di Carlo, y otros, 2014), cambios redox (Hidalgo, Bull, Behrens, & Donoso, 2004), “liberación” de los RyR2 en la reperfusión luego de la acidosis isquémica (Said M., y otros, 2008), y/o degradación (Domenech, Sánchez, Donoso, Parra, & Macho, 2003; Salas, y otros, 2010).

Específicamente los resultados previos de nuestro laboratorio son los siguientes:

- I. Durante la isquemia se produce un aumento del Ca^{2+} en el RS y en el citosol, seguido por un aumento abrupto de Ca^{2+} citosólico (Ca^{2+} bump) al comienzo de la reperfusión y una disminución en espejo del Ca^{2+} del RS (Valverde, y otros, 2010). Entre los mecanismos involucrados en este aumento brusco de la liberación de Ca^{2+} desde el RS, se encuentra la reactivación de los RyR2 por el retorno al pH normal en reperfusión luego de la inhibición producida por la acidosis isquémica (Said M. , y otros, 2008).

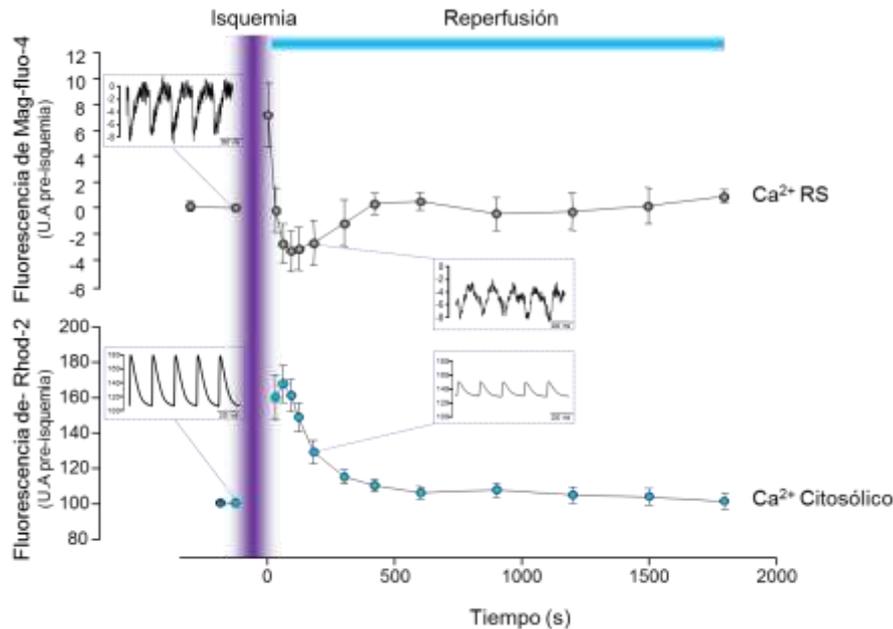


Figura 6. Cambios en la dinámica del Ca^{2+} citosólico y del RS en pre-isquemia y reperfusión.

En el panel superior se grafica el Ca^{2+} del RS medido a través de la fluorescencia del indicador Mag-fluo-4. En el panel inferior, el Ca^{2+} citosólico medido por la fluorescencia del indicador Rhod-2. En el panel de la izquierda se grafican trazos del transitorio de Ca^{2+} del RS (arriba) y citosólico (abajo), en la pre-isquemia. En el mismo panel aparecen los puntos promedio controles de Ca^{2+} del RS (gris) y citosólico (azul). La columna violeta indica el periodo de isquemia. Se puede apreciar el aumento de Ca^{2+} en el RS y en el citosol durante ese periodo. En la reperfusión, se observa el vaciamiento abrupto del RS (gris) en espejo con el aumento brusco del Ca^{2+} citosólico (Ca^{2+} bump azul), que luego vuelven a valores pre isquémicos. En el mismo panel aparecen insertos registros de Ca^{2+} del RS y del citosol en el momento señalado por la línea recta. Los títulos del eje "y" en los recuadros son los mismos que en la figura. [Modificada de Valverde, Kornyejev et al. 2010].

- II. En asociación con el aumento brusco del Ca^{2+} citosólico al comienzo de la reperfusión, ocurre una activación de CaMKII y una fosforilación de sitio Thr¹⁷ de PLN y del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 (Said M. , y otros, 2011; Di Carlo, y otros, 2014) (Figura 7). Cabe resaltar que la fosforilación de Thr¹⁷ de PLN produce un aumento del contenido de Ca^{2+} RS (Vittone, Mundina-Weilenmann, Said, Ferrero, & Mattiazzi, 2002), y la fosforilación del RyR2 produce una pérdida de Ca^{2+} RS (Ai, Curran, Shannon, Bers, & Pogwizd, 2005; Respress, y otros, 2012; Valverde, y otros, 2019).

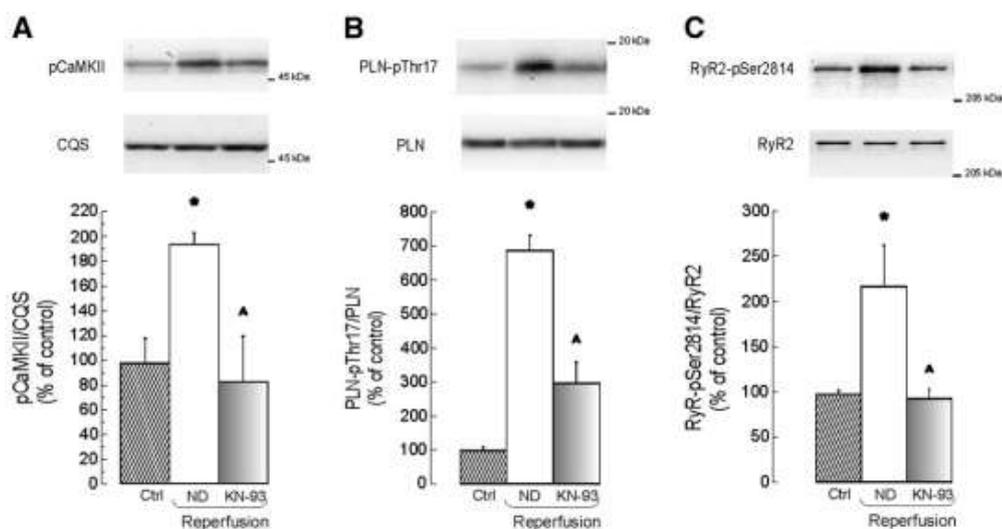


Figura 7. Activación de la CaMKII y fosforilación de Thr¹⁷ de PLN y Ser²⁸¹⁴ de RyR2 al inicio de la reperfusión.

En la parte superior se ven western blots típicos y en la inferior, resultados totales de experimentos que muestran un aumento en la autofosforilación de CaMKII (A) y de la fosforilación de dos sustratos típicos de CaMKII: sitio Thr¹⁷ de PLN (B) y sitio Ser²⁸¹⁴ de RyR2 (C). El tratamiento con KN-93 evitó las fosforilaciones de proteínas dependientes de CaMKII detectadas durante la reperfusión. *n* = 3–6. * indica *P* < 0,05 con respecto al control (Ctrl). ^ indica *p* < 0,05 con respecto a la reperfusión sin droga (ND). [Tomada de (Said M. , y otros, 2011)].

III. La fosforilación del RyR2 por CaMKII se asoció con aumento del infarto, de la apoptosis y necrosis. Estas alteraciones se previnieron en ratones en los que el sitio Ser²⁸¹⁴ de RyR2 fue mutado a Ala, demostrando la causalidad de la fosforilación de este sitio en el daño miocárdico por I/R (Di Carlo, y otros, 2014). La inhibición del MCU y del mPTP disminuyeron el tamaño del infarto, la apoptosis y la liberación de LDH, sugiriendo a la alteración mitocondrial como efector final del daño por I/R (Salas, y otros, 2010).

Estos resultados tienen importancia clínica tanto respecto a las arritmias y al daño miocárdico en reperfusión como a la insuficiencia cardiaca, ya que la expresión y actividad de la CaMKII así como la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 está aumentada tanto en pacientes y animales con insuficiencia cardiaca (Ai, Curran et al. 2005, Sossalla, Fluschnik et al. 2010), como durante la reperfusión luego de un período de isquemia (Vittone, Mundina-Weilenmann, Said, Ferrero, & Mattiazzi, 2002; Salas, y otros, 2010; Di Carlo, y otros, 2014)

En contraste con la clara participación de la fosforilación por CaMKII del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 en el daño miocárdico, el rol del aumento del secuestro de

Ca²⁺ es incierto, fundamentalmente debido a los resultados controversiales obtenidos.

En nuestro laboratorio se demostró que cuando se impide la fosforilación transitoria de PLN en el sitio Thr¹⁷ por CaMKII en I/R prolongadas, se produce mayor efecto deletéreo de la función contráctil y mayor daño miocárdico (*Figura 8*).

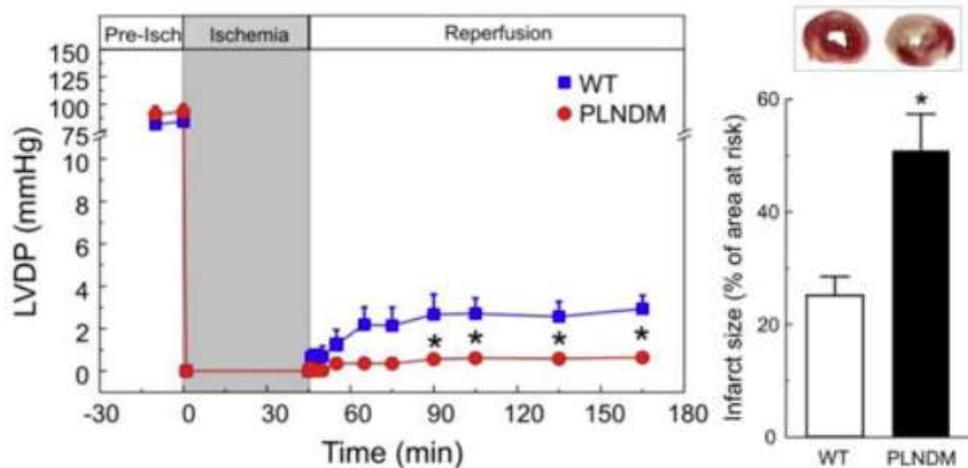


Figura 8. Efecto en la función contráctil y daño miocárdico, por impedimento de la fosforilación de PLN.
[Tomada de Di Carlo y col. (2014)].

Estos resultados indican que la fosforilación transitoria de PLN por CaMKII al comienzo de la reperfusión, es beneficiosa. Resultados similares se obtuvieron cuando el corazón fue sometido a protocolos de I/R reversible (atontamiento cardíaco) (Said, y otros, 2003). Otros estudios también avalan el rol beneficioso de acelerar el secuestro de Ca²⁺ (aunque en forma permanente) en diferentes patologías, incluida la insuficiencia cardíaca o las arritmias de reperfusión (Del Monte, y otros, 2004; Talukder MA, 2007; Nicolaou P, 2009; Kho C, 2015; Valverde, y otros, 2019). Sin embargo, el aumento del secuestro de Ca²⁺ fue descrito como deletéreo por otros autores (Cross HR, 2003; Yang Y, 2006; Zhou X, 2007; Stokke MK, 2010).

Las causas involucradas en estas discrepancias pueden ser diversas (diferentes preparaciones, especies, protocolos experimentales usados etc.). Sin embargo, el efecto opuesto que tiene el secuestro de Ca²⁺ sobre el Ca²⁺ citosólico posiblemente juega un papel fundamental: Efectivamente, el aumento del secuestro de Ca²⁺ disminuye el Ca²⁺ citosólico, y por lo tanto podría disminuir la probabilidad de arritmias causadas por pérdida de Ca²⁺ y a la vez, la probabilidad de que un exceso de Ca²⁺ pase a la mitocondria,

produciendo daño mitocondrial; pero a la vez aumenta el contenido de Ca^{2+} del RS y por lo tanto el Ca^{2+} liberado al citosol tanto en sístole como en diástole (*Figura 9*). La pérdida diastólica de Ca^{2+} por el RS, como ya se señaló, puede ser motivo de arritmias (Van Oort, y otros, 2010) y de daño miocárdico (Salas, y otros, 2010).

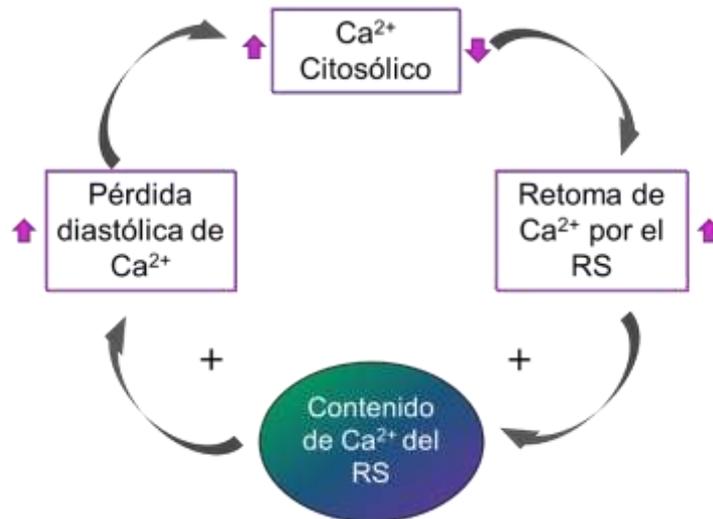


Figura 9. Efectos opuestos del aumento del secuestro de Ca^{2+} sobre el Ca^{2+} citosólico

Por lo tanto, un pequeño desbalance entre la captura y la liberación de Ca^{2+} puede favorecer un efecto protector o perjudicial sobre la función miocárdica.

El conocimiento del efecto protector o deletéreo del secuestro de Ca^{2+} es además sumamente importante porque ha sido sugerido como terapéutica para elevar la contractilidad disminuida en la insuficiencia cardiaca (de hecho, hay estudios en animales que así lo demuestran y se hicieron ensayos clínicos al respecto (Byrne MJ, 2008; Kho C, 2015; Lyon, y otros, 2020), así como para proteger de las arritmias de reperfusión (Del Monte, y otros, 2004).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que el aumento del secuestro Ca^{2+} por el RS, acentuará la pérdida de Ca^{2+} por el mismo, aumentando el daño y la disfunción mitocondrial.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Explorar si un aumento del secuestro de Ca^{2+} por el RS aumenta la disfunción mitocondrial y el daño miocárdico.

4.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterización funcional en miocitos aislados de la nueva cepa de ratones introducida en este trabajo (SAKO) y comparación con las otras cepas utilizadas.
- ✓ Explorar el efecto del aumento del secuestro de Ca^{2+} sobre la disfunción mitocondrial y el infarto miocárdico.
- ✓ Dilucidar el peso relativo de la pérdida y secuestro de Ca^{2+} por el RS en la disfunción mitocondrial y el tamaño del infarto miocárdico que se produce en la I/R.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron corazones de ratones silvestres y ratones mutados genéticamente, a fin de cumplimentar con los objetivos propuestos y evaluar la hipótesis.

5. MODELO EXPERIMENTAL - MODELO MURINO

Se utilizaron corazones y cardiomiocitos de ratones macho, de 3 a 4 meses de edad de la cepa control C57BL/6 y de cepas modificadas genéticamente: S2814D, S2814A, PLNKO, SDKO y SAKO, las cuales se describen a continuación (ver representación esquemática en la [Figura 10](#)).

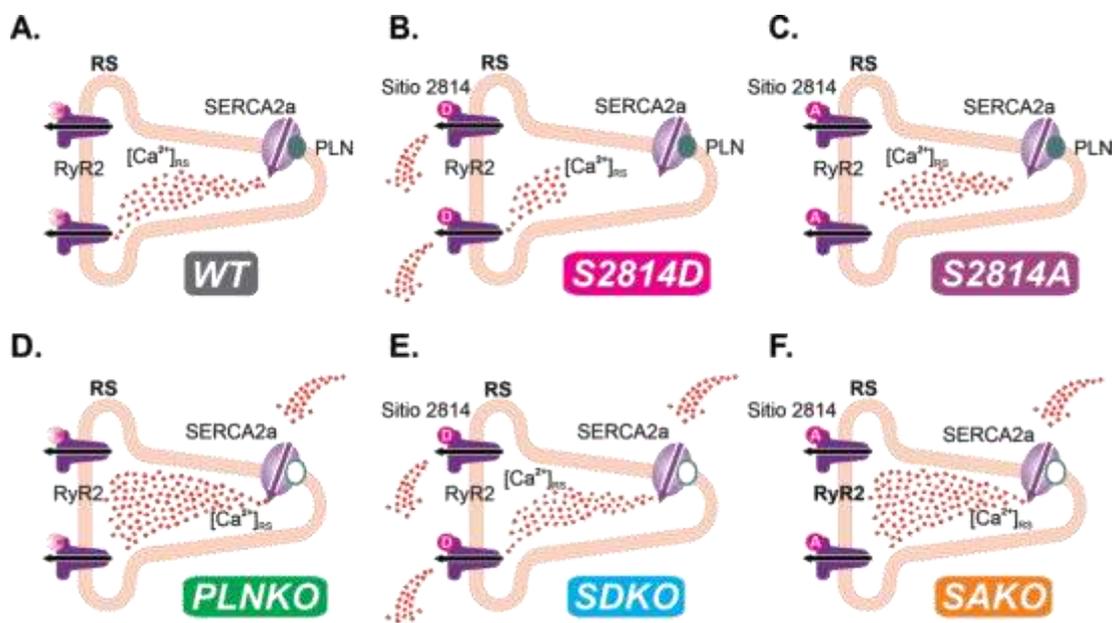


Figura 10. Representación esquemática de las alteraciones a nivel de proteínas del RS y del manejo de Ca^{2+} en las diferentes cepas. A. WT, B. S2814D, C. S2814A, D. PLNKO, E. SDKO, F. SAKO

5.1. C57BL/6 (*wild type*, WT)

Es la cepa de ratones silvestres que constituye el “*background*” de las cepas mutadas usadas.



5.2. S2814A y S2814D

Estas cepas, donadas gentilmente por el Dr. Xander Wehrens del *Baylor College of Medicine, Houston, TX, EE.UU.*, presentan una mutación en el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2, sitio fosforilable por CaMKII.

En los ratones **S2814A** dicho sitio está mutado a alanina (Ala), y por lo tanto no puede ser fosforilado (Chelu, y otros, 2009). En los **S2814D**, dicho sitio está mutado a aspártico (D), mutación que hace que el RyR2 se comporte como constitutivamente pseudo-fosforilado, lo que determina un aumento de la actividad de éste y la consecuente pérdida de Ca²⁺ en diástole (Van Oort, y otros, 2010).

5.3. PLNKO

Esta cepa, donada gentilmente por la Dra. Evangelia Kranias de la Universidad de Cincinnati, EE.UU., presenta ablación genética de PLN, lo que determina un aumento de la retoma y de la carga Ca²⁺_{RS} (Luo, y otros, 1994).

5.4. SDKO

Es una cepa de ratones creada en nuestro laboratorio, resultante de la cruce de las cepas S2814D y PLNKO, por lo tanto, expresan doble mutación que produce: aumento en la retoma de Ca²⁺ por el RS y liberación y pérdida de Ca²⁺ por la pseudo-fosforilación del RyR2 por CaMKII.

5.5. SAKO

Es una cepa de ratones creada en nuestro laboratorio, resultante de la cruce de las cepas S2814A y PLNKO; por lo tanto, expresan doble mutación que produce: aumento en la retoma de Ca²⁺ por el RS e inhibición de la fosforilación del RyR2 por CaMKII.

Los ratones se criaron en el bioterio del Centro de Investigaciones Cardiovasculares “Dr. Horacio E. Cingolani”, donde se desarrolló este proyecto, y todos se han caracterizado de manera genotípica, fenotípica y funcional por Mazzocchi y col. (Mazzocchi, y otros, 2016) y en el presente trabajo de tesis.



Figura 11. Representación de las cruces de cepas para obtener las cepas SDKO y SAKO.

5.6. APROBACIÓN ÉTICA

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (proyecto **CICUAL # P03-01-15**).

6. MÉTODOS USADOS EN EL MODELO MURINO

A fin de evaluar la hipótesis y cumplir con los objetivos del trabajo, se realizaron estudios *ex vivo* e *in vitro* haciendo uso de diferentes técnicas y protocolos, que se resumen en el siguiente mapa conceptual y se describen en los siguientes apartados.

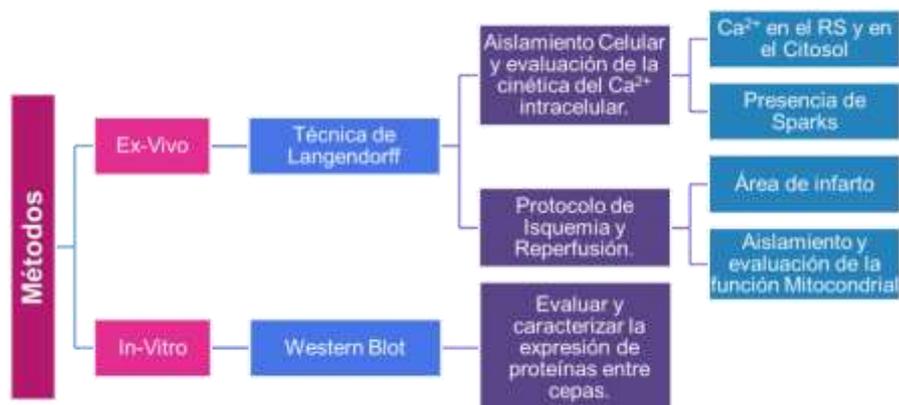


Tabla 1. Resumen de métodos y técnicas usadas. Modificar

6.1. TÉCNICA DE LANGENDORFF

La técnica descrita por Oskar Langendorff (1895), es una técnica experimental de órgano aislado desarrollada para permitir el estudio fisiológico y farmacológico del corazón, permitiendo la evaluación de parámetros hemodinámicos y cardiacos múltiples sin las dificultades de un estudio *in vivo* (Bell, Mocanu, & Yellow, 2011; Motayagheni, 2017).

Como se muestra en la [Figura 12](#), la técnica consiste en canular el corazón de estudio a través de la aorta, suspenderlo en forma vertical e iniciar la perfusión retrograda de una solución de perfusión que puede variar de acuerdo con el tipo de experimento. Para estos experimentos, los corazones fueron perfundidos a temperatura (37°C), flujo coronario (3-4 ml/min) y frecuencia cardíaca (300 latidos/min), constantes. La composición de la solución fisiológica de bicarbonato (BBS) fue (en mM): 128,3 NaCl, 4,7 KCl, 2,0 CaCl₂, 20,2 NaHCO₃, 0,4 NaH₂PO₄, 1,1 MgSO₄, 11,1 glucosa y 0,04 Na₂EDTA; esta solución se equilibró con 95% de O₂-5% de CO₂ para obtener un pH de 7,4.

La actividad mecánica de los corazones se evaluó introduciendo en el ventrículo izquierdo (VI) un globo de film de polietileno/polipropileno conectado a un transductor de presión (AD Instruments MLT 0380, CO, EE.UU.). El globo se llenó con una solución acuosa para lograr una presión diastólica final del VI de aproximadamente 5-10 mmHg. En los experimentos en los que se evaluó la contractilidad del VI, se midió la presión desarrollada (PDVI) y la velocidad máxima de desarrollo de presión (+dP/dt).

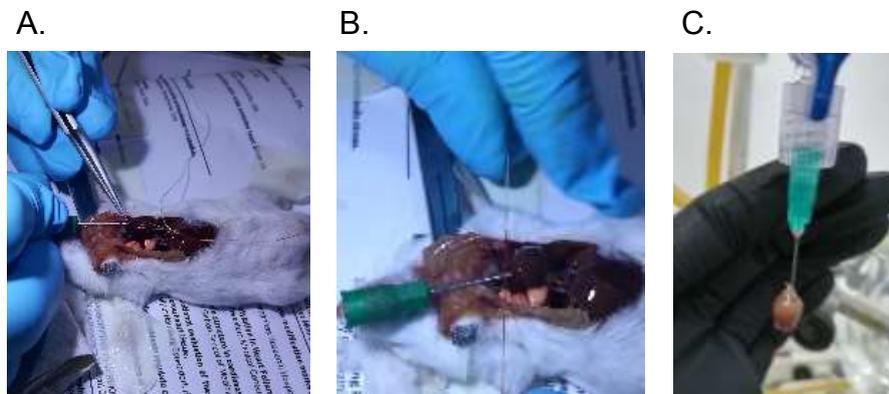


Figura 12. Canulación para técnica de Langendorff. **A.** Toracotomía y canulación en aorta. **B.** Amarre de cánula. **C.** Corazón colgado y perfusión de corazón.

6.2. TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE CARDIOMICITOS

Si bien algunos laboratorios han aislado con éxito cardiomiocitos por simple digestión enzimática del ventrículo izquierdo (VI) y agitación del tejido (Louch, Sheehan et al. 2011), en nuestro laboratorio y para el presente trabajo se usó el método de digestión enzimática por perfusión.

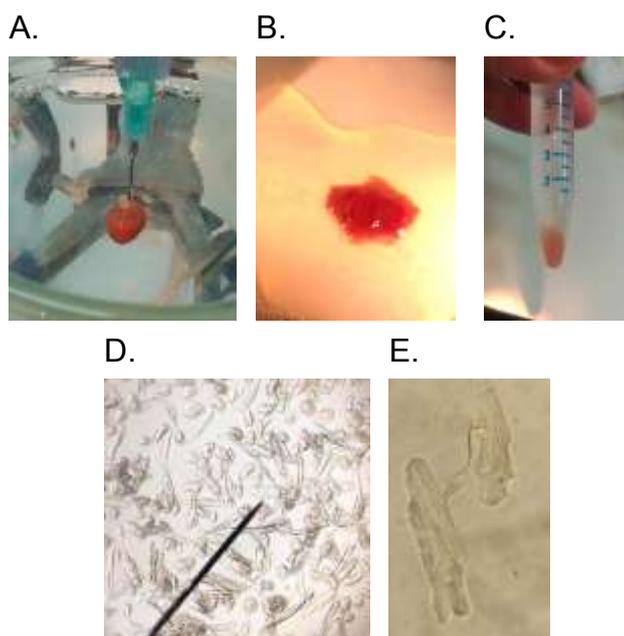


Figura 13. Aislamiento de cardiomiocitos de corazón de ratón por digestión enzimática.

A. Perfusión de solución SHB, seguido de 4 min y 30 s de perfusión de solución de EGTA, finalizando con la perfusión de solución enzimática hasta que pierda firmeza el tabique interventricular. **B.** Se descuelgan los ventrículos del corazón y mediante técnica de separación con pinzas y pipeta Pasteur se realiza la disgregación del tejido. **C.** Recuperación de células mediante centrifugación y lavados incrementando lentamente el Ca^{2+} . **D.** Células en 1 mM, de Ca^{2+} previa carga de indicador fluorescente. **E.** Células finales poscarga de indicador fluorescente y listas para realizar el protocolo.

Mediante la técnica de Langendorff, se perfundió el corazón inicialmente con *HEPES-buffer* para limpiar restos de sangre. La solución HEPES buffer (SHB) tuvo la siguiente composición, en mM: 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,33 KH_2PO_4 , 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 glucosa y 10 HEPES a pH 7,4, equilibrada con 100% O_2 . Se comprueba que el corazón esté latiendo en óptimas condiciones y se continúa la perfusión en presencia de 100 μM de EGTA durante 4:30 min en presencia de O_2 , para *quelar* completamente el Ca^{2+} , seguida de una solución enzimática compuesta por 30 ml de SHB, 15 mg de colagenasa, 15 mg de albumina de suero bovino y O_2 , la que es re-perfundida, para realizar la digestión del tejido, hasta que el tabique interventricular pierda su firmeza. La albúmina agregada permite

estabilizar las enzimas durante la digestión. Finalmente se disgregaron mecánicamente las células y se recalificaron con soluciones de concentraciones crecientes de Ca^{2+} de manera escalonada, hasta llegar a una concentración final de Ca^{2+} de 1 mM. Estos pasos se muestran en las imágenes de la *Figura 13*.

6.2.1. Cinética de Ca^{2+} intracelular en miocitos.

Con el fin de medir la cinética del Ca^{2+} intracelular en células aisladas se utilizó la microscopía de fluorescencia [IonOptix, Milton, MA, USA]. Esta técnica consiste fundamentalmente en un microscopio invertido acoplado a un sistema de registro que incluye los sensores y el *software* apropiados para adquirir y analizar datos tales como la dinámica del Ca^{2+} intracelular o la geometría celular (acortamiento del miocito). Ver *Figura 14*.

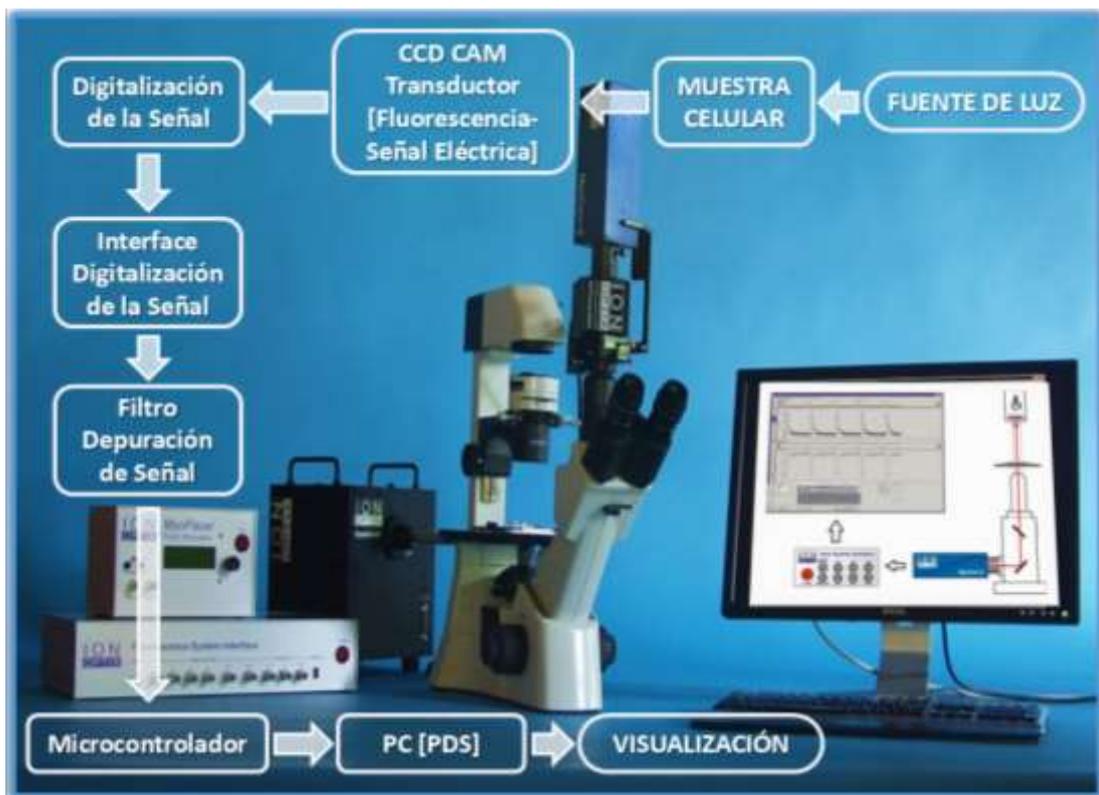


Figura 14. Equipo Ion Optix y diagrama de flujo.

De fondo la Imagen del equipo Ion Optix [Modificado de www.ionoptix.com] y superpuesto el diagrama de flujo del sistema de registro y análisis de señal. El sistema consiste en un microscopio invertido, un estimulador y una interfaz análogo-digital para la sincronización y recolección de datos de fluorescencia provenientes de la muestra. En la pantalla interna se observa el registro de Ca^{2+} intracelular y acortamiento.

En los experimentos se midió sólo la dinámica del Ca^{2+} intracelular, por lo que los cardiomiocitos aislados fueron cargados con un indicador de Ca^{2+} , que en este caso fue el indicador fluorescente Fura-2-AM (2 μM durante 15 min). Luego de cargados, los miocitos se colocaron en una cámara de acrílico sobre la platina del microscopio (*Figura 13E*) y fueron subperfundidos con solución de HEPES-*buffer* a pH 7,4 y flujo constante (1ml/min).

Los miocitos fueron estimulados a frecuencia constante de 1 Hz, a través de dos electrodos de platino colocados paralelamente en ambos lados de la cámara de subperfundición (estimulación por campo, pulsos cuadrados de 5 ms de duración y con una intensidad 20% por encima del umbral de excitabilidad), hasta la iniciación de los protocolos. La relación de fluorescencia 360/380 fue usada para la estimación del Ca^{2+} intracelular.

★ INDICADOR FURA-2-AM.

Los indicadores fluorescentes fueron creados en el laboratorio de Roger Tsien (Grzegorz Grynkiewicz 1985). El indicador de Ca^{2+} intracelular que se usó para esta técnica fue el *Fura-2* en su forma de acetometil éster, también conocido como *Fura-2-AM*, que se caracteriza por ser permeable (atravesada la membrana celular) y luego se vuelve no permeable al perder el grupo acetometil éster por acción de esterasas intracelulares. El *Fura-2* tiene alta afinidad por el Ca^{2+} , es radiométrico (doble longitud de onda de excitación, y emisión en una longitud de onda) que se excita con luz UV. Tiene un pico de emisión a 505 nm y su nivel máximo de excitación está en un rango entre 340 nm a 380 nm en respuesta al Ca^{2+} , es decir en ese rango de longitudes de onda el *Fura-2* muestra su máxima sensibilidad al Ca^{2+} , por lo que el uso de la relación de excitación 340/380 permite una estimación relativamente precisa de la concentración intracelular de Ca^{2+} independientemente de posibles variaciones debidas a la eficiencia del equipo, la carga del indicador y el tamaño de la preparación (Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985).

Su fórmula química es $\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{24}$ y su fórmula estructural se muestra en la *Figura 15*.

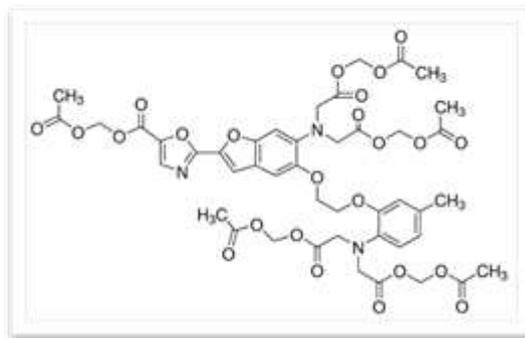


Figura 15. Fórmula estructural del Fura-2AM o Fura-2-acetoximetil éster. [Tomada de ("Merck Productos Argentina,")].

6.2.2. Medida de sparks de Ca^{2+} en el corazón intacto.

Las *sparks* de Ca^{2+} son liberaciones espontáneas de Ca^{2+} desde el RS que no se propagan y se visualizan como pequeñas chispas (*sparks*) de fluorescencia producto de la unión del Ca^{2+} al indicador fluorescente sensible a este ion. Los corazones perfundidos de acuerdo con la técnica de Langendroff con buffer-HEPES (Ca^{2+} 2 mM) se cargaron con el indicador fluorescente Fluo-4 AM (Invitrogen, OR, EE. UU.) durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se lavó el corazón durante 10 min con solución HEPES y se elevó la temperatura a 35°C para realizar los registros de la fluorescencia del Fluo-4 durante el protocolo de I/R (15/10 min).

Para evaluar las *sparks* de Ca^{2+} se usó la técnica de barrido láser por microscopia confocal de fluorescencia (microscopio confocal vertical Olympus FV-1000 con un objetivo 40X con gran distancia de trabajo y alta apertura numérica (0,80), mediante la cual se registró la liberación de Ca^{2+} a nivel epicárdico en corazones intactos.

La frecuencia de las *sparks* de Ca^{2+} se estimó contando el número de las mismas, durante el registro completo y expresándolo como número de eventos normalizados por tiempo (s) y espacio (cada $100\ \mu\text{m}$).

★ INDICADOR FLUO-4-AM.

El indicador de Ca^{2+} intracelular que se usó para esta técnica fue el *Fluo-4* también en su forma de acetometil éster; *Fluo-4-AM*. El Fluo-4 es un análogo de fluo-3 con los dos átomos de cloro reemplazados por flúor, dando como

resultado una mayor excitación de fluorescencia o sensibilidad al Ca^{2+} , llegando a un nivel máximo de excitación de 494 nm. Tiene alta afinidad por el Ca^{2+} con un pico de emisión a 506 nm y presenta un K_D para Ca^{2+} de ~ 335 nM.

Su fórmula química es $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{23}$ y su fórmula estructural se muestra en la [Figura 16](#).

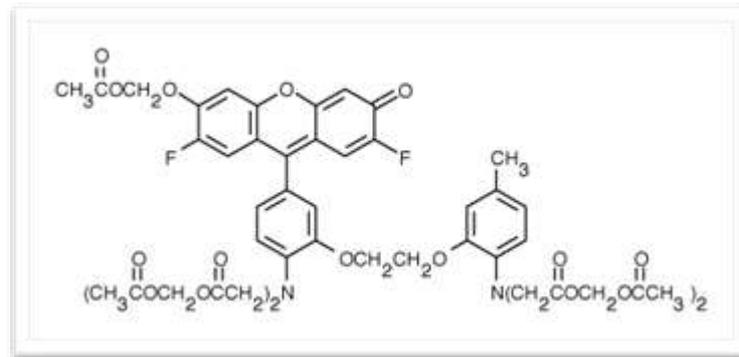


Figura 16. Fórmula estructural del Fluo-4AM
FLUO 4-(6-Acetoxymethoxy-2,7-difluoro-3-oxo-9-xanthenyl). [Tomada de "ThermoFisher Scientific"].

6.3. PROTOCOLO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

Después de la canulación, los corazones se perfundieron durante 10 min hasta alcanzar la estabilidad y luego fueron sometidos a isquemia global normo térmica por interrupción del flujo coronario durante 15 min seguidos de 10 o 30 min de reperfusión (I/R cortas). Sin embargo, un grupo de experimentos, como se verá en resultados, se realizó usando un protocolo de 45 min de isquemia seguidos de 120 min de reperfusión (I/R largas).

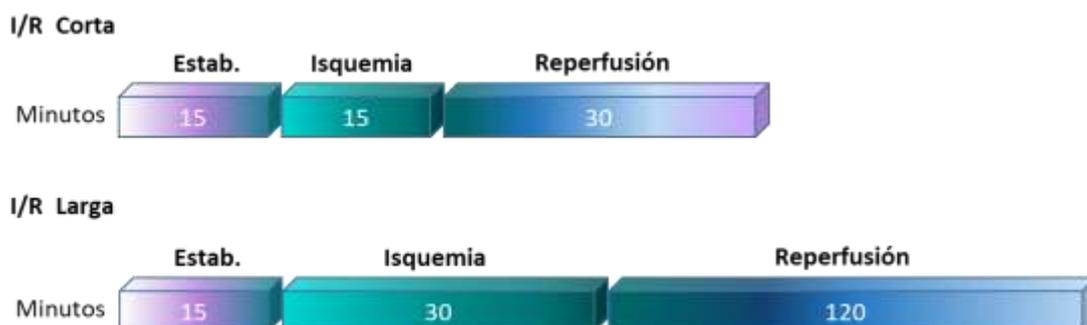


Figura 17. Protocolo de isquemia y reperfusión (I/R).
Estab.: Estabilización

Al final de la reperfusión, los corazones fueron sometidos a los ensayos que se describen a continuación.

6.4. TÉCNICA DE TINCIÓN PARA EVALUAR EL ÁREA DEL INFARTO

Después de la I/R, los corazones se perfundieron con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1% en buffer fosfato (pH 7,4) durante 7 min y se sumergieron en esta solución durante otros 7 min.



Figura 18. Esquema del protocolo de I/R y determinación de infarto.

Los corazones se congelaron a -20°C durante 1 h y luego se cortaron en seis rodajas transversales (aproximadamente de 2 mm de espesor) a lo largo del eje longitudinal del ventrículo izquierdo (VI), desde el ápice hasta la base. Las áreas de infarto se conservaron en una solución de formaldehído al 10% durante 48 hs antes de la medición.

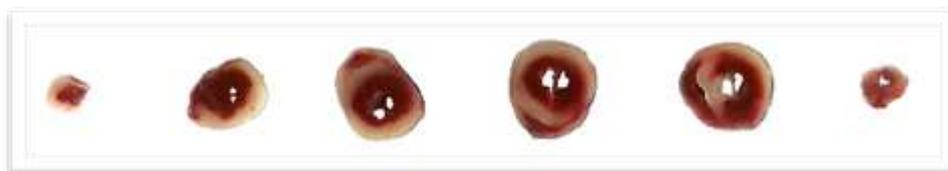


Figura 19. Ejemplo de cortes de corazón.
Corazón cortado de ápice a la base, de izquierda a derecha, respectivamente.

Cada rodaja fue pesada y digitalizada escaneando ambas caras. El área del infarto se calculó mediante planimetría por computadora utilizando el software *Fiji ImageJ*, y se expresó como un porcentaje del área total del corazón.

6.5. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS Y EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

La función mitocondrial se evaluó a través de la determinación del hinchamiento (*swelling*) y las variaciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

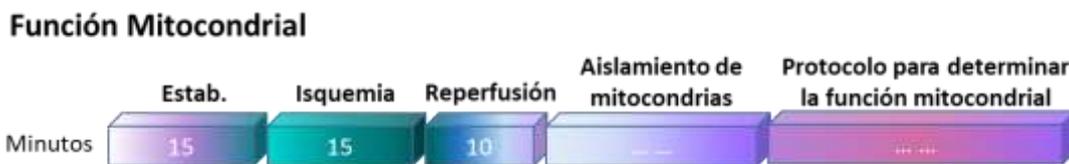


Figura 20. Esquema del protocolo de I/R y determinación de la función mitocondrial.

Al término de la reperfusión el VI fue utilizado para el aislamiento de las mitocondrias por centrifugación diferencial (Mela & Seitz, 1979). El VI fue inicialmente lavado en una solución fría de aislamiento (SA) compuesta por 75 mmol/L sacarosa, 225 mmol/L manitol y 0,01 mmol/L EGTA neutralizado con el buffer TRIS a pH 7,4.

Se procedió a trozar el VI y luego de dejar asentar el tejido, se descartó el sobrenadante (solución de lavado) y se reemplazó por SA fresca (5 ml), transfiriendo esta suspensión a un homogeneizador de mano al que se le agregó 0,8 mg de una proteinasa (bacteriana, tipo XXIV, Sigma). El proceso de homogeneización total fue realizado en 2 etapas de 7 min cada una (con el agregado de 5 ml de SA fresca cada vez). El homogenato fue cuidadosamente transferido, después de cada etapa, a un tubo de centrífuga de policarbonato y centrifugado durante 5 min a 750 x g para descartar tejido intacto, núcleos y restos celulares. El sobrenadante fue centrifugado a 8000 x g por 10 min para sedimentar a las mitocondrias. El sedimento mitocondrial se lavó 2 veces más con SA fresca a la misma velocidad de centrifugación por 5 min cada vez y el último enjuague se realizó con SA sin EGTA.

Todas las determinaciones en mitocondrias aisladas fueron realizadas en un espectrofluorómetro [Aminco Bowman Series 2] con control de temperatura y agitación continua. Para esto las mitocondrias fueron resuspendidas en una

solución que contiene KCl 120 mM, (3-[N-Morfolino]-ácido propanosulfónico) (MOPS) 20 mM, TRIS-HCl 10 mM y KH₂PO₄ 5 mM ajustada a pH 7,4 (Baines, Song et al. 2003).

6.5.1. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se evalúa midiendo la extinción de la fluorescencia de un indicador catiónico fluorescente, la Rodamina-123 (R-123; cloruro de 3,6-diamino-9-(2-(metoxi-carbonil)fenil)xantina).

Como se muestra en la [Figura 21](#) la determinación comienza con la lectura de la fluorescencia de la R-123 en el medio de reacción (F1), que consta de un buffer (en mM): 120 KCl, 20 MOPS, 10 Tris-HCl y 5 KH₂PO₄ ajustado a pH 7,4 y R-123 0,1 μ M; y posteriormente se agregan las mitocondrias (0.1 mg) con el succinato (5 mM). Debido a que la R-123 posee carga positiva y la matriz mitocondrial negativa, se produce una concentración del indicador en este compartimento, disminuyendo la fluorescencia en el medio. Por último, se realiza una centrifugación a 15000 x g - 1 min y se lee la fluorescencia del sobrenadante (F2).

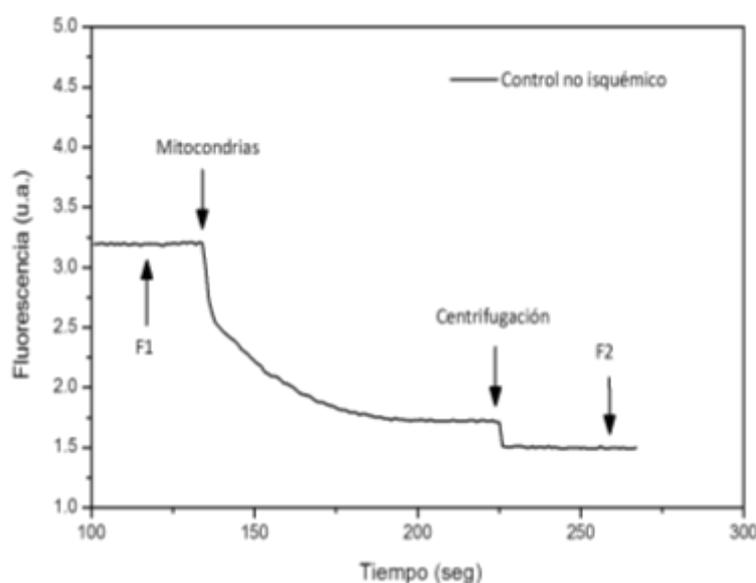


Figura 21. Trazo típico de una determinación de potencial de membrana mitocondrial con la técnica de R-123. F1: fluorescencia de la R-123 en el medio de reacción. F2: fluorescencia del sobrenadante.

A partir de F1 y F2 se obtuvo la concentración de R-123 en el medio y en el sobrenadante y de la resta de éstas, corrigiendo por el coeficiente de permeabilidad de la R-123 en las membranas lipídicas (siendo $K_i = 26 \mu\text{l/mg}$ y $K_o = 120 \mu\text{l/mg}$, los coeficientes de la membrana interna y externa respectivamente), se obtiene la concentración en la matriz mitocondrial.

El $\Delta\psi_m$ se calculó con la ecuación de Nernst-Guggenheim (Scaduto Jr & Grotyohann, 1999), expresando los valores en mV, utilizando la concentración de R-123 en el medio y en la matriz mitocondrial.

Ecuación de Nernst $E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X_2]}{[X_1]}$ Donde;

E= diferencia de potencial en equilibrio
R= constante de los gases
T= temperatura absoluta
z= carga eléctrica del ión considerado
F= constante de Faraday
X₁ y X₂= concentraciones iónicas

Estas determinaciones fueron realizadas a 30°C y seguidas mediante espectrofluorometría utilizando 503 y 527 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente (Scaduto Jr & Grotyohann, 1999; Baracca, Sgarbi, Solaini, & Lenaz, 2003).

6.5.2. *Swelling* mitocondrial (Determinación de la sensibilidad al Ca²⁺ del poro de permeabilidad transitorio, mPTP)

La resistencia a abrirse del mPTP fue determinada por la adición de CaCl₂ a muestras de mitocondrias aisladas. Si el mPTP se abre, los solutos entrarán libremente a las mitocondrias produciendo hinchazón (*swelling*) de las mismas. Este cambio es observado como una disminución de la dispersión de la luz (DL) que fue calculado para cada muestra como la diferencia entre la DL observada antes y después del agregado de CaCl₂ (Figura 22). En los presentes experimentos, se incubaron aproximadamente 0,3 mg de la suspensión mitocondrial energizada con succinato 5mM durante 5 min y se trataron con CaCl₂ 200 μM .

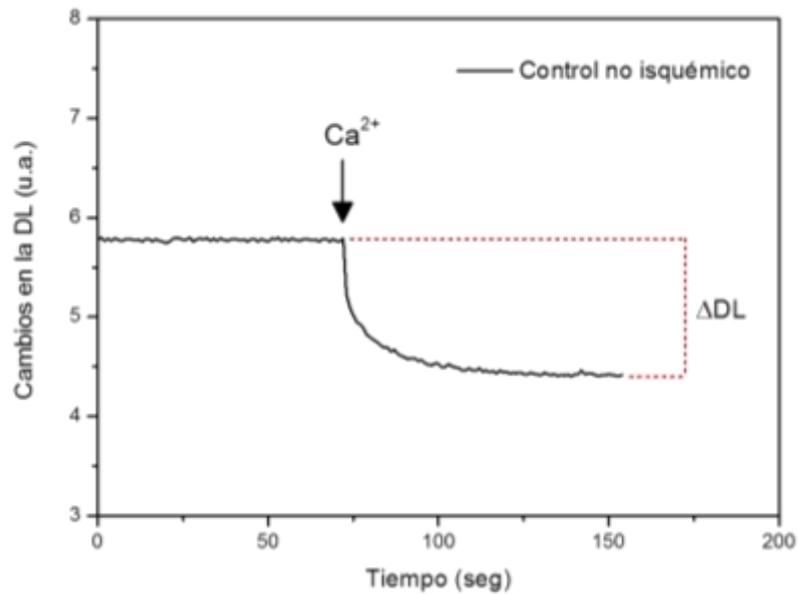


Figura 22. Trazado típico de los cambios en la dispersión de la luz. Trazado típico de los cambios en la dispersión de la luz de una suspensión mitocondrial por el agregado de Ca^{2+} , indicado con una flecha. ΔDL : Diferencia en la dispersión de la luz antes y después del agregado de Ca^{2+} .

6.6. TÉCNICA DE WESTERN BLOT

La técnica de *western blot* es una técnica analítica para identificar y/o determinar la presencia o ausencia de una proteína en una muestra. Permite determinar diferencias entre grupos en la concentración o expresión de una proteína determinada, hallar cambios químicos y postransduccionales como fosforilaciones u observar la interacción entre proteínas. Como se observa en la [Figura 23](#), esta técnica posee una serie de pasos cruciales que se explican en los siguientes puntos.



Figura 23. Pasos para un Western Blot.
1. Preparación de la muestra proteica. 2. Separación de proteínas por electroforesis.
3. Transferencia de proteínas a una membrana. 4. Inmuntinción de éstas.
5. Visualización de proteínas.

6.6.1. Preparación de muestra proteica.

A fin de caracterizar las cepas de ratones vinculadas al proyecto, se prepararon homogenatos de corazones de diferentes cepas mediante lisis celular en un buffer de lisis conteniendo (en mM) glicerofosfato de sodio 20, EGTA 1, Na_3VO_4 0,2, DTT 2, EDTA 2, NaF 20, Triton X-100 0,01%, Igepal 1% e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 50 pg/mL, peptastina 1 pM y benzamidina 10 mM). Se utilizaron detergentes (Igepal, Triton X-100) capaces de penetrar la bicapa lipídica formando micelas mixtas, facilitando así el aislamiento de las proteínas de membrana.

Luego de la homogeneización y centrifugación de las muestras, se re-suspendió el *pellet*, se colocó rápidamente en hielo durante 30 min mezclando cada 15 min con un vórtex rotativo y se centrifugó durante 10 min a 13.200 rpm a 4°C (para inhibir la proteólisis).

Por último, se recolectó el sobrenadante, que es la fracción que contiene las proteínas, descartando el *pellet* que en este caso contiene las membranas y otros restos celulares. El sobrenadante se separó en alícuotas y se conservó a -80°C hasta su utilización. Se utilizó una alícuota para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando seroalbúmina bovina como proteína estándar para la curva de calibración.

6.6.2. Separación de proteínas por electroforesis.

Se realizó la separación electroforética en condiciones desnaturizantes, de SERCA2a y RyR2 en geles de poliacrilamida-SDS (minigeles de 1 mm de espesor) de acuerdo con la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). Para la separación de PLN se usaron geles de acrilamida al 10% según la modificación de Porzio y Pearson (Porzio & Pearson, 1977).

Para un correcto apilamiento y corrida de las proteínas se utilizó un gel de apilamiento de la siguiente composición: acrilamida 4%, Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), glicerol 5%, SDS 0,1%. La polimerización de todos los geles fue catalizada por el agregado de tetrametilendiamina 0,08% y se inició por el

agregado de trazas de persulfato de amonio. Las muestras se disolvieron en solución solubilizante (SDS 2%, Tris/HCl 62,5 mM a pH 6,8, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001% como indicador del frente de corrida). Para estos ensayos se sometieron a electroforesis 20 μ g de proteínas de membrana por carril de gel las siguientes proteínas: RyR2, SERCA2a y PLN.

La electroforesis se realizó a potencial constante comenzando con 90 V durante el apilamiento de las muestras y luego a 120 V durante la resolución de las proteínas.

6.6.3. Transferencia de proteínas a una membrana

Finalizada la electroforesis, los geles se estabilizaron en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 15%) y las membranas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore), durante 60 min a 12 V.

6.6.4. Inmunotinción

Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en TBS-T con el objeto de bloquear los sitios libres de proteínas en la membrana, y así evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la membrana, debido a su naturaleza proteica. Una vez bloqueadas las membranas, se incubaron durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios específicos.

- Anticuerpo monoclonal contra RyR2 (C3-33), Thermo Scientific. EE.UU.
- Anticuerpo policlonal dirigido contra SERCA2a (anti-SERCA 2^a), Badrilla, Leeds, Reino Unido, diluido 1:5000 en solución 1% de leche descremada en TBS- T.
- Anticuerpo policlonal dirigido contra PLN (anti-PLN), Thermo Scientific MA3-922, Waltham, MA, EE.UU.

Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, y para la detección de los mismos, se lavaron las membranas 3 veces (lavados de 15 min y cambio a TBS-T fresco) y luego se incubaron durante 1 h con el correspondiente anticuerpo secundario específico de especie (en dilución 1:20.000, Santa

Cruz, CA, EE.UU.). Luego se realizaron nuevamente 3 lavados para quitar el exceso de anticuerpo.

6.6.5. Visualización de proteínas

El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia por exposición de las membranas al reactivo del kit comercial ECL Plus (Amersham Biosc. EE.UU.), y revelado en el equipo para la obtención de imágenes ChemiDoc (Bio-Rad, EE.UU.).

Para la cuantificación de las bandas de diferente intensidad y tamaño de acuerdo con la cantidad de antígeno detectado, se utilizó el software de acceso libre ImageJ (versión 1.37, de NIH, EE.UU.) mediante el cual se mide la intensidad de las señales digitalizadas.

7. ESTADISTICA

Las variables continuas se expresaron como media \pm SEM y se compararon con la prueba t de *Student* no apareada o con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey, para comparar las diferencias entre los grupos. El paquete de software GraphPad Prism 6.0 se utilizó para el análisis estadístico.

IV. RESULTADOS

8. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE RATÓN USADAS

8.1 GENOTIPIFICACIÓN

Previo a la realización de los experimentos y como se realizó previamente (Mazzocchi, y otros, 2016), se verificaron mediante tipificación genética las cepas para identificar y confirmar la característica de homocigota de cada una, a través de la técnica de Southern Blot. Como los ratones SAKO se usaron por primera vez en este trabajo de Tesis para explorar la función mitocondrial, la [Figura 24](#) muestra el análisis genotípico por PCR de esta cepa.

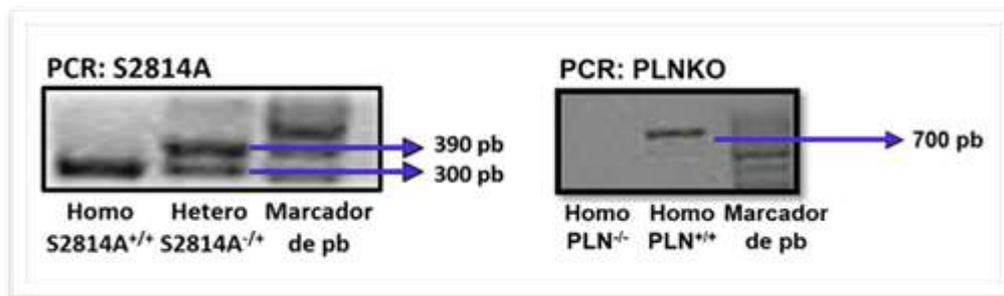


Figura 24. Genotipificación mediante PCR en tejido de cola de ratón SAKO. Los ratones utilizados en el presente trabajo son homocigotas para la mutación S2814A y carecen de PLN. La caracterización se realizó mediante la amplificación de una secuencia del ADN aislado con cebadores específicos, y posterior digestión con la enzima *Cla*I. **A.** En la primera calle se observa una única banda de 300 pares de bases (pb) que indica la presencia (homocigota) del gen mutado (300 pb), mientras que en la calle central se observan dos bandas de diferente longitud (300 y 390 pb), correspondientes a la presencia del gen mutado y del gen silvestre (390 pb), es decir ratón heterocigoto. **B.** En la primera calle se observa la ausencia de la banda de 700 pares de bases correspondiente al gen silvestre de PLN, y en la segunda calle la correspondiente a un ratón silvestre (PLN^{+/+}).

8.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

En experimentos previos se demostró que la ablación de PLN no modifica la expresión de proteínas relacionadas al AEC, excepto los RyR2 que disminuyen en su expresión (Chu, y otros, 1998; Mazzocchi, y otros, 2016). Se comprobó en nuestro laboratorio que la misma disminución ocurría en los miocitos de ratones SDKO (Mazzocchi, y otros, 2016). A fin de evaluar si esta misma disminución se producía en los miocitos de ratones SAKO, determinamos la expresión de RyR2 en los miocitos de esta cepa. La [Figura 25](#) compara la expresión de diferentes proteínas involucradas en el AEC en miocitos en las diferentes

cepas usadas. Se comprueba la disminución del RyR2 en PLNKO y SDKO. En SAKO se detecta una disminución que no llega a ser significativa. Por otro lado, no se detectaron cambios significativos en la expresión de SERCA2a y como era de esperar, no se detecta la expresión de PLN en los animales con ablación de PLN.

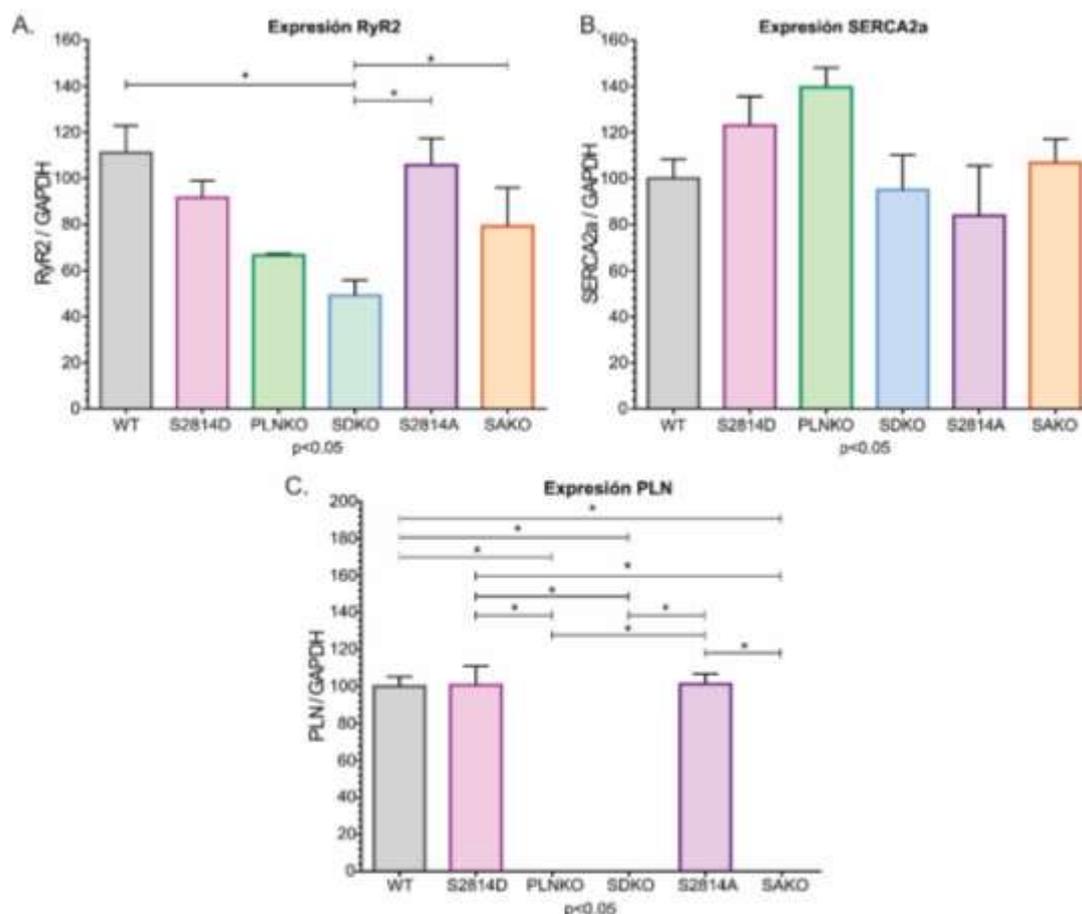


Figura 25. Expresión de diferentes proteínas involucradas en el AEC en las distintas cepas usadas.

Se observa la disminución significativa de la expresión de RyR2 en PLNKO y SDKO. No hay cambios en la expresión de SERCA2a y no se detecta expresión de PLN en los animales con ablación de PLN.

8.2. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE Ca^{2+} EN LOS MIOCITOS DE LAS DIFERENTES CEPAS

La [Figura 26](#) muestra las características de la dinámica del Ca^{2+} en los miocitos de las diferentes cepas usadas en este trabajo.

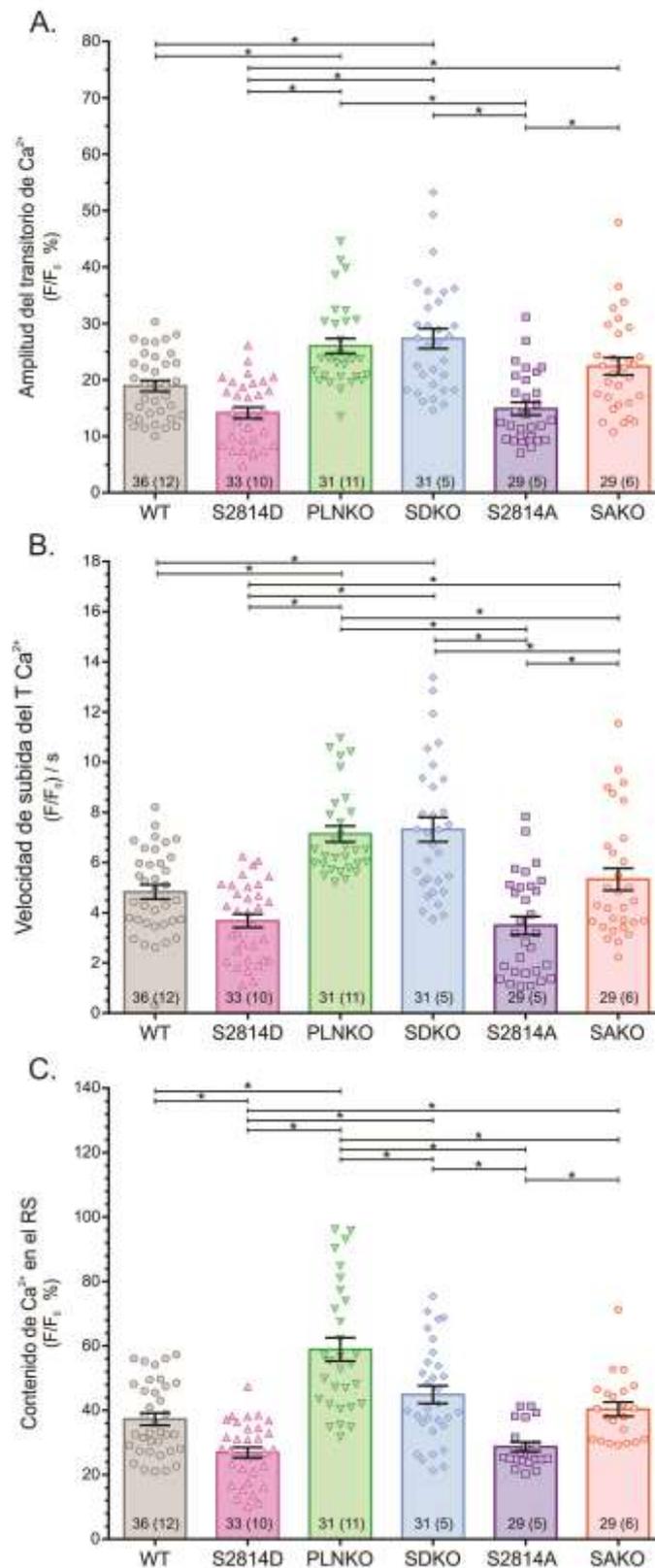


Figura 26. Características de la dinámica del Ca²⁺ en las diferentes cepas. A. Amplitud del transitorio de Ca²⁺. B. Velocidad de subida del transitorio del Ca²⁺ y C. Contenido de Ca²⁺ en el RS.

Los resultados indican un aumento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y de la velocidad de subida de dicho transitorio en PLNKO y SDKO respecto a WT, que es esperable por el aumento del secuestro de Ca^{2+} por el RS, producido en los 2 casos por la ablación de PLN. En los SAKO, aunque estos parámetros aumentaron respecto a WT, el aumento no fue significativo, aunque sí lo fue con respecto a S2814D. La disminución del contenido de Ca^{2+} en los miocitos S2814D y SDKO respecto a WT y PLNKO respectivamente, se debe a la pérdida de Ca^{2+} que provoca la pseudo-fosforilación constitutiva del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2. Sin embargo, la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y la velocidad de subida del transitorio no cambian significativamente respecto a WT y PLNKO respectivamente, debido a que la pseudo-fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 aumenta la liberación de Ca^{2+} del RS y contrarresta el menor contenido de Ca^{2+} del RS en estos miocitos (Lascano, Negroni, Vila Petroff, & Mattiazzi, 2017). Con respecto a los SAKO, no se encontraron aumentos significativos en el contenido de Ca^{2+} del RS respecto a WT. Las razones de este hallazgo no son claras. Sin embargo, en experimentos preliminares observamos que la expresión del NCX en SAKO mostraba una fuerte tendencia a aumentar respecto a las demás cepas. Este hecho, que podría ser un mecanismo compensatorio, (aunque no fue detectado en las otras cepas con ablación de PLN), explicaría la menor carga de Ca^{2+} del RS en esta cepa. Se requieren sin embargo más experimentos para comprobar esta posibilidad.

8.3. EFECTO DE LA ABLACIÓN DE PLN EN EL DAÑO POR I/R PRODUCIDO POR LA PSEUDOFOSFORILACIÓN CONSTITUTIVA DEL RESIDUO Ser²⁸¹⁴ DEL RyR2 EN CORAZONES S2814D

Di Carlo y col. (2014) demostraron que la pseudo fosforilación constitutiva del sitio 2814 del RyR2 (corazones de ratones S2814D), aumenta el tamaño del infarto en protocolos de I/R prolongada (Di Carlo, y otros, 2014). En los presentes experimentos se pretende dilucidar si la ablación de PLN aumenta o rescata del daño miocárdico producido por la pérdida de Ca^{2+} por el RS en corazones de animales S2814D.

Los resultados indican que la recuperación contráctil en la reperfusión es similar, aunque muy escasa, en corazones WT y S2814D, confirmando resultados previos (Di Carlo, y otros, 2014) y prácticamente nula en ratones con ablación de PLN, tanto PLNKO como SDKO. El daño miocárdico es significativamente mayor en S2814D que en WT, nuevamente de acuerdo con

los resultados previos (Di Carlo, y otros, 2014). Por otra parte, se comprobó que la ablación de PLN aumenta el tamaño del infarto observado en S2814D. El aumento del tamaño del infarto en PLNKO respecto a S2814D podría deberse a distintos factores no excluyentes, como:

- Un efecto deletéreo de la mayor retoma de Ca^{2+} por el RS con aumento del contenido y liberación de Ca^{2+} del RS que altere la función mitocondrial
- Un aumento de gasto energético en los PLNKO (Cross HR, 2003), atribuido a la mayor actividad de la SERCA2a y la mayor contractilidad de los corazones de estos ratones (ver *Figura 26*).

Por otra parte, entre los dos modelos con ablación de PLN (PLNKO y SDKO), en los que la influencia de la diferencia del gasto energético - de existir - sería mínima, no pudimos detectar ninguna diferencia en el tamaño del infarto ni en la contractilidad (ver *Figura 27*).

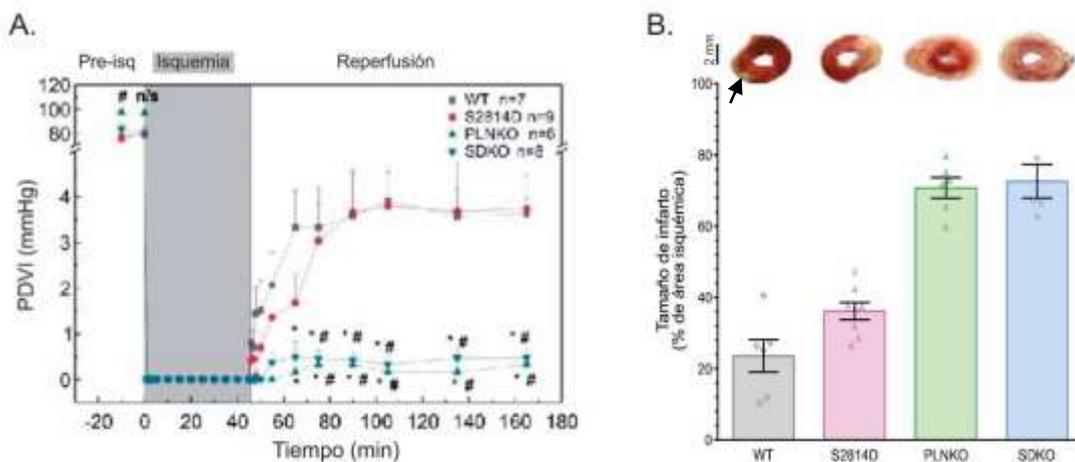


Figura 27. Registros mecánicos y áreas de infarto en I/R “largas” en las diferentes cepas estudiadas.

A. En los registros mecánicos, la recuperación de la contractilidad es mínima en todas las cepas, aunque significativamente mayor en WT y S2814D que en PLNKO y SDKO. **B.** En la parte superior se muestran cortes de corazón con aumentos sucesivos en las áreas de infarto (blancas) en WT, S2814D, PLNKO y SDKO, respectivamente. En la parte inferior, resultados totales. Hay un aumento del área de infarto en S2814D vs WT y en PLNKO y SDKO vs WT y S2814D. No se evidencian diferencias entre PLNKO y SDKO.

Entre las posibles explicaciones para este último resultado se podrían considerar: 1. Que la pérdida de Ca^{2+} aumentada no produce daño miocárdico adicional. 2. Que para similar gasto energético, la ablación de PLN efectivamente protege del daño producido por la pérdida de Ca^{2+} por el RS. 3. Que debido a la magnitud del daño causado por la ablación de PLN, el posible daño adicional debido al aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS, no pueda visualizarse.

La comparación de los resultados obtenidos en corazones de animales WT y S2814D, indican que la primera posibilidad es improbable, debido a que la mayor pérdida de Ca^{2+} por el RS en los corazones S2814D produce daño miocárdico adicional respecto a los WT.

A fin de distinguir entre las dos últimas posibilidades y estimar el rol relativo en el daño miocárdico del aumento del secuestro de Ca^{2+} con respecto a la pérdida de Ca^{2+} por el RS, se decidió cambiar el protocolo experimental a un protocolo de isquemia corto (15 min) seguidos de 10/30 min de reperfusión. Este protocolo permite además una evaluación más apropiada de la función mitocondrial, ya que en experimentos preliminares, se comprobó que la exploración de la función mitocondrial en corazones de ratones resulta muy difícil cuando son sometidos a períodos largos de isquemia, por el escaso material mitocondrial obtenido como consecuencia de la muerte celular del tejido (Ciocci-Pardo A., Cely-Ortiz A., Mattiazzi A. Mosca S. (experimentos no publicados).

La *Figura 28* A y B muestra los resultados de este grupo experimental. La recuperación contráctil fue similar en corazones S2814D y WT, ligeramente mayor en SDKO respecto a PLNKO y significativamente menor en SDKO y PLNKO, respecto a las otras dos cepas. Como era de esperar (Said, y otros, 2003), no hubo infarto apreciable en los corazones WT y aunque aumentó levemente en los corazones S2814D con respecto a WT, este aumento no alcanzó niveles significativos. El 5 al 10 % de infarto observado en esos corazones (indicado por flechas), corresponden fundamentalmente al daño producido por los electrodos de estimulación. Por otra parte, la ablación de PLN, aunque aumentó significativamente el daño observado en WT, no alcanzó, con este protocolo de isquemia “cortas”, a aumentar significativamente el daño miocárdico ocurrido en los corazones S2814D. En contraste, el tamaño del infarto fue significativamente mayor en SDKO respecto a todas las demás cepas, incluida PLNKO.

Estos resultados sugieren fuertemente que ambos factores, mayor actividad del RyR2 y mayor secuestro de Ca^{2+} , tienden a aumentar el daño miocárdico. Esta conclusión se confirma cuando se compara con los resultados obtenidos en PLNKO vs SDKO: El aumento del secuestro de Ca^{2+} en SDKO potencia el

efecto producido por la pseudo-fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴ en los corazones S2814D y de la ablación de PLN en los PLNKO.

Estos resultados evidencian que el aumento del secuestro de Ca²⁺ no es capaz de proteger del daño causado por la fosforilación del RyR2, sino que, por el contrario, lo exacerba.

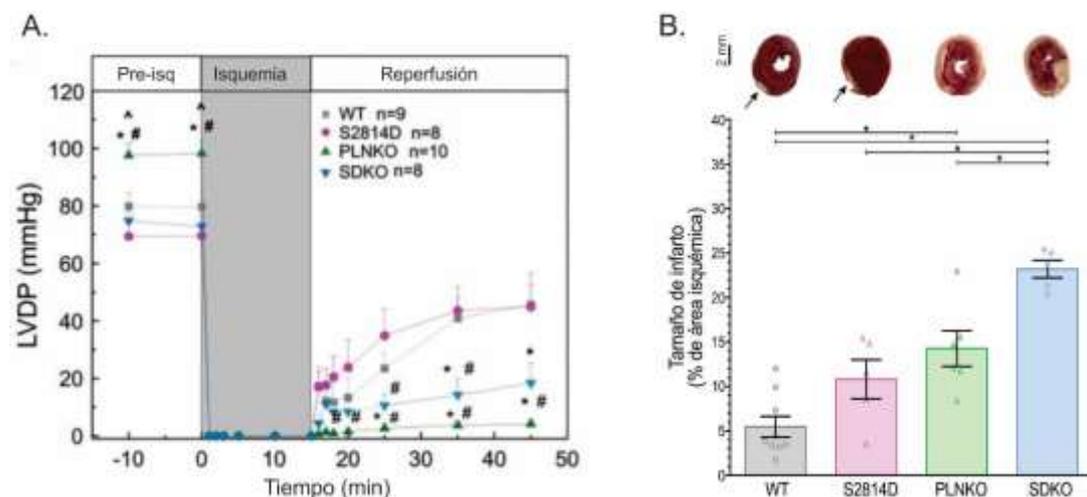


Figura 28. Registros mecánicos y de tamaño del infarto después de I/R Cortas, en las diferentes cepas.

A. Los corazones con doble mutación (SDKO) tuvieron una recuperación mecánica ligeramente mejor que los PLNKO, pero ambos grupos se recuperaron significativamente menos que los corazones WT y S2814D. **B.** En la parte superior de la figura se observan cortes de corazones mostrando las áreas de infarto (blancas). Las mismas son mínimas en WT y S2814D y posiblemente debidas a los electrodos de estimulación (indicadas por flechas). Las áreas de infarto aumentan en PLNKO y SDKO. En la parte inferior se muestran los resultados totales.

8.4. EL AUMENTO DEL DAÑO MIOCÁRDICO EN SDKO RESPECTO A S2814D Y PLNKO ESTÁ ASOCIADO CON DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.

Cumpliendo con el objetivo principal de estudiar la función mitocondrial, en el siguiente grupo experimental se realizó la evaluación funcional de las mitocondrias en mitocondrias aisladas obtenidas de los diferentes grupos sometidos a un protocolo de perfusión sin isquemia (basales) y a uno de I/R (15/10min). En este grupo experimental se agregaron dos nuevas cepas, S2814A y SAKO.

La [Figura 29](#) muestra registros típicos de los cambios de fluorescencia del indicador rodamina (insertos a la derecha) expresados en unidades arbitrarias usadas para la determinación del $\Delta\Psi_m$ en mitocondrias aisladas luego del período de I/R y los resultados totales obtenidos del potencial de membrana

mitocondrial (expresado en mV) de las mitocondrias de los corazones de ratones WT, S2814D, PLNKO, SDKO, S2814A y SAKO.

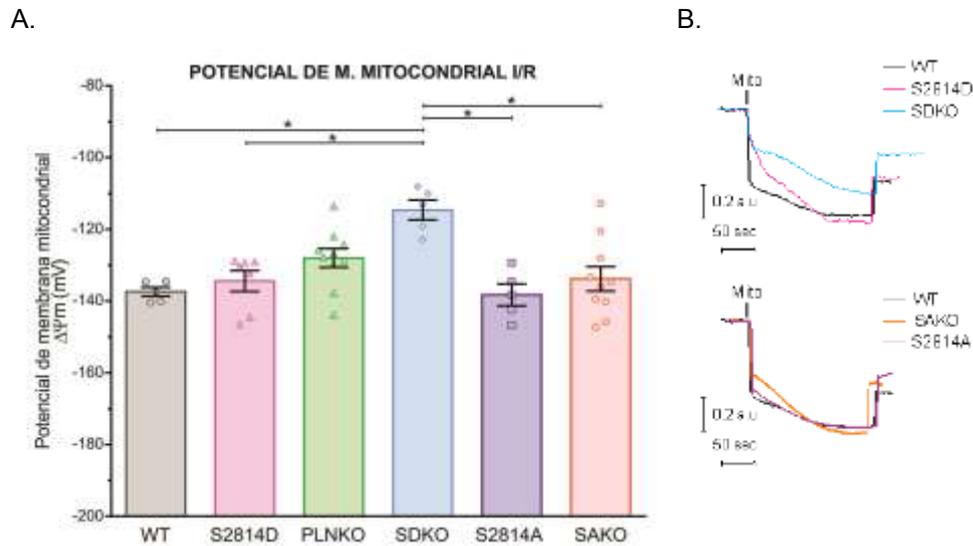


Figura 29. A-B. Potencial de membrana mitocondrial. Registros típicos de los cambios de fluorescencia y resultados totales del potencial de membrana mitocondrial (expresado en mV) de las mitocondrias de los corazones de ratones WT, S2814D, S2814A, PLNKO, SDKO y SAKO.

No hubo diferencias en el $\Delta\Psi_m$ basal entre las diferentes cepas y en todos los casos, la I/R produjo una despolarización significativa respecto al basal. Esta despolarización fue significativamente mayor en las mitocondrias de los ratones SDKO vs. los otros grupos y fue revertida en los ratones SAKO. Este aumento de la despolarización de la membrana mitocondrial indicaría un flujo aumentado de Ca^{2+} hacia las mitocondrias en corazones SDKO.

La [Figura 30](#) muestra experimentos típicos y resultados totales de la sensibilidad al Ca^{2+} del mPTP (*swelling*) evaluada como la disminución de la dispersión de la luz (DL) en muestras derivadas de los seis grupos de corazones después del agregado 200 $\mu\text{moles/L}$ ClCa^{2+} . Nuevamente la DL mitocondrial basal fue similar en todas las cepas, excepto en WT que fue significativamente mayor, indicando un menor “hinchamiento” basal, que en el resto de las cepas. Estos resultados sugerirían que en todas las cepas mutadas, se produce un modesto *remodelamiento* mitocondrial, ya que pudo ser detectado por la medida del *swelling*, pero no del potencial de membrana mitocondrial. Luego del protocolo de I/R, la DL producida por la adición de Ca^{2+} fue significativamente menor sólo en las mitocondrias de los corazones SDKO, respecto al resto de los grupos.

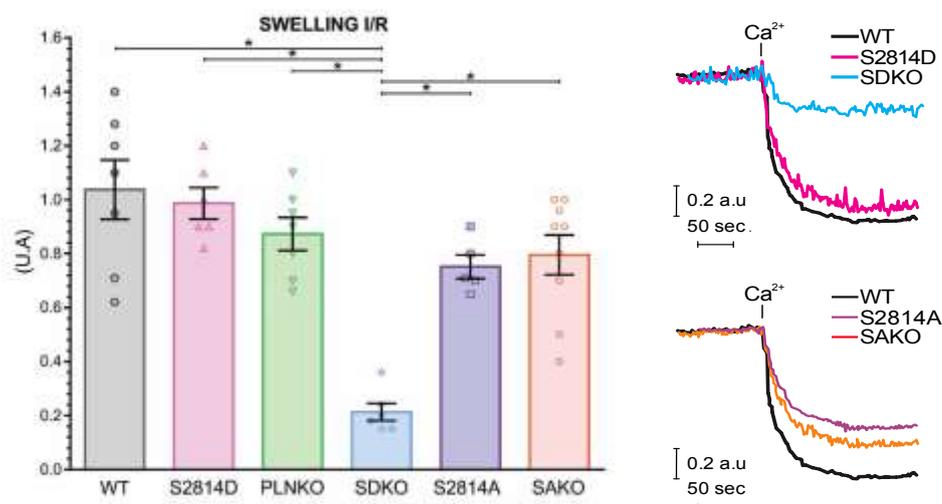


Figura 30. Experimentos típicos y resultados totales del hinchamiento mitocondrial. Swelling mitocondrial evaluado como la disminución de la dispersión de la luz (DL)

Tomados en conjunto los resultados de las figuras 29 y 30, indican nuevamente que el aumento del secuestro de Ca^{2+} no previene, sino que, al contrario, exacerba el daño miocárdico en la I/R producido por la mayor actividad del RyR2 por fosforilación por CaMKII. El aumento del daño miocárdico en los corazones de ratones SDKO respecto a los S2814D podría explicarse por diferentes causas. Una de ellas, es la mencionada anteriormente, es decir por el posible mayor gasto energético producido por la ablación de PLN. Sin embargo, esta posibilidad puede ser descartada: En experimentos realizados en corazones con y sin ablación de PLN y sometidos a I/R de 15/30 min, (no incluidos en este trabajo de tesis) en el laboratorio de la Dra. Consolini, en la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata, que colaboró con nuestro laboratorio, usando estos mismos animales, se demostró que al menos en los protocolos de I/R no prolongados, la producción total de calor en condiciones basales, fue similar en los corazones de SDKO, PLNKO, y S2814D y en todos los casos mayor que en los corazones de animales WT. Estos resultados sugieren que el daño miocárdico observado en los corazones SDKO vs. S2814D no puede ser atribuido a la diferente demanda energética entre las dos cepas. Por otra parte, el calor total en los SDKO fue menor que en los PLNKO, a pesar del mayor tamaño de infarto y disfunción mitocondrial en los corazones de SDKO (Valverde, y otros, 2019).

Una segunda posible explicación al mayor daño miocárdico y mitocondrial sufrido por los corazones SDKO respecto a los PLNKO, los S2814D y los SAKO, es la mayor pérdida de Ca^{2+} por el RS en los corazones SDKO.

Con el fin de evaluar esta posibilidad, se estudió la pérdida de Ca^{2+} diastólico en las diferentes cepas.

9. PÉRDIDA DE Ca^{2+} EN DIÁSTOLE

La pérdida de Ca^{2+} en diástole se estimó a través de la evaluación por microscopía confocal, de las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} por el RS (chispas o *sparks* de Ca^{2+}) en diástole, en dos situaciones: 1. En miocitos aislados, sometidos a una concentración de Ca^{2+} extracelular superior a la usada en los experimentos. 2. Al inicio de la reperfusión, en corazones intactos sometidos a I/R según el protocolo de isquemias cortas que veníamos usando.

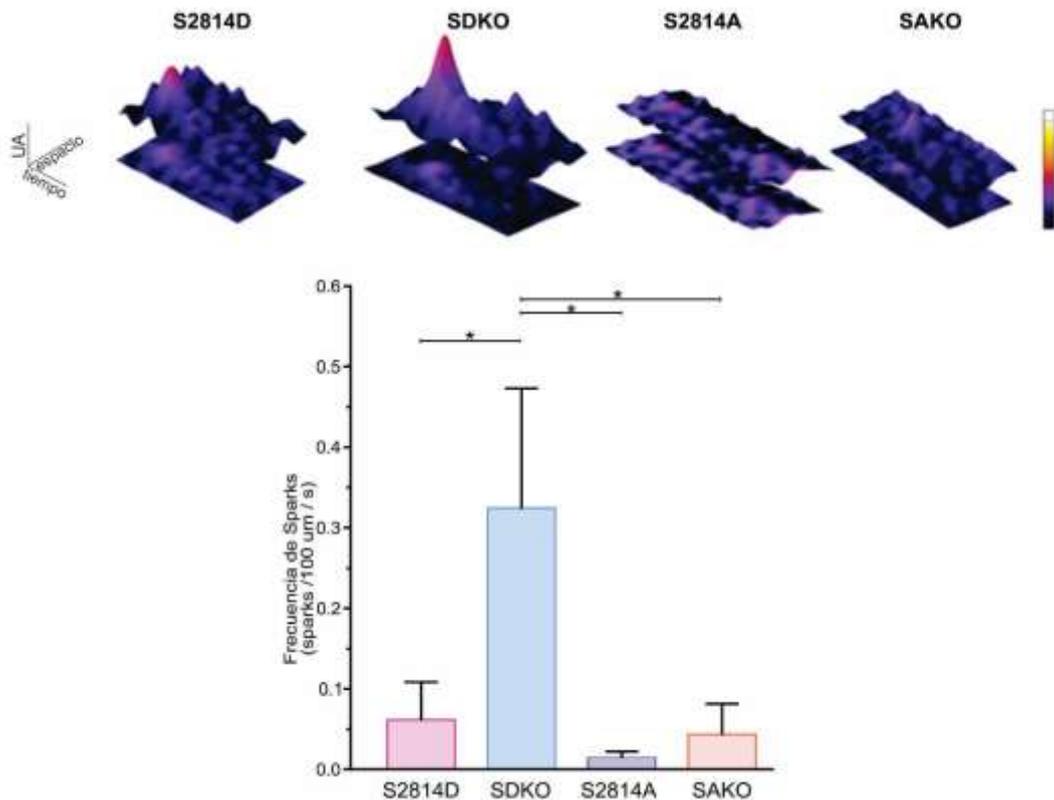


Figura 31. Pérdida de Ca^{2+} en diástole en diferentes cepas. Se observa que el aumento de pérdida de Ca^{2+} es significativamente mayor en SDKO respecto a S2814D, Ser2814A y SAKO.

La [Figura 31](#) muestra el resultado de la primera serie de experimentos. En la [Figura 31A](#) se observan ejemplos típicos de *sparks* de Ca^{2+} y en la [Figura 31B](#),

aparecen los resultados totales. Como se ve, la frecuencia de chispas de Ca^{2+} , fue significativamente mayor en los miocitos SDKO respecto a los de S2814D, S2814A y SAKO. Estos resultados indican que el aumento del secuestro de Ca^{2+} asociado a la pseudo fosforilación de RyR2 por CaMKII, aumenta la pérdida de Ca^{2+} en diástole, más de lo que lo hace la pseudo fosforilación del RyR2 o el aumento del secuestro Ca^{2+} por el RS independientemente.

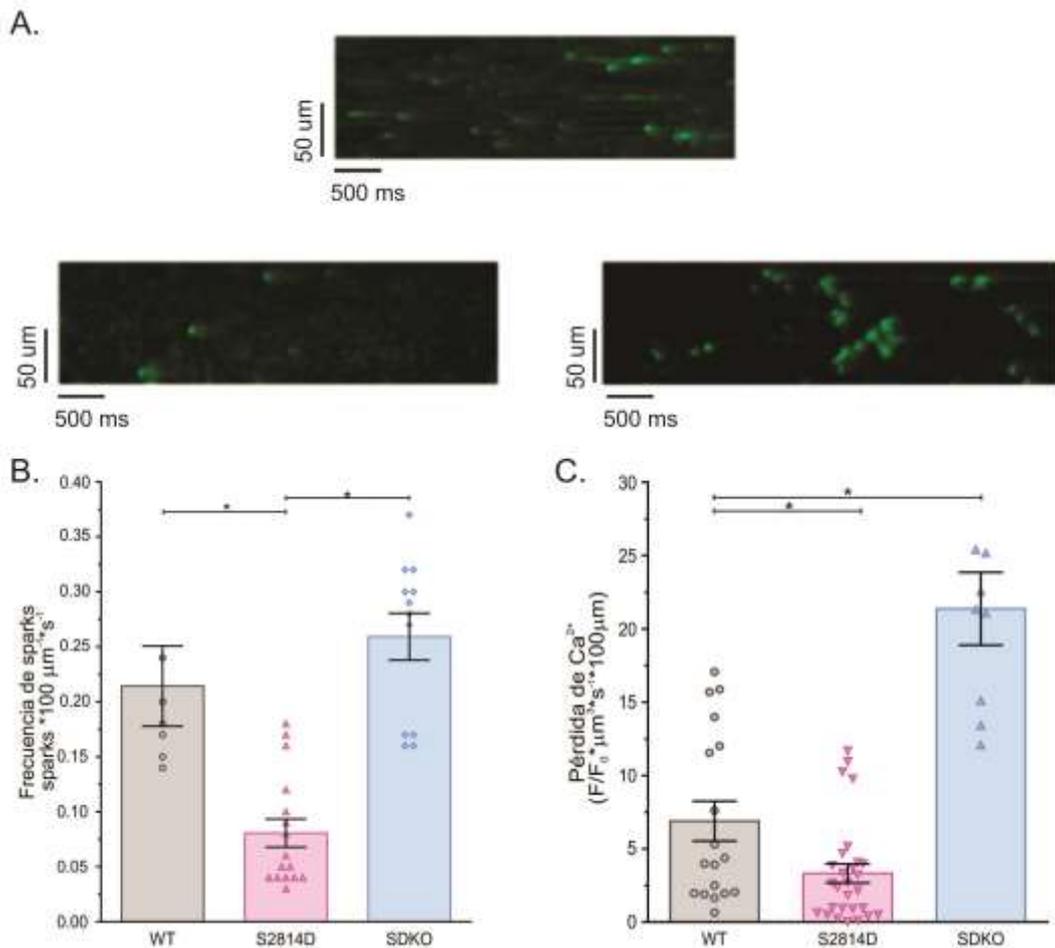


Figura 32. Frecuencia de sparks de Ca^{2+} y pérdida de Ca^{2+} en reperfusión. La frecuencia de sparks en diástole al comienzo de la reperfusión es mayor en los corazones de ratones SDKO que en el de WT y S2814D. **A.** Ejemplos típicos de escaneado lineal (line scan) de las sparks de Ca^{2+} epicárdicas obtenidas en corazones intactos de WT, S2814D y SDKO al comienzo de la reperfusión luego de 15 min de isquemia. **B.** Resultados totales de la frecuencia de sparks y **C.** Pérdida de Ca^{2+} estimada.

La [Figura 32](#) muestra el resultado de experimentos de I/R en corazones intactos en animales WT, S2814D y SDKO. Como se ve, las chispas de Ca^{2+} fueron más frecuentes al comienzo de la reperfusión en los corazones SDKO que en los WT y S2814D. En varios casos, como en el ejemplo mostrado en la [figura 32A](#) en los corazones SDKO, las chispas de Ca^{2+} pueden visualizarse como grupos de eventos, reminiscentes de las liberaciones repetitivas de Ca^{2+}

en sitios individuales descritos en corazones con ablación de PLN por Hüser y col. (1998).

La pérdida de Ca^{2+} en diástole es menor en S2814D que en WT. Aunque no se midió el contenido de Ca^{2+} de estos corazones al final del período isquémico, la menor pérdida de Ca^{2+} al comienzo de la reperfusión observada en los corazones S2814D puede atribuirse al menor contenido de Ca^{2+} del RS con respecto a los corazones WT, debido a la pérdida constante de Ca^{2+} que produce la pseudofosforilación constitutiva del RyR2 en S2814 (ver [Figura 26C](#)).

En conclusión, estos dos grupos experimentales revelan que efectivamente ocurre una mayor pérdida de Ca^{2+} en los corazones en los que la ablación de PLN se asocia a una mayor actividad del RyR2 y tomados en su conjunto con los resultados anteriores, que el aumento del secuestro de Ca^{2+} no previene el daño miocárdico especialmente si se asocia a una alteración de los RyR2.

V. DISCUSIÓN

En experimentos previos se demostró que: a. En el corazón intacto y funcionando, sometido a un período de isquemia seguido de reperfusión, se produce un incremento en el Ca^{2+} diastólico y sistólico al inicio de la reperfusión (al que hemos denominado Ca^{2+} *bump*), que proviene del RS y está asociado a una disminución del transitorio de Ca^{2+} (Valverde, y otros, 2010); b. El aumento del Ca^{2+} citosólico se asocia además a un aumento en la actividad de CaMKII, y a la fosforilación de proteínas clave en el manejo del Ca^{2+} : la PLN, que al fosforilarse transitoriamente aumenta el secuestro de Ca^{2+} por el RS (Said M. , y otros, 2008; Salas, y otros, 2010; Di Carlo, y otros, 2014) y el RyR2, que aumenta la pérdida de Ca^{2+} por el mismo en diástole (Ca^{2+} *leak*). c. Estas fosforilaciones se asociaron con aumento del infarto, de la apoptosis y necrosis, alteraciones que fueron prevenidas cuando se impidió la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ de RyR2 (Di Carlo, y otros, 2014) y se inhibió el MCU y el mPTP (Salas, y otros, 2010). Estos experimentos señalaron en su conjunto una cascada de señales involucrada en el daño miocárdico por I/R, esquematizada de la siguiente manera:

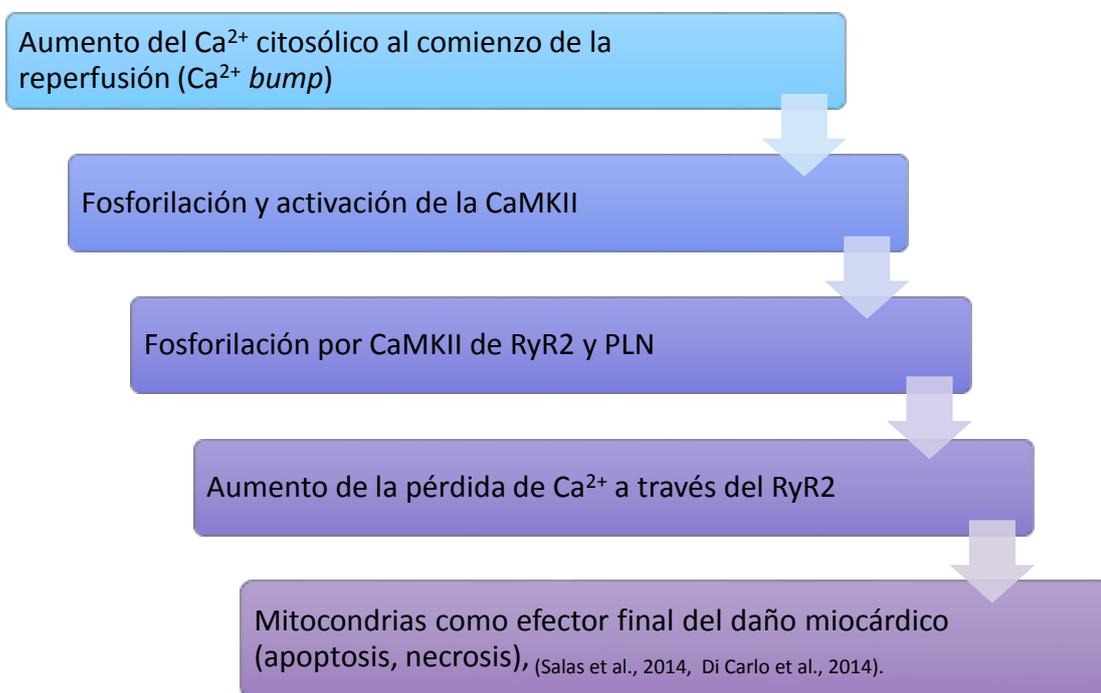


Figura 33. Cascada de señales involucradas en el daño miocárdico por I/R.

En estos resultados previos se demostró la importancia de la pérdida de Ca^{2+} por el RS, como factor de relevancia en el daño miocárdico y las arritmias de reperfusión. Los resultados sugirieron además a las mitocondrias como

efectores finales de la injuria de reperfusión. Sin embargo, la función mitocondrial no había sido interrogada en los estudios anteriores en forma directa.

En el presente trabajo se demostró que, efectivamente el daño miocardio se asocia con disfunción mitocondrial, evaluada por los cambios del potencial de membrana mitocondrial y la sensibilidad al Ca^{2+} del mPTP (*swelling*). La sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial es un disparador fundamental de la apertura del mPTP, lo que resulta en despolarización de la membrana y *swelling* mitocondrial seguido de disfunción (disminución en la producción de ATP) y liberación de citocromo c, con lo que la muerte celular ocurre rápidamente (Ong, Samangouei, Kalkhoran, & Hausenloy, 2015; Morciano, y otros, 2017; Briston, Selwood, Szabadkai, & Duchon, 2019). En este estudio se demostró un aumento en la despolarización de la membrana mitocondrial y una mayor sensibilidad al Ca^{2+} del mPTP en las mitocondrias de los ratones SDKO.

Como se señaló más arriba, en el aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS intervienen, sin embargo, al menos dos factores: 1. Activación de los RyR2, por ejemplo, por fosforilación y 2. Aumento del contenido de Ca^{2+} del RS, por mayor secuestro de éste desde el citosol.

Se ha demostrado que el aumento transitorio del secuestro de Ca^{2+} , resultaba beneficioso en el *corazón atontado* y en la injuria por I/R (Said, y otros, 2003; Di Carlo, y otros, 2014) (y ver [Figura 8](#)). Se desconoce qué ocurre con un aumento más prolongado. Esto es importante ya que el aumento del secuestro de Ca^{2+} ha sido propuesto como herramienta, no sólo en el contexto de la I/R para atenuar las arritmias de reperfusión (Del Monte, y otros, 2004) sino además para restaurar la disfunción miocárdica en la insuficiencia cardiaca (Byrne MJ, 2008; Kho C, 2015; Lyon, y otros, 2020).

Resulta por lo tanto importante 1. Explorar el efecto de un aumento no transitorio del secuestro de Ca^{2+} en la disfunción mitocondrial y el daño miocárdico, tomando como modelo experimental a la I/R y 2. Dilucidar el rol relativo del secuestro y la pérdida de Ca^{2+} en dichas alteraciones.

El hallazgo principal de este estudio es que el aumento del secuestro de Ca^{2+} por ablación de PLN no protege de la disfunción mitocondrial y el daño

miocárdico producido por la pérdida de Ca^{2+} por alteración de los RyR2. Por el contrario, lo exacerba. Esto ocurrió cuando los corazones WT y S2814D fueron sometidos a un corto período de I/R que no produce infarto significativo en corazones de animales WT (*Figura 27*) y en que la ablación de PLN no produce mayor gasto energético (Valverde, y otros, 2019).

Los resultados indican entonces que el aumento del secuestro de Ca^{2+} como herramienta para tratar la disfunción contráctil debe de ser cauteloso, sobre todo si la disfunción contráctil ocurre con alteración de los RyR2 como es el caso de la I/R (Salas, y otros, 2010; Di Carlo, y otros, 2014) o la insuficiencia cardíaca (Byrne MJ 2008, Kho C 2015, Lyon, Babalis et al. 2020).

Los experimentos discutidos hasta el momento no contestan una de las preguntas iniciales: ¿Qué peso relativo tiene la mayor actividad del RyR2 vs el mayor secuestro de Ca^{2+} en los corazones SDKO? Los experimentos realizados en la cepa SAKO en la que el RyR2 no puede fosforilarse por CaMKII, demuestran que la pérdida de Ca^{2+} en éstos es menor y que el daño mitocondrial observado en SDKO se revierte totalmente.

Estos resultados avalan la conclusión que la pérdida de Ca^{2+} por los RyR2 alterados es el principal responsable del daño miocárdico observado, cuando puede descartarse el posible papel del mayor costo energético del secuestro de Ca^{2+} . Sin embargo, es importante tener en cuenta que para que la disfunción del RyR2 tenga efecto significativo, es necesario un aumento del secuestro de Ca^{2+} , que permita al RS “recargarse” y mantener su reservorio de Ca^{2+} a pesar de su pérdida exacerbada.

Una pérdida de Ca^{2+} por el RS en ausencia de un secuestro aumentado producirá en el mejor de los casos una modesta disfunción mitocondrial, debido a que la pérdida de Ca^{2+} se auto limita, por vaciamiento del RS (*Figura 34A*). Se necesita que la pérdida de Ca^{2+} ocurra en asociación a un aumento del secuestro de Ca^{2+} para que dicha pérdida pueda perpetuarse y eventualmente causar daño (*Figura 34B*).

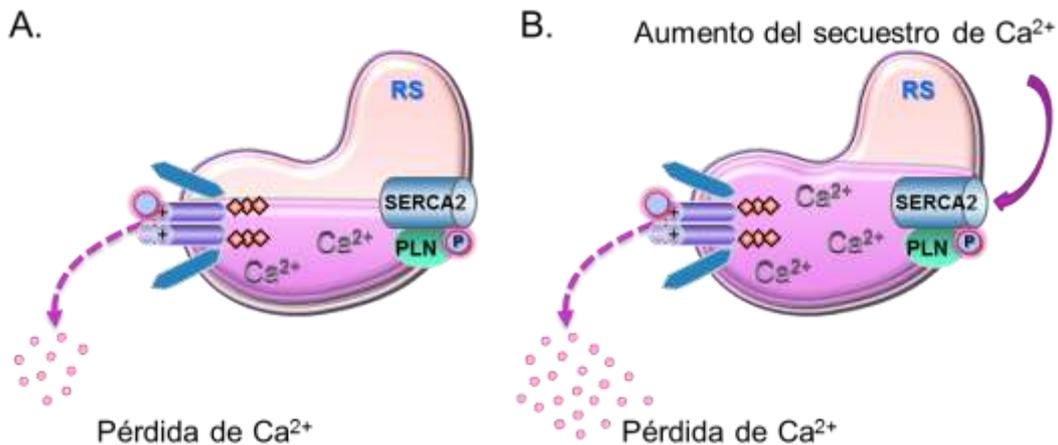


Figura 34. Rol del secuestro de Ca^{2+} en la pérdida de Ca^{2+} .
A. La pérdida de Ca^{2+} por el RS por alteración del RyR2 se auto limita al disminuir el contenido de Ca^{2+} por debajo del umbral de pérdida. B. La pérdida de Ca^{2+} se perpetúa si concomitantemente ocurre un aumento del secuestro de Ca^{2+} por el RS.

Por otra parte, puede surgir la pregunta, ¿por qué en estos experimentos se utilizaron animales con pérdida constante de Ca^{2+} , si la fosforilación del RyR2 por CaMKII ocurre sólo al comienzo de la reperfusión? (Di Carlo, y otros, 2014).

La idea de este trabajo fue no solamente explorar el efecto de la fosforilación de RyR2 al comienzo de la reperfusión, sino explorar una situación en que la pérdida de Ca^{2+} sea constante. Por ejemplo, la alteración del RyR2 en la I/R puede ocurrir, y aún exacerbarse, por otros factores. Como se mencionó previamente, en la I/R se han descrito diferentes alteraciones del RyR2 además de la fosforilación, por ejemplo, alteraciones redox (Hidalgo, Bull, Behrens, & Donoso, 2004), degradación de los RyR2 en la isquemia (Domenech, Sánchez, Donoso, Parra, & Macho, 2003) y en la reperfusión (Salas, y otros, 2010), que podrían estar vinculadas a un aumento constante de la pérdida de Ca^{2+} por el RS. Los ratones usados, con pérdida de Ca^{2+} durante todo el período de I/R, nos han brindado una herramienta experimental para estudiar esta posibilidad. Es importante enfatizar que en la insuficiencia cardíaca - donde se ha propuesto aumentar el secuestro de Ca^{2+} para aumentar la contractilidad disminuida en esta enfermedad (Byrne MJ, 2008; Kho C, 2015; Lyon, y otros, 2020) - se ha descrito una fosforilación del RyR2 por CaMKII (Wehrens X., Lehnart, Reiken, & Marks, 2004), por PKA (Wehrens X., y otros, 2006), siendo ambas productoras de una mayor actividad del RyR2 con pérdida exacerbada de Ca^{2+} .

Nuestro trabajo se concentró en estudiar la disfunción mitocondrial producto de la sobrecarga de Ca^{2+} proveniente del RS, en un intento de completar la

cascada de señales que producen daño miocárdico, previamente descrita en nuestro laboratorio (Salas, y otros, 2010; Said M. , y otros, 2011; Di Carlo, y otros, 2014). Se exploró el efecto que el aumento del secuestro de Ca^{2+} puede producir en dicha disfunción. Sin embargo, no podemos ni pretendemos descartar en este estudio otros mecanismos de sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y muerte celular en la I/R, tales como como el estrés oxidativo o la depleción de ATP (Murphy & Steenbergen, 2008). Incluso dentro de los mecanismos que alteran el manejo de Ca^{2+} , podrían nombrarse otros; por ejemplo, la ablación de PLN puede ocasionar una pérdida concomitante de otra proteína del RS, HAX-1 (una proteína que regula la actividad de PLN y el mPTP (Vafiadaki E, 2007) que resulta en aumento del estrés del RS y daño mitocondrial. Efectivamente se ha descrito que la PLN se une a la proteína antiapoptótica HAX-1 y que esta proteína conferiría cardioprotección en la injuria por I/R (Lam, y otros, 2015; Seidlmayer, y otros, 2016). Estas acciones proapoptóticas de la ablación de PLN podrían explicar al menos parte del aumento del daño miocárdico en PLNKO y SDKO vs S2814D y WT que se observa en los protocolos de I/R largos. Sin embargo, no explicarían las diferencias en el daño mitocondrial observadas entre corazones de animales SDKO y PLNKO o SAKO. También, la excesiva pérdida de Ca^{2+} por el RS puede activar vías adicionales deletéreas dependientes de CaMKII que podrían contribuir al daño miocárdico observado (Zhu, y otros, 2007; Feng & Anderson, 2017). En otras palabras, vías adicionales superpuestas, que no se pueden descartar, podrían contribuir a explicar al menos en parte, el daño mitocondrial descrito.

VI. CONCLUSIONES

En conjunto, estos experimentos demuestran que el infarto producido por I/R se asocia íntimamente a una disfunción mitocondrial debida a la pérdida de Ca^{2+} por el RS. Los resultados sugieren además que el aumento del secuestro de Ca^{2+} por el RS, lejos de proteger al corazón, exacerba dicho daño y no podría ser usado como una herramienta terapéutica. Aunque ha sido demostrada su utilidad terapéutica para la prevención de arritmias, como las que ocurren en reperfusión (Hüser, Bers, & Blatter, 1998; Del Monte, y otros, 2004; Kawase & Hajjar, 2008; Prunier, y otros, 2008; Bai, y otros, 2013; Valverde, y otros, 2019; Sato, Uchinoumi, & Bers, 2021) o para mejorar la contractilidad disminuida en la insuficiencia cardíaca (Hulot JS, 2016), constituye un arma de doble filo, sobre todo cuando hay alteración de la función de los RyR2 (Valverde & Mattiazzi, 2022), ya que exacerba el daño miocárdico y la disfunción mitocondrial como se demuestra en este trabajo.

En cuanto a la importancia del peso relativo de la pérdida y el secuestro de Ca del y por el RS en el daño miocárdico por I/R, si bien los resultados indican que la pérdida de Ca^{2+} por los RyR2 disfuncionales es el principal responsable del daño miocárdico observado, como ya se discutió, dicha pérdida debe coexistir con un secuestro aumentado, que permita la recarga del RS.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (Dec de 2005). Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Heart Failure. *Circulation Research*, 97(12), 1314-1322. doi:10.1161/01.RES.0000194329.41863.89
- Altschafel, B. A., Beutner, G., Sharma, V. k., Sheu, S.-S., & Valdivia, H. H. (Jul de 2007). The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: A pharmacokinetic profile. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(7), 1784-1795. doi:10.1016/j.bbamem.2007.04.011
- Anderson, M. E. (01 de Marzo de 2007). Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: Moving beyond an ion channel-centric focus. *Cardiovascular Research*, 73(4), 657-666. doi:10.1016/j.cardiores.2006.12.009
- Bai, Y., Jones, P., Guo, J., Zhong, X., Clark, R., Zhou, Q., . . . Chen, S. (15 de Jul de 2013). Phospholamban knockout breaks arrhythmogenic Ca²⁺ waves and suppresses catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice. *Circulation Research*, 113(5), 517-526. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301678
- Baines, C. P., Song, C.-X., Zheng, Y.-T., Wang, G.-W., Zhang, J., Wang, O.-L., . . . Ping, P. (May de 2003). Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circulation Research*, 8(92), 873-880. doi:10.1161/01.RES.0000069215.36389.8D
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., & Lenaz, G. (30 de Sep de 2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. 1-3(1606). doi:10.1016/s0005-2728(03)00110-5
- Belevych, A. E., Terentyev, D., Terentyeva, R., Ho, H.-T., Gyorke, I., Bonilla, I. M., . . . Györke, S. (5 de Enero de 2012). Shortened Ca²⁺ Signaling Refractoriness Underlies Cellular Arrhythmogenesis in a Postinfarction Model of Sudden Cardiac Death. *Cellular Biology*, 2012(569-577), 569-577. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.260455
- Belevych, A., Kubalova, Z., Terentyev, D., Hamlin, R., Carnes, C., & Györke, S. (2007). Enhanced ryanodine receptor-mediated calcium leak determines reduced sarcoplasmic reticulum calcium content in chronic canine heart failure. *Biophysical Journal*, 93, 4083-4092.

- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellow, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *50*, 940-950.
- Beller, G. (22 de May de 2001). Coronary heart disease in the first 30 years of the 21st century: challenges and opportunities: The 33rd Annual James B. Herrick Lecture of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation*, *20*(103), 2428-2435. doi:10.1161/01.cir.103.20.2428
- Bers, D. (2001). *Book: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force* (2da ed.).
- Bers, D. (Jan de 2002). Review: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198-205. doi:10.1038 / 415198a
- Bers, D. (2004). Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*, *37*, 417-429.
- Bers, D. (Diciembre de 2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology*, 380-387. doi:10.1152/physiol.00019.2006
- Bers, D. M., & Ginsburg, K. S. (Feb de 2007). Na:Ca stoichiometry and cytosolic Ca-dependent activation of NCX in intact cardiomyocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1*(1099), 326-338. doi:10.1196/annals.1387.060.
- Bers, D. M., & Shannon, T. R. (4 de Jan de 2013). Review: Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *58*, 59-66. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.01.002.
- Beuckelmann DJ, N. M. (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, *85*(3), 1046-1055.
- Beutner, G., Sharma, V. K., Lin, L., Ryu, S.-Y., Dirksen, R. T., & Sheu, S.-S. (10 de Nov de 2005). Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *1717*(1), 1-10. doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.016
- Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Werner Wegener, J., Kostner, K., Hofmann, F., & Moosmang, S. (17 de May de 2010). Facilitation of murine cardiac L-type Cav1.2 channel is modulated by Calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *PNAS*, *10*(22), 10285-10289. doi:10.1073 / pnas.0914287107

- Boron, A. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Fisiología médica* (3ra ed.). España: Elsevier.
- Bradford, M. M. (7 de May de 1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Briston, T., Selwood, D., Szabadkai, G., & Duchen, M. R. (Jan de 2019). Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets. *Trends Pharmacol Sci*, 40(1), 50-70. doi:10.1016/j.tips.2018.11.004
- Buja, L. M. (2013). The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria. *Tex Heart Inst J.*, 40(3).
- Byrne MJ, P. J. (2008). Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther*, 15(23), 1550-1557.
- Camors, E., & Valdivia, H. H. (2014). CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol*, 5, 101. doi:10.3389/fphar.2014.00101
- Cely_Ortiz, D. A. (2021). *Tesis: Caracterización de la restitución de la liberación de Ca, un mecanismo de producción de arritmias ventriculares generadas por mal manejo de Ca*. Director: Mattiazzi A. Co-Director: Felice J.I: Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Cely-Ortiz, A. (2020). Determinants of Ca²⁺ release restitution: Insights from genetically altered animals and mathematical modeling. *Journal of general physiology*, 152(11), 1-13. doi:doi.org/10.1085/jgp.201912512
- Chelu MG, S. S. (2009). Calmodulin kinase I mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *Journal Clinical Investigation*, 119, 1940-1951.
- Chelu, M. G., Sarma, S., Sood, S., Wang, S., Van Oort, R. J., Skapura, D. G., . . . Wehrens, X. H. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. 7(119), 1940-1951. doi:10.1172/jci37059
- Chu, G., Ferguson, D. G., Edes, I., Kiss, E., Sato, Y., & Kranias, E. G. (16 de Septiembre de 1998). Phospholamban ablation and compensatory responses in the mammalian heart. *Annals of the New York academy of Sciences*, 853, 49-62.

- Comtois, P., & Nattel, S. (2012). Atrial repolarization alternans as a path to atrial fibrillation. *Journal Cardiovascular Electrophysiology*, *23*, 1013 - 1015. doi:10.1111/j.1540-8167.2012.02391.x
- Cross HR, K. E. (2003). Ablation of PLB exacerbates ischemic injury to a lesser extent in female than male mice: protective role of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *284*, 683-690.
- Dawei Jiang, R. W. (25 de Nov de 2005). Enhanced Store Overload–Induced Ca²⁺ Release and Channel Sensitivity to Luminal Ca²⁺ Activation Are Common Defects of RyR2 Mutations Linked to Ventricular Tachycardia and Sudden Death. *Circulation Research*, *97*(11), 1173-1181. doi:10.1161/01.RES.0000192146.85173.4b
- De la Fuente, S., Fernandez-Sanz, C., Vail, C., Agra, E. J., Holmstrom, K., Sun, J., . . . Csordás, G. (28 de Oct de 2016). Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(44), 23343-23362. doi:10.1074/jbc.M116.755496
- Del Monte, F., Dalal, R., Tabchy, A., Couget, J., Bloch, K., Peterson, R., & Hajjar, R. J. (9 de Jul de 2004). Transcriptional changes following restoration of SERCA2a levels in failing rat hearts. *12*(18), 1474-1476. doi:10.1096/fj.04-1714fje
- Del Monte, F., Lebeche, D., Guerrero, J. L., Tsuji, T., Doye, A., Gwathmey, J. K., & Hajjar, R. J. (2004). Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci USA*, *101*, 5622-5627.
- DelPrincipe F, E. M. (1999). Calcium signalling in cardiac muscle: refractoriness revealed by coherent activation. *Nat Cell Biol*, *1*, 323–329.
- Di Carlo, M. N., Said, M., Ling, H., Valverde, C. A., De Giusti, V., Sommese, L., . . . Mattiazzi, A. (Sept de 2014). CaMKII-Dependent Phosphorylation of Cardiac Ryanodine Receptors Regulates Cell Death In Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal Molecular Cell Cardiology*, *74*, 274-283. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.06.004
- Díaz, M. E., O'Neill, S. C., & Eisner, D. A. (2004). Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans. *Circulation Research*, *96*, 650-656.
- Díaz, M., Eisner, S., & O'Neill, S. (29 de Agosto de 2002). Depressed Ryanodine Receptor Activity Increases Variability and Duration of the Systolic Ca²⁺ Transient in Rat Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, *91*, 585-593.

- Domenech , R., Sánchez, G., Donoso, P., Parra, V., & Macho, P. (2003). Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺dynamics: a mechanism for. *J Mol Cell Cardiol* , 35, 1429-1437.
- Erickson, J. R., Joiner, M. L., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., & Anderson, M. E. (2008). A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*, 133(3), 462-474. doi:10.1016/j.cell.2008.02.048
- Erickson, J. R., Nichols , B. C., Uchlnounml, H., Stein, M. L., Bossuyt, J., & Bers, D. M. (16 de Oct de 2015). S-Nitrosylation Induces Both Autonomous Activation and Inhibition of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 25646–25656.
- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., . . . Bers, D. M. (29 de Sept de 2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, 502, 372-376. doi:10.1038/nature12537
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Cellular Physiology*, C1-C14.
- Fabiato, A., & Fabiato, F. (Aug de 1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal Physiology*, 249, 469-495. doi:10.1113/jphysiol.1975.sp011026
- Fabiato, A., & Fabiato, F. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circulation Research*, 40, 119-129. doi:https://doi.org/10.1161/01.RES.40.2.119
- Fabiato, A., & Fabiato, F. (13 de Sept de 1979). Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate Ca²⁺-induced release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Nature*, 281, 146-148. doi:10.1038/281146a0
- Facundo, H., De Paula, J. G., & Kowaltowski, A. J. (2007). Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species productio. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(7), 1039-1048. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.001
- Fauconnier, J., Roberge, S., Saint, N., & Lacampagne, A. (Jun de 2013). Type 2 ryanodine receptor: A novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(3), 323-332. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.015

- Fawcett , D., & McNutt, N. (1969). The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *The journal of cell biology*, 42(1), 1-45. doi:10.1083/jcb.42.1.1.
- Federico, M., Valverde, C., Mattiazzi, A., & Palomeque, J. (Jan de 2019). Unbalance Between Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Uptake and Release: A First Step Toward Ca²⁺ Triggered Arrhythmias and Cardiac Damage. *Frontiers in Physiology*, 10(1630), 1-22. doi:10.3389/fphys.2019.01630
- Feng, N., & Anderson, M. E. (Feb de 2017). CaMKII is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart. *J Mol Cell Cardiol*, 103, 102-109. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.12.007
- Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Rodriguez-Sinovas, A., & Piper, M. H. (2012). Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovascular Research*, 2(94), 168-180. doi:doi: 10.1093/cvr/cvs116
- Giladi, M., Reut, S., Michal, L., & Daniel, K. (22 de Nov de 2016). Structure-Functional Basis of Ion Transport in Sodium–Calcium Exchanger (NCX) Proteins. (M. Maki, Ed.) *International Journal of Molecular Sciences*, 11(17), 1949.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved fluorescence Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440-3450. Obtenido de <https://www.jbc.org/content/260/6/3440.long>
- Hasenfuss, G., & Pieske, B. (Agosto de 2002). Calcium cycling in congestive heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(8), 951–969. doi:10.1006/jmcc.2002.2037
- Hegyi, B., Bers, D. M., & Bossuyt, J. (Jan de 2019). Review: CaMKII signaling in heart diseases: Emerging role in diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 127, 246–259. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.01.001
- Helms, A. S., Alvarado, F. J., Yob, J., Tang, V. T., Pagani, F., Russell, M. W., . . . Day, S. M. (29 de Noviembre de 2016). Genotype-Dependent and Independent Calcium Signaling Dysregulation in Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 134(22), 1738-1748. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020086
- Hidalgo, C., Bull, R., Behrens, M. I., & Donoso, P. (2004). Ca²⁺ release in muscle and neurons. *Biol Res*, 37, 539-553.

- Hulot JS, I. K. (1 de Jun de 2016). Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *Eur Heart J*, 1651-1658. doi:10.1093/eurheartj/ehw019
- Hüser, J., Bers, D. M., & Blatter, L. A. (May de 1998). Subcellular properties of $[Ca^{2+}]_i$ transients in phospholamban-deficient mouse ventricular cells. *The American Journal of Physiology*, 274(5), 1800-1811. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1800
- Jaquenod De Giusti, C., Palomeque, J., & Mattiazzi, A. (03 de Enero de 2022). Ca^{2+} mishandling and mitochondrial dysfunction: a converging road to prediabetic and diabetic cardiomyopathy. *European Journal of Physiology*, 33(474), 34-61. doi:/doi.org/10.1007/s00424-021-02650-y
- Jiang, D., Xiao, B., Yang, D., Wang, R., Choi, P., Zhang, L., & Cheng, H. (16 de Julio de 2004). RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca^{2+} release (SOICR). *Cardiovascular Research*, 101(35), 13062-13067.
- Kanaporis, G., & Blatter, L. (27 de Febrero de 2015). The Mechanisms of Calcium Cycling and Action Potential Dynamics in Cardiac Alternans. *Circulation Research*, 116(5), 846-856. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305404
- Kawase, Y., & Hajjar, R. J. (29 de Jul de 2008). The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 5(9), 554-565. doi:10.1038/ncpcardio1301
- Kenneth, L., & Rosebaum, D. S. (2008). Mechanisms and potential therapeutic targets for ventricular arrhythmias associated with impaired cardiac calcium cycling. *Journal and Molecular Cellular and Cardiology*, 44, 31-43.
- Kho C, L. A. (2015). Small-molecule activation of SERCA2a SUMOylation for the treatment of heart failure. *Nat Commun*, 6, 7229-.
- Köhler, A. C., Sag, C. M., & Maier, L. S. (Agosto de 2014). Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 73, 92-102. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.03.001. Epub 2014 Mar 11.
- Kohlhaas, M., Zhang, T., Seidler, T., Zibrova, D., Dybkova, N., Steen, A., . . . Maier, L. S. (22 de Dic de 2005). Increased Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak but Unaltered Contractility by Acute CaMKII Overexpression in Isolated Rabbit Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 98, 235-244. doi:10.1161/01.RES.0000200739.90811.9f

- Kornyejev, D., Petrosky, A., Zepeda, B., Ferreiro, M., Knollmann, B., & Escobar, A. (2012). Calsequestrin 2 deletion shortens the refractoriness of Ca²⁺ release and reduces rate-dependent Ca²⁺-alternans in intact mouse hearts. *J Molecular Cell Cardiology*, *52*, 21-31.
- Kranias, E., & Hajjar, R. (8 de Jun de 2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulator. *Circulation Research*, 1646-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259754
- Kryshtal, D. O., Gryshchenko, O., Gomez-Hurtado, N., & Knollmann, B. (7 de Marzo de 2015). Impaired calcium-calmodulin-dependent inactivation of Cav1.2 contributes to loss of sarcoplasmic reticulum calcium release refractoriness in mice lacking calsequestrin 2. *Journal Molecular Cell Cardiology*, *82*, 75 - 83. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.02.027
- Kwong, J. Q., Lu, X., Correll, R. N., Schwaneckamp, J. A., Vagnozzi, R. J., Sargent, M. A., . . . Molkentin, J. D. (7 de Jul de 2015). The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *12*(1), 15-22. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.002
- Kwong, J., Lu, X., Correll, R., Schwaneckamp, J., Vagnozzi, R., Sargent, M., . . . Molkentin, J. (2015). The mitochondrial calcium uniporter selectively matches metabolic output to acute contractile stress in the heart. *Cell Rep*, *12*, 15-22.
- LA, G., M, S., Y, R., M, K., CA, V., & J., D. (2011). Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circulation Arrhythm & Electrophysiol*, *4*, 947-957.
- Laemmli, U. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lai, L., & Qiu, H. (17 de Oct de 2020). The physiological and pathological roles of mitochondrial calcium uptake in heart. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20). doi:10.3390/ijms21207689
- Lam, C. K., Zhao, W., Liu, G.-S., Gardner, G., Adly, G., & Kranias, E. G. (24 de Nov de 2015). HAX-1 regulates cyclophilin-D levels and mitochondria permeability transition pore in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *47*(112), 6466-6475. doi:10.1073/pnas.1508760112
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.*, *61*, 291-332. doi:https://doi.org/10.1007/BF01812150
- Lascano, E., Negroni, J., Vila Petroff, M., & Mattiazzi, A. (2017). Impact of RyR2 potentiation on myocardial function. *American journal of physiology. Heart*

and circulatory physiology, 312(6), 1105-1109.
doi:10.1152/ajpheart.00855.2016

- Lascano, E., Said, M., Vitonne, L., Mattiazzi, A., Mundina-Weilenmann, C., & Negroni, J. (2013). Role of CaMKII in post acidosis arrhythmias: a simulation study using a human myocyte model. *J Molecular Cell Cardiology*, 60, 172-183.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Laitinen, P. J., Reiken, S. R., Deng, S.-X., Cheng, Z., . . . Marks, A. R. (2004). Sudden Death in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia Associated With Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Leak. *Circulation. Basic Science Reports*, 2004(109), 3208-3214. doi:10.1161/01.CIR.0000132472.98675.EC
- Limpitikul WB, G. J. (2018). Bilobal model of Ca²⁺-dependent inactivation to probe the physiology of L-type Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol*, 150, 1688–1701.
- Liu OZ, L. W. (Enero de 2012). Does the Goldilocks Principle apply to calcium release restitution in heart cells? *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(1), 3-6. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.10.014.
- López Alarcón, M. M., Rodríguez, A., Felice, J. I., Medei, E., & Escobar, A. L. (3 de Junio de 2019). Phase 1 repolarization rate defines Ca²⁺ dynamics and contractility on intact mouse hearts. *Journal of General Physiology*, 151(6), 771-785. doi:10.1085/jgp.201812269
- Louch, W. E., Sheehan, K. A., & Wolska, B. M. (Septiembre de 2011). Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *Journal Molecular Cell Cardiology*, 51(3), 288-298. doi:10.1016 / j.yjmcc.2011.06.012
- Lukyanenko, V., Chikando, A., & Lederer, W. J. (Oct de 2009). Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), 1957-1971. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.011
- Luo, W., Grupp, I., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Doffy, J., . . . Kranias, E. (1994). . Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circulation Research*, 75, 401-409.
- Lyon, A. R., Babalis, D., Morley-Smith, A., M, H., A, S. B., G, F., . . . Harding, S. E. (2020). Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device- the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Ther*, 27(12), 579-590. doi:10.1038/s41434-020-0171-7

- MacDougall, L. K., Jones, L. R., & Cohen, P. (MARZO de 1991). Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem*, 3(196), 725-34. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb15871.x
- Mahajan A, S. D. (2008). Modifying L-type calcium current kinetics: consequences for cardiac excitation and arrhythmia dynamics. *Biophysical Journal*, 94, 411-423.
- Marx, S. O., Reiken, S., & Hisamatsu, k. Y. (12 de Mayo de 2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101, 365–376. doi:10.1016/S0092-8674(00)80847-8
- Mattiazzi, A., Bassani, R. A., Escobar, A. L., Palomeque, J., Valverde, C. A., Villa Petroff, M., & Bers, D. M. (2015). Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308(10), 1177-1191. doi:10.1152/ajpheart.00007.2015
- Mattiazzi, A., Bassani, R. A., Escobar, A. L., Palomeque, J., Valverde, C., Vila-Petroff, M., & Bers, D. (2015). Review: Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 308(10), 1177-1191. doi:10.1152/ajpheart.00007.2015
- Maxchelator Stanford. (2018). *Maxchelator*. Obtenido de <http://maxchelator.stanford.edu/webmaxc/webmaxclite115.htm>
- Mazzocchi, G., Sommese, L., Palomeque, J., Felice, J., Di Carlo, M., Fainstein, D., . . . Mattiazzi, A. (2016). Phospholamban ablation rescues the enhanced propensity to arrhythmias of mice with CaMKII-constitutive phosphorylation of RyR2 at site S2814. *Journal of Physiology*, 594(11), 3005-3030.
- Mela, L., & Seitz, S. (1979). Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods in Enzymology*, 55(1), 39-46. doi:10.1016/0076-6879(79)55006-x
- Ministerio de Salud. (2017). *Ministerio de Salud Argentina*. Recuperado el 2020, de <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>
- MinSalud, M. (2013). *Dirección Nacional de Promoción de la Salud y Control de enfermedades No transmisibles*. Recuperado el 27 de Mayo de 2018, de <http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/vigilancia/areas-de-vigilancia/mortalidad>

- Morciano, G., Bonora, M., Campo, G., Aquila, G., Rizzo, P., Giorgi, C., . . . Pinton, P. (2017). Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol*, 982(1), 169-189. doi:10.1007/978-3-319-55330-6_9
- Morciano, G., Maria Vitto, V. A., Bouhamida, E., Giorgi, C., & Pinton, P. (12 de May de 2021). Mitochondrial bioenergetics and dynamism in the failing heart. *11*(5), 436. doi:10.3390/life11050436
- Motayagheni, N. (2017). Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia. *MethodsX*, 4, 508-512. doi:10.1016/j.mex.2017.11.004
- Mozaffarian D, B. E. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics-2016. *A Report from the American Heart Association*, 133: e38-360.
- Mundiña-Weilenmann, C., Vittone, L., Ortale, M., de Cingolani, G. C., & Mattiazzi, A. (27 de Dec de 1996). Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *The Journal of biological chemistry*, 271(52), 61-70. doi:10.1074/jbc.271.52.33561
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (Apr de 2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiological Reviews*, 88(2), 581-609. doi:10.1152/physrev.00024.2007.
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., . . . Scorrano, L. (4 de Oct de 2016). Critical reappraisal confirms that mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11249-11254. doi:10.1073/pnas.1606786113.
- Negrone, J., Morotti, S., Lascano, E., Gomes, A., Grandi, E., Puglisi, J., & Bers, D. (2015). B-adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. *J Molecular Cell Cardiology*, 81, 162-175.
- Nicolaou P, R. P. (2009). Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research*, 104, 1012-1020.
- Noble, D. (2002). Modeling the heart- from genes to cells to the whole organ. *Science*, 295, 1678-1682.
- Obame, F. N., Plin-Mercier, C., Assaly, R., Zini, R., Dubois-Randé, J. L., Berdeaux, A., & Morin, D. (Jul de 2008). Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763

- [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *1*(326), 252-258. doi:10.1124/jpet.108.138008
- OMS. (2020). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/
- Ong, S., Samangouei, P., Kalkhoran, S., & Hausenloy, D. (14 de Nov de 2015). The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, *78*(1), 23-34. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.11.005
- Piper, H. M., Abdallah, Y., & Schäfer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity. *Cardiovascular Research*, *3*(61), 365-371. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.012
- Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Lemaire, C., Veksler, V., Garnier, A., . . . Joubert, F. (10 de May de 2013). Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Frontiers in Physiology*, *4*, 102. doi:10.3389/fphys.2013.00102
- Pitch E, D. S. (2006). Cardiac alternans do not rely on diastolic sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuations. *Circulation Research*, *99*, 740 - 748.
- Pitch E, Z. A. (2007). SparkMaster: automated calcium spark analysis with Image J. *JAm J Physiol Cell Physiol*, *293*, 1073-1081.
- Poláková, E., Illaste, A., Niggli, E., & Sobie, E. (2015). Maximal acceleration of Ca²⁺ release refractoriness by β -adrenergic stimulation requires dual activation of kinases PKA and CaMKII in mouse ventricular myocytes. *Journal Physiology*, *593*(6), 1495-1507.
- Porzio, M. A., & Pearson, A. M. (25 de Jan de 1977). Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate A-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, *490*(1), 27-34. doi:10.1016/0005-2795(77)90102-7
- Priori, S. G., & Wayne, C. (1 de April de 2011). Inherited dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Handling and Arrhythmogenesis. *Circulation Research*, *7*(108), 871-883.
- Prunier, F., Kawase, Y., Gianni, D., Scapin, C., Danik, S. B., Ellinor, P. T., . . . Del Monte, F. (5 de Aug de 2008). Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. *Circulation*, *118*(6), 614-624. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.770883

- Ramay, H. R., Jafri, M. S., Lederer, W. J., & Sobie, E. A. (2 de Junio de 2010). Predicting Local SR Ca²⁺ Dynamics during Ca²⁺ Wave Propagation in Ventricular Myocytes. *Biophys J*, 98(11), 2515-2523. doi:10.1016/j.bpj.2010.02.038
- Ramay, H., Liu, O., & Sobie, E. (1 de Septiembre de 2011). Recovery of cardiac calcium release is controlled by sarcoplasmic reticulum refilling and ryanodine receptor sensitivity. *Cardiovascular Research*, 91(4), 598-605. doi:10.1093/cvr/cvr143
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7), 3116-3120. doi:doi.org/10.1073/pnas.76.7.3116
- Respress, J. L., Van Oort, R. J., Li, N., Rolim, N., Dixit, S. S., deAlmeida, A., . . . Wehrens, X. H. (25 de May de 2012). Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circulation Research*, 110(11), 1474-1483. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268094
- Rodriguez, J. S., Rueda, J. O., Salas, M., Becerra, R., Carlo, M. N., Said, M., . . . Mattiazzi, A. (Abril de 2014). Increased Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Expression/Activity Constitutes a Point of Inflection in the Progression to Heart Failure of Hypertensive Rats. *PLoS One*, 9(4), 96400. doi:10.1371/journal.pone.0096400
- Rovetti, R., Cui, X., Garfinkel, A., Weiss, J., & Qu, Z. (2010). Spark-induced sparks as a mechanism of intracellular calcium alternans in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 106, 1582-1591.
- SAC. (8 de Agosto de 2018). *Sociedad Argentina de Cardiología*. Obtenido de <https://www.sac.org.ar/actualidad/muerte-subita-mas-incidencia-en-adolescentes-futbolistas/>
- SAC, S., SUC, S., & Colaborador, C. (2012). Consenso de prevención primaria y secundaria de muerte súbita. *Revista Argentina de Cardiología*, 80, 165-184.
- Said, M., Becerra, R., Palomeque, J., Rinaldi, G., Kaetzel, M., Diaz-Sylvester, P., & et al. (2008). Increased intracellular Ca²⁺ and SR Ca²⁺ load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiology (Heart Circ Physiology)*, 295, 1669-1683.

- Said, M., Becerra, R., Valverde, C. A., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., Mundiña-Weilenmann, C., . . . Mattiazzi, A. (Dec de 2011). Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mollecular Cardiology*, 6(51), 936-944. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.010
- Said, M., Vittone, L., Mundina-Weilenmann, C., Ferrero, P., Kranias, E., & Mattiazzi, A. (Sept de 2003). Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(3), 1198-1205. doi: 10.1152/ajpheart.00209.2003
- Salas, M. A., Valverde, C. A., Sánchez, G., Said, M., Rodriguez, J., Portiansky, E. L., . . . Mattiazzi, A. (2010). The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular Cellular and Cardiology*, 6(48), 1298-1306. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.12.015.
- Sander, P., Gudermann, T., & Schredelseker, J. (2021). A Calcium Guard in the Outer Membrane: Is VDAC a Regulated Gatekeeper of Mitochondrial Calcium Uptake? *International Journal of molecular Sciences*, 22(2), 946. doi:10.3390/ijms22020946
- Sato, D., Uchinoumi, H., & Bers, D. M. (5 de Jun de 2021). Increasing SERCA function promotes initiation of calcium sparks and breakup of calcium waves. *Journal Physiology*, 599(13), 3267–3278. doi:10.1113/JP281579
- Scaduto Jr, R. C., & Grotyohann, L. W. (Jan de 1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biphsical Journal*, 1(76), 469-477. doi:10.1016/S0006-3495(99)77214-0
- Scaduto Jr, R. C., & Grotyohann, L. W. (jAN de 1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*, 1(76), 469-477. doi:10.1016/S0006-3495(99)77214-0
- Seidlmayer, L. K., Kuhn, J., Berbner, A., Arias-Loza, P.-A., Williams, T., Kaspar, M., . . . Ritter, O. (5 de Ag de 2016). Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca²⁺ uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 112(1), 491-501. doi:10.1093/cvr/cvw185

- Sigma Aldrich. (s.f.). *Merck Productos Argentina*. Recuperado el 06 de 2018, de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/f0888?lang=es®ion=AR>
- Sobie, E. A., & Lederer, W. J. (Febrero de 2012). Dynamic local changes in sarcoplasmic reticulum calcium: physiological and pathophysiological roles. *Journal Molecular Cellular Cardiology*, 52(2), 304-311. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.024
- Sobie, E. A., Song, L.-S., & Lederer, W. (1 de Junio de 2005). Local recovery of Ca²⁺ release in rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 565(2), 441-447. doi:10.1113/jphysiol.2005.086496
- Soller, C., & Cannell, M. B. (19 de Feb de 1999). Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circulation Research*, 3(84), 266-275. doi:10.1161/01.res.84.3.266.
- Sondergaard, M. T., Tian, X., Liu, Y., Wang, R., Chazin, W. J., Chen, S., & Overgaard, M. T. (23 de Octubre de 2015). Arrhythmogenic Calmodulin Mutations Affect the Activation and Termination of Cardiac Ryanodine Receptor-mediated Ca²⁺ Release. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 26151-26562. doi:10.1074/jbc.M115.676627
- Sossalla, S., Fluschnik, N., Schotola, H., Ort, K. R., Neef, S., Schulte, T., . . . Maier, L. S. (29 de Oct de 2010). Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circulation Research*, 107(9), 1150-1161. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.220418
- Stokke MK, H. K. (2010). Reduced SERCA2abundance decreases the propensity for Ca²⁺ wave development in ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 86, 63-71.
- Sufen Wang, R. J., Chelu, M. G., Sarma, S., Sood, S., Wang, S., Van Oort, R. J., & Skapura, D. G. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *The journal of clinical investigation*, 119(7), 1940-1951. doi:10.1172/jci37059.
- Sun, B., Wei, J., Zhong, X., Guo, W., Yao, J., Wang, R., . . . Chen, W. (9 de Julio de 2018). The cardiac ryanodine receptor, but not sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase, is a major determinant of Ca²⁺ alternans in intact mouse hearts. *Journal of Biological Chemistry*, On(Line), 1-26. doi: 10.1074/jbc.RA118.003760

- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stéfani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., . . . Rizzuto, R. (18 de Dec de 2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of Cell Biology*, 175(6), 901-911. doi:10.1083/jcb.200608073
- Szentesi, P., Pignier, C., Egger, M., Kranias, E. G., & Niggli, E. (15 de Octubre de 2004). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling controls recovery from Ca²⁺-induced Ca²⁺ release refractoriness in heart muscle. *Circulation Research*, 95(8), 807-813. doi:10.1161/01.RES.0000146029.80463.7d
- Talukder MA, K. A. (2007). Expression of SERCA isoform with faster Ca²⁺ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca²⁺ handling and decreases myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, 2418-2428.
- Talukder, M. H., Kalyanasundaram, A., Zhao, X., Zuo, L., Bhupathy, P., Babu, G. j., . . . Zweier, J. L. (oCT de 2007). Expression of SERCA isoform with faster Ca²⁺ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca²⁺ handling and decreases myocardial infarction. 4(293), 2418-2428. doi:10.1152/ajpheart.00663.2007
- Ter Keurs, H. E., & Boyden, P. A. (Abril de 2007). Calcium and Arrhythmogenesis. 87(2), 457-506. doi: 10.1152/physrev.00011.2006
- Terentyev, D., Kubalova, Z., Valle, G., Nori, A., Vedamoorthyrao, S., Terentyeva, R., . . . Gyorke, S. (9 de Mayo de 2008). Modulation of SR Ca Release by Luminal Ca and Calsequestrin in Cardiac Myocytes: Effects of CASQ2 Mutations Linked to Sudden Cardiac Death. *Biophysical Journal*, 95(4), 2037-2048. doi:10.1529/biophysj.107.128249
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Valdivia, H. H., Escobar, A. L., & Györke, S. (2002). Luminal Ca²⁺ Controls Termination and Refractory Behavior of Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 2002(91), 414-420. doi:10.1161/01.RES.0000032490.04207.BD
- ThermoFisher Scientific. (s.f.). *Catalogo Invitrogen*. Recuperado el 06 de 2018, de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F1201>
- Tusscher, T. K., & Panfilov, A. V. (1 de Septiembre de 2006). Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *American journal of physiology*, 291, H1088 –H1100. doi:10.1152/ajpheart.00109.2006
- Vafiadaki E, S. D.-K. (16 de Marz de 2007). Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function. *J Mol Biol.*, 367(1), 65-79. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.057

- Valverde, C. (2008). *Rol de la Fosforilación de proteínas que manejan el calcio intracelular en el atontamiento cardíaco y el tamaño del infarto*. Director: Mattiazzi A. Co-Director: Mundiña C.: Facultad de ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Valverde, C. A., Korniyev, D., Ferreiro, M., Petrosky, A. D., Mattiazzi, A., & Escobar, A. (Mar de 2010). Transient Ca depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovascular Research*, *85*(4), 671-680. doi:10.1093/cvr/cvp371
- Valverde, C. A., Mundiña-Weilenmann, C., Reyes, M., Kranias, E. G., Escobar, A. L., & Mattiazzi, A. (1 de May de 2006). Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca²⁺ after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart. *Cardiovascular Research*, *70*(2), 335-345. doi:10.1016/j.cardiores.2006.01.018.
- Valverde, C., & Mattiazzi, A. (Mar de 2022). Increasing SR Ca uptake: a double-edged sword. *J Physiology*, *600*(6), 1533-1534. doi:10.1113/JP282659
- Valverde, C., Mazzocchi, G., Di Carlo, M., Ciocci, A., Salas, N., Ragone, M., . . . Mattiazzi, A. (1 de Mar de 2019). Ablation of PLN rescues reperfusion arrhythmias but exacerbates myocardium infarction in hearts with Ca²⁺/calmodulin kinase II constitutive phosphorylation of ryanodine receptors. *Cardiovascular Research*, *115*(3), 556-569. doi:10.1093/cvr/cvy213
- Van Oort, R. J., McCauley, M. D., Dixit, S. S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J. L., . . . Wehrens, X. H. (15 de Dic de 2010). Ryanodine Receptor Phosphorylation by CaMKII Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice with Heart Failure. *Circulation Research*, *122*(25), 2669-2679. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982298
- Vassilakopoulou, V., Calver, B. L., Thanassoulas, A., Beck, K., Hu, H., Buntwal, L., . . . Nomikos, M. (November de 2015). Distinctive malfunctions of calmodulin mutations associated with heart RyR2-mediated arrhythmic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1850*(11), 2168-2176. doi:10.1016/j.bbagen.2015.07.001
- Venetucci, L., Trafford, A., & Eisner, D. (2007). Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic Ca²⁺ waves: threshold Ca²⁺ content is required. *Circulation Research*, *100*, 105-111.
- Vila-Petroff, M., Salas, M., Said, M., Valverde, C., Sapia, L., Portiansky, E., & et al. (2007). CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in

- irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Reserach*, 73, 689-698.
- Vittone, L., Mundina-Weilenmann, C., Said, M., Ferrero, P., & Mattiazzi, A. (Jan de 2002). Time Course and Mechanisms of Phosphorylation of Phospholamban Residues in Ischemia-reperfused Rat Hearts. Dissociation of Phospholamban Phosphorylation Pathways. *Jpurnal of molecular and cellular cardiology*, 34(1), 39-50. doi:10.1006/jmcc.2001.1488
- Voigt, N., Li, N., Wang, Q., Wang, W., Trafford, A., Abu-Taha, I., . . . Dobrev , D. (1 de Mayo de 2012). Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-leak and Increased Na⁺-Ca²⁺-Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients with Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation*, 125(Issue 17), 2059-2070. doi: 10.1161 / CIRCULATIONAHA.111.067306
- Wegener, A. D., Simmerman, H. K., Lindemann, J. P., & Jones, L. R. (1989). Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chemical*, 19(264), 11468-74.
- Wehrens, X., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., Vest, J. A., Wronska, A., & Marks, A. R. (17 de Jan de 2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(3), 511-608. doi:10.1073/pnas.0510113103
- Wehrens, X., Lehnart, S., Reiken, S., & Marks, A. (2 de Abril de 2004). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation Research*, 94(6), 61-70. doi:10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2
- Weiss JN, N. M. (2011). Alternans and arrhythmias: from cell to heart. *Circulation Research*, 108, 98-112.
- Xu, H.-X., Cui, S.-M., Zhang, Y.-M., & Ren, J. (Oct de 2020). Review: Mitochondrial Ca²⁺ regulation in the etiology of heart failure: physiological and pathophysiological implications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(10), 1301-1309. doi:10.1038/s41401-020-0476-5
- Yang Y, Z. W. (2006). Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* , 291, 3065-3075.
- Yuan, W., & Bers, D. M. (1994). Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *The American journal of physiology*, 267, H982-93. doi:10.1152/ajpheart.1994.267.3.H982

- Zhou X, F. G. (2007). Overexpression of histidine-rich Ca-binding protein protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Cardiovascular Research*, 75, 487-497.
- Zhu, W., Woo, A. Y.-H., Yang, D., Cheng, H., Crow, M. T., & Xiao, R.-P. (6 de Apr de 2007). Activation of CaMKII δ is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem*, 14(282), 10833-10839. doi:10.1074/jbc.M611507200
- Zima, A. V., Picht, E., Bers, D. M., & Blatter, L. A. (10 de Octobre de 2008). Termination of Cardiac Ca²⁺ Sparks Role of Intra-SR [Ca²⁺], Release Flux, and Intra-SR Ca²⁺ Diffusion. *Circulation Research*, 105-115. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.183236

FACULTAD DE
CIENCIAS MÉDICAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

POR: MG. IB. ALEJANDRA CELY-ORTIZ
PHD EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
UNIVERSIDAD DE LA PLATA
ARGENTINA
2022