Centro de Investigaciones Cardiovasculares

Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET.

Tesis doctoral

Modulación farmacológica de proteínas del retículo sarcoplasmático como estrategia para reducir la cardiotoxicidad de los inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa

Doctorando: María Florencia Racioppi

Director: Martín Vila Petroff

Codirector: Luis Alberto Gonano

Año 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca para poder doctorarme. También a la Facultad de Ciencias Médicas, que me otorgó el título de grado y me posibilitó no solo ejercer la medicina, sino también iniciarme en la ciencia. Muchas gracias al Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC) y a sus autoridades, por abrirme sus puertas para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.

Mi más profundo agradecimiento a mi director, el Dr. Martín Vila Petroff, por recibirme y acompañarme para poder hacer esta tesis, por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciarme en este hermoso mundo científico.

A mi codirector, el Dr. Luis Gonano, por guiarme todos estos años en el trabajo de laboratorio, por tu tranquilidad para sentarte conmigo a explicarme las veces que fuera necesario y para discutir resultados, por tus ganas de enseñarme y de transmitirme tus conocimientos. Gracias por motivarme a seguir adelante cuando los resultados no acompañan. Admiro enormemente tus ganas constantes de aprender, tu gran entusiasmo y tu pasión por la ciencia. Es un placer enorme trabajar con vos.

Agradezco a todos los integrantes del CIC, ya sean investigadores, becarios, personal de apoyo, secretarios y otros con quienes he compartido estos años en el CIC y que día tras día ponen su granito de arena para hacer ciencia de calidad y para ayudarte en lo que necesites. Mas allá de la excelente calidad científica del CIC, es la increíble calidad humana de todos ustedes lo que hace de este centro sea un lugar tan lindo. Un agradecimiento especial a Mónica Rando, Caro Ciancio y Lucia Pagola, que me ayudaron día a día en los experimentos de este trabajo de tesis. Gracias también a los integrantes pasados de nuestro laboratorio, Male y Nacho, quienes estuvieron involucrados en este trabajo. Mi más sincero agradecimiento a todos los becarios, a quienes les consulto todos los días mis dudas experimentales (tal vez demasiado) y con quienes compartimos también charlas personales y momentos lindos.

A toda mi familia, a los que están y a los que ya no están físicamente pero que te acompañan siempre: a la Bela y al Belo, a mis tíos María Julia, Alito, Ernesto y Enrique, a mis primas Rochi, Delfi, Jose y Ernestina.

A Vero y Valen, las hermanas que nunca tuve pero que son casi lo mismo. Gracias por las charlas largas de los temas más locos, por los chistes, las risas y los viajes compartidos, y por hacer que todos los días sean mucho más hermosos.

A Lu y Ro, mis amigas incondicionales con las que compartimos tantos años, ya casi toda la vida. Ellas están ahí siempre, apoyándote y acompañándote, en las buenas y en las malas. Gracias por absolutamente todo. Las quiero un montón.

A mis amigos, a todos ellos, los de la vida, los del hospi, los del talktime, los del club. Gracias por lo compartido todos estos años, por las juntadas, las comilonas, las charlas, los consejos y la buena onda de siempre. Son mi cable a tierra cuando las cosas no salen como uno quiere, y día a día me enseñan a encontrar las cosas lindas de la vida.

Finalmente, pero muy especialmente, quiero agradecer a mi mamá, Marina. Te agradezco eternamente por tu confianza y por tu apoyo incondicional en todo lo que quiera hacer, por tus palabras de aliento y por darme fuerza y motivación para seguir adelante. Sos un ejemplo de valentía, de honradez y de perseverancia, un gran ejemplo de vida y la persona más noble que conozco. Te dedico esta tesis especialmente a vos.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 9

1. Aspectos generales del funcionamiento cardíaco 9

2- Manejo del calcio intracelular en el cardiomiocito 10

2.a Acoplamiento éxito-contráctil 10

2.b Organelas y proteínas involucradas en el AEC 12

2.b.1 Membrana plasmática 12

Na^+/K^+ ATPasa 12

Canal de calcio tipo L 14

Intercambiador de sodio y calcio (Intercambiador Na^+/Ca^{2+} o NCX) 14

2.b.2 Retículo Sarcoplasmático (RS) o SR-Ca^{2+} -ATPasa 15

Bomba de Ca^{2+}del RS (SERCA) 15

Receptor de rianodina (RyR) 16

2.b.3 Mitocondria 18

3- Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II (CaMKII) 19

3.a Generalidades de CaMKII 19

3.b Mecanismos de activación y regulación de CaMKII 20

3.c Efectos fisiológicos y patológicos de CaMKII sobre el manejo del calcio en el corazón 22

4. Inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa: usos actuales y limitaciones 24

4.a Alteraciones en el manejo del calcio intracelular como determinantes de mecanismos arritmogénicos durante el tratamiento con inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa 26

4.a.1 Rol de las proteínas del RS: importancia del RyR2 y de SERCA 26

4.a.2 Rol de la enzima CaMKII como mediadora de mecanismos arritmogénicos durante el tratamiento con digitálicos 28

4.b Alteraciones en el manejo del calcio intracelular como determinantes de muerte celular de cardiomiocitos durante el tratamiento con inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa 29

4.b.1 Mecanismos celulares y moleculares asociados a la muerte celular 29

4.b.2 Rol de CaMKII en la muerte de cardiomiocitos inducida por inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa 29

5. Istaroxime como fármaco emergente 31
6. Estabilizadores farmacológicos del RyR2: Carvedilol y VK-II-86 33
HIPÓTESIS DE TRABAJO 36
OBJETIVOS 36
1. Objetivo general 36
2. Objetivos específicos 37
MATERIALES Y MÉTODOS 39
1. Aspectos generales. Cuidado y uso de animales 39
2. Aislamiento de miocitos cardíacos 39
3. Registro de parámetros mecánicos en miocitos aislados 42
4. Detección de la liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplásmico por microscopía confocal 44
5. Inmunodetección proteica por análisis de western blot 46
6. Estudio de la viabilidad celular en cultivo celular 47
7. Evaluación de la muerte celular por apoptosis 49
8. Análisis estadístico 50
RESULTADOS 51
1. Istaroxime 51
1. 1 El tratamiento agudo con 10 μM de istaroxime aumenta la contractilidad de forma semejante a 2 μM de ouabaína 51
1.2 El tratamiento con istaroxime no induce la muerte de cardiomiocitos 54
1.3 El tratamiento agudo con istaroxime en dosis terapéuticas no induce activación de CaMKII 57
1.4 Dosis equiinotrópicas de ouabaína e istaroxime difieren en la liberación proarritmogénica de calcio 59
1.5 El tratamiento con istaroxime impide la propagación de las ondas de calcio 62
1.6 El efecto de ouabaína e istaroxime difiere aún en ausencia de fosfolamban 64
2. Estabilización del RyR2: VK-II-86 67
2.1 La estabilización del RyR2 no modifica el efecto inotrópico positivo de los digitálicos 67
2.2 La estabilización del RyR2 con VK-II-86 reduce el sustrato arritmogénico inducido por ouabaína sin afectar su efecto inotrópico positivo 70
2.3 VK-II-86 no afecta la activación de CaMKII 73

2.4 Carvedilol y VK-II-86 previenen la muerte de cardiomiocitos inducida por ouabaína 75

DISCUSIÓN 78

I. Istaroxime como alternativa farmacológica a los digitálicos 79

I.a Istaroxime se asocia a menor cardiotoxicidad directa sobre cardiomiocitos y no induce la activación de CaMKII 79

I.b Mecanismos subcelulares determinantes del menor potencial arritmogénico del istaroxime 84

I.b.1 La falta de activación de CaMKII podría asociarse a menor liberación arritmogénica de calcio 85

I.b.2 La recaptación acelerada de calcio por istaroxime impide la propagación de ondas de calcio 88

1.b.3 El menor perfil arritmogénico de istaroxime no depende de la disociación SERCA-PLB 89

I.c Potencial valor clínico de la utilización de istaroxime 91

2. Estabilización farmacológica de los RyR2 como estrategia para disminuir la cardiotoxicidad de los digitálicos 92

2.a Estabilización de los RyR2 con VK-II-86 y prevención de las ondas arritmogénicas de calcio 93

2.b La estabilización farmacológica de los RyR2 protege a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por ouabaína 95

3. Limitaciones y perspectivas a futuro 96

CONCLUSIONES Y POSIBLES IMPLICANCIAS CLÍNICAS 98

REFERENCIAS 99

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: acoplamiento excitación-contracción o éxito-contráctil

ATP: trifosfato de adenosina

BAX: proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: célula-B CLL/linfoma 2

Ca^{2+}: calcio

$[Ca^{2+}]_i$: concentración de calcio intracelular

CaM: calmodulina

Ca^{2+}-CaM: complejo calcio-calmodulina

CaMKII: quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II

p-CaMKII: quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II fosforilada

oxi-CaMKII: quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II oxidada

CICR: liberación de Ca^{2+} inducida por calcio (calcium induced calcium release)

Cit C: citocromo C

Cl_2Ca: cloruro de calcio

ClK: cloruro de potasio

ClNa: cloruro de sodio

DAD: post-despolarización tardía (delayed after depolarization)

DMSO: dimetilsulfóxido

DPHR o LLTC: receptor de dihidropiridina o canal de Ca^{2+} tipo L

EGTA: ácido etilenglicol tetracético (agente quelante de calcio)

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GC: glucósidos cardiotónicos (también denominados digitálicos)

Hepes: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N´-2-etanosulfónico

IC: insuficiencia cardíaca

I/R: isquemia/reperfusión

MCU: uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (mitochondrial calcium uniporter)

min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

µM: micromolar

Na^+: sodio

$[Na^+]_i$: concentración de sodio intracelular

NaOH: hidróxido de sodio

NaH_2PO_4: sodio fosfato monobásico monohidratado

$MgSO_4$: sulfato de magnesio heptahidratado

NCX: intercambiador Na^+/Ca^{2+}

NKA: bomba de sodio-potasio o Na^+/K^+ ATPasa

O2: oxígeno

PA: potencial de acción

PKA: proteína quinasa A

PKG: proteína quinasa G

PLN: fosfolamban

PMCA: Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática

PTPM: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

RyR: receptor de rianodina

RyR2: receptor de rianodina tipo II o cardíaco

RS: retículo sarcoplasmático

SEM: error estándar

SERCA: bomba de transporte activo de Ca^{2+} del RS o Ca-ATPasa del RS

TnC: troponina C

INTRODUCCIÓN

Los glucósidos cardíacos, también llamados glucósidos cardiotónicos o más comúnmente digitálicos, son una familia de fármacos inhibidores de bomba de sodio-potasio ATPasa de la membrana plasmática (NKA) que han sido utilizados ampliamente como terapia para pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) debido a su capacidad de aumentar la fuerza contráctil del corazón. Actualmente, su uso es limitado, al no haber demostrado beneficio clínico a largo plazo [1] y porque se asocian a efectos adversos graves en forma de arritmias y muerte de cardiomiocitos [2,3]. Estas limitaciones motivan la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas con un mejor perfil de seguridad.

En este trabajo de tesis se estudian dos estrategias diferentes para disminuir la toxicidad inducida por digitálicos: por un lado, la inhibición de NKA con la estimulación simultánea de la actividad de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCA), y por otro, la estabilización del receptor de rianodina tipo 2 (RyR2).

Las próximas secciones describirán los aspectos relacionados al funcionamiento contráctil del miocardio, así como los antecedentes conocidos sobre los digitálicos, que dan sustento a la hipótesis y objetivos planteados en este trabajo.

1. Aspectos generales del funcionamiento cardíaco

La función principal del corazón es bombear suficiente sangre para satisfacer la demanda metabólica del cuerpo. Para ello, el órgano dispone de células especializadas para contraerse, llamadas cardiomiocitos.

El funcionamiento del corazón consta de dos etapas que en conjunto se denominan ciclo cardíaco. En la primera, llamada sístole, el músculo ventricular se contrae y desarrolla la fuerza suficiente que permite la expulsión de sangre. En la segunda, denominada diástole, este se relaja permitiendo el llenado con sangre que luego será bombeada nuevamente.

Ya desde la década de los 50 se conoce que este ciclo es el resultado de oscilaciones en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en el cardiomiocito, que hacen que sea suficientemente alta en sístole y baja en diástole [4]. Se denomina "manejo del Ca^{2+}" (Ca^{2+} handling en inglés) al conjunto de procesos que participan en la dinámica del Ca^{2+} intracelular. La regulación estricta de la $[Ca2^{+}]_i$ es fundamental para el buen funcionamiento del corazón. Para ello, las células cardíacas contienen diversas bombas, canales e intercambiadores, proteínas de unión al Ca^{2+} y enzimas. El mismo Ca^{2+} juega un papel central en la regulación de muchos de éstos, ya sea de forma directa o indirecta a través de la activación de enzimas y proteínas reguladoras como la enzima Ca^{2+}-calmodulina quinasa tipo II (CaMKII). El funcionamiento correcto, la ubicación precisa y la disposición espacial de todos ellos son indispensables para un buen funcionamiento cardíaco. En contraste, en condiciones patológicas existen alteraciones en el manejo del Ca^{2+} que se asocian a disfunción contráctil, hipertrofia cardíaca, arritmias y muerte celular [5,6].

A continuación, se describirá el manejo del Ca^{2+} en la célula cardíaca, así como las estructuras, organelas y proteínas participantes.

2- Manejo del calcio intracelular en el cardiomiocito

2.a Acoplamiento éxito-contráctil

El acoplamiento éxito-contráctil (AEC) es un término que fue descripto en la década del 1950 [7] y que hace referencia a la serie de eventos que suceden desde la producción del potencial de acción (PA) hasta la contracción del corazón [8,9]. En otras palabras, este proceso vincula la actividad eléctrica de la célula cardíaca a la actividad mecánica. Tal como se describirá, el Ca^{2+} desempeña un papel crucial en este proceso.

El aparato contráctil del cardiomiocito se organiza en unidades estructurales llamadas sarcómeros, en cuya composición se destacan las proteínas actina y la miosina. Para que ocurra la contracción, el Ca^{2+} se une a la troponina C (TnC) y conduce a un cambio conformacional que permite la unión y el deslizamiento de

los filamentos finos de actina sobre los filamentos gruesos de miosina. Este deslizamiento da como resultado el acortamiento celular y el desarrollo de fuerza y presión dentro de los ventrículos, lo que provoca la eyección de sangre. Por lo tanto, la fuerza desarrollada depende de la cantidad de Ca^{2+} unida a la TnC. Esta a su vez será una función tanto de la magnitud como de la duración del aumento del Ca^{2+} en el citosol.

Durante la fase de meseta del PA, una pequeña cantidad de Ca^{2+} ingresa a la célula a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L activados por voltaje (LTCC), también llamados receptores de dihidropiridina (DPHR). La presencia de invaginaciones de la membrana plasmática, denominadas túbulos T, posibilitan que cada LTCC esté yuxtapuesto a un grupo de receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) del retículo sarcoplasmático (RS), por lo que el Ca^{2+} que ingresa a la célula se une a los receptores RyR_2 y los abre [10]. Esto desencadena una liberación aún mayor de Ca^{2+} desde el RS mediante un mecanismo amplificador denominado "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}" (calcium induced calcium release o CICR en inglés) [11,12]. El resultado es una liberación masiva de Ca^{2+} que se conoce como "transitorio de Ca^{2+}", dado por la suma de las liberaciones individuales en cada grupo de RyR2. Esta liberación rápida y sincronizada es de importancia crítica para la actividad contráctil cardíaca.

Por el contrario, para que ocurra la relajación, la $[Ca^{2+}]_i$ debe disminuir, permitiendo que el Ca^{2+} unido a la TnC se separe de la misma. Esto se logra mediante diversos mecanismos, 1) la finalización de la entrada de Ca^{2+} a través de los LTCC 2) la finalización de la liberación de Ca^{2+} del RS mediante el cierre de los RyR2 3) el bombeo activo de Ca^{2+} al RS a través de la Ca-ATPasa del RS (SERCA) y a la mitocondria a través del uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) 4) la extrusión de Ca^{2+} fuera de la célula por el intercambiador sodio-calcio (NCX) y por la Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática (PMCA). De todos estos, el más importante es el mediado por SERCA, que recapta gran parte del Ca^{2+} liberado a través de un proceso activo que requiere energía y que permite restablecer el Ca^{2+} disponible en el RS para su uso durante el próximo ciclo contracción/relajación. La extrusión al espacio extracelular a través del NCX también representa una vía de

salida significativa, mientras que otros mecanismos restantes juegan un papel menos importante en la disminución del Ca^{2+} [9].

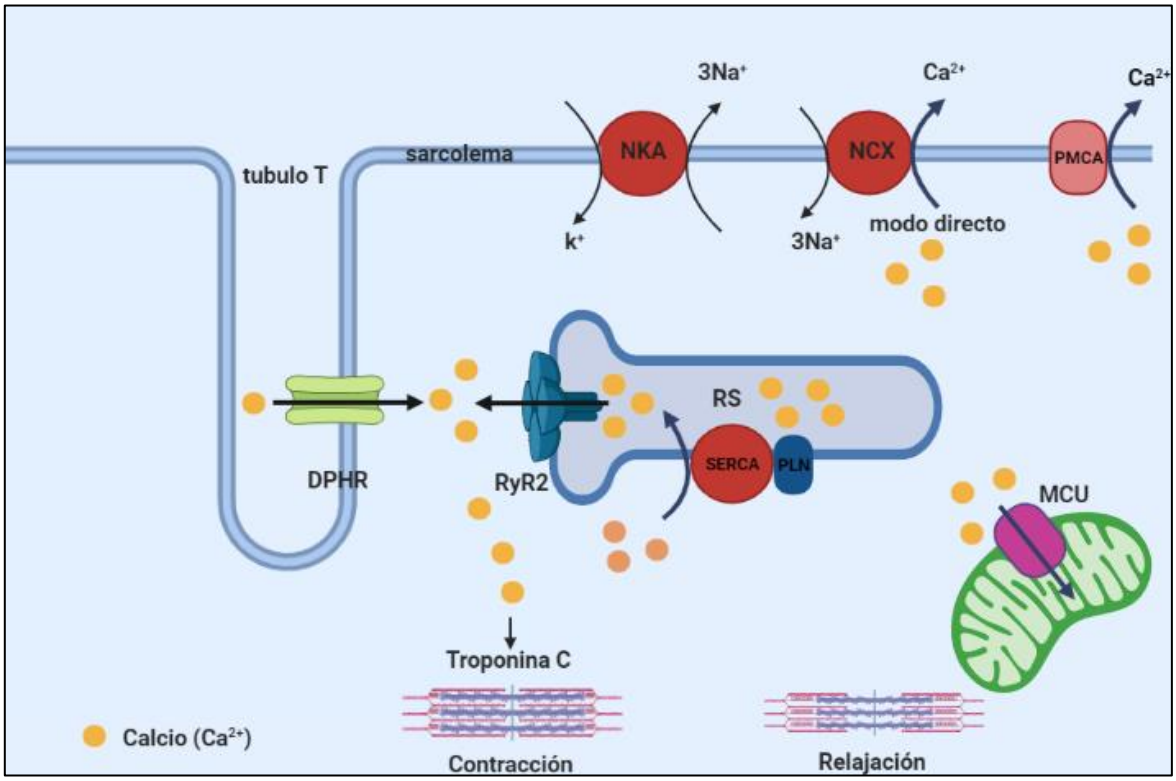

Figura 1: *Esquema donde se muestran los principales eventos del manejo de Ca^{2+} intracelular durante el AEC en miocitos cardíacos. Se muestran las principales proteínas involucradas: RS: retículo sarcoplásmico, DPHR: receptor de dihidropiridina o canal de Ca^{2+} tipo L, PLN: fosfolamban, SERCA: bomba de transporte activo de Ca^{2+} del RS, RyR2: receptor de rianodina, PMCA: Ca^{2+} ATPasa de membrana, NCX: intercambiador Na^{+}-calcio^{2+}, NKA: Na^{+}/K^{+} ATPasa. MCU: uniportador de Ca^{2+} mitocondrial.*

2.b Organelas y proteínas involucradas en el AEC

2.b.1 Membrana plasmática

Na^{+}/K^{+} ATPasa

La bomba de sodio-potasio o Na^{+}/K^{+} ATPasa (NKA) pertenece a la familia de ATPasas y participa en el transporte activo de Na^{+} y K^{+} a través de la membrana, utilizando como fuente de energía la hidrólisis de adenosin trifosfato (ATP) [13].

Estructuralmente es un hetero-dímero compuesto por dos subunidades que forman una estructura tetramérica integrada en la membrana. La subunidad α es la encargada de la función de transporte. En ésta se hallan los tres sitios de unión para Na^+, dos para K^+, sitios para el ATP y un sitio para la fosforilación por fosforo inorgánico (Pi). La subunidad β es necesaria para el ensamblaje, translocación y anclaje de la subunidad alfa en la membrana plasmática [14].

En condiciones normales esta bomba extruye 3 iones Na^+ hacia el espacio extracelular e ingresa 2 iones K^+ hacia el citoplasma por cada molécula de ATP hidrolizada. De este modo, se dice que la bomba es electrogénica porque provoca el transporte neto de una carga positiva hacia el exterior celular, creando un interior celular más negativo. Además de generar este gradiente eléctrico, el movimiento de iones permite mantener un gradiente químico de Na^+ y K^+, con concentraciones de K^+ más elevadas adentro de la célula y de Na^+ más elevadas afuera de la misma [15]. Este gradiente electroquímico es necesario para muchas funciones celulares. Entre ellas, permite el funcionamiento de los canales iónicos durante el PA y es utilizado para el transporte de moléculas como glucosa o aminoácidos.

Se sabe también que, independientemente de su rol en el transporte iónico, la NKA puede activar cascadas de señalización que intervienen en diferentes funciones celulares, como por ejemplo la cascada de las MAP quinasas y otras [16,17].

Por último y de gran importancia para esta tesis, la NKA de las células cardíacas es una diana para diversos fármacos como los glucósidos cardiotónicos y el istaroxime, que inhiben su actividad por unión a la subunidad alfa, promoviendo un aumento del Na^+ intracelular y de forma secundaria un aumento intracelular de Ca^{2+}. El mecanismo de acción de estos fármacos se explicará en detalle más adelante.

Canal de calcio tipo L

El canal de Ca^{2+} tipo L (LLTC) o también llamado receptor de dihidropiridinas (DDHR) es parte de la familia de canales de calcio dependientes de voltaje y es llamado tipo L por su lenta cinética de activación. Se localizan principalmente en el túbulo T, muy cerca de los canales del RyR2 en el RS. Estructuralmente está conformado por 5 subunidades: α1, α2, β, γ y δ. La subunidad α1 es la que detecta los cambios de voltaje y forma el poro de conducción del Ca^{2+}. Las subunidades restantes modulan las funciones del canal [18].

Los LLTC están cerrados en la célula en reposo y se abren en respuesta a la despolarización celular durante la fase 1 del PA, siendo responsables del ingreso inicial de Ca^{2+} durante la fase 2 (fase de meseta), para luego inactivarse progresivamente.

La función de este canal es regulada por varios mecanismos, incluyendo su inhibición mediada por el mismo Ca^{2+}, para limitar el ingreso de este ion a la célula [19]. Esta inhibición está mediada por la unión del Ca^{2+} a la proteína calmodulina (CaM) formando el complejo Ca^{2+}-CaM, que provoca un cambio conformacional e inhibición del canal. Por otro lado, su fosforilación por enzimas como la CaMKII aumenta su permeabilidad al Ca^{2+} [20].

Intercambiador de sodio y calcio (Intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} o NCX)

El intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) es una proteína de membrana que se localiza preferentemente a nivel del túbulo T [21], pero también en mitocondria, donde es denominado mNCX [22]. Existen tres isoformas: NCX1, NCX2 y NCX3, siendo la primera la más abundante en el corazón.

Media el transporte electrogénico de 3 iones Na^{+} por cada Ca^{2+} y se caracteriza por la reversibilidad en el sentido con el que ambos iones son transportados a través de la membrana, dependiendo del gradiente electroquímico de ambos iones y del potencial de membrana en un momento dado. De esta manera, puede actuar en modo directo (extruye Ca^{2+} de la célula e ingresa Na^{+}) [23] y en modo reverso (ingresa Ca^{2+} a la célula y extruye Na^{+}) [24]. Durante la mayor parte del tiempo,

cuando la célula está en reposo, la mayor concentración de Na^+ extracelular hace que el NCX funcione en modo directo extruyendo Ca2+ fuera de la célula. Con la llegada del potencial de acción cardíaco, la célula se despolariza por el gran aumento en la $[Na^+]i$. Esto causa la inversión del NCX, que ahora extruye Na^+ fuera de la célula e ingresa Ca^{2+} [23]. Este ingreso es poco importante para el AEC [24], ya que la gran mayoría del Ca^{2+} necesario proviene del RS. Además, debido al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ como resultado de su entrada a través del canal de calcio tipo L, el intercambiador vuelve a su modo directo rápidamente, sacando Ca^{2+} fuera de la célula. De esta manera, el NCX es uno de los mecanismos celulares que actúan para disminuir el Ca^{2+} citosólico en la diástole.

Los cambios patológicos en las concentraciones intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} pueden alterar su funcionamiento. Por ejemplo, la acumulación intracelular de Ca^+ más allá de un punto crítico hace que el NCX comience a introducir Na^+ en la célula y este proceso está implicado en la aparición de arritmias como las observadas durante la toxicidad por digitálicos, como se describirá más adelante [25].

2.b.2 Retículo Sarcoplasmático (RS) o SR-Ca^{2+} -ATPasa

Bomba de Ca^{2+}del RS (SERCA)

SERCA es una ATPasa de la membrana del RS cuya función es mediar el transporte activo de Ca^{2+} desde el citosol al interior del RS a expensas de la hidrólisis de ATP. Existen 5 isoformas de esta bomba codificadas por 3 genes, siendo SERCA2a la que se encuentra en células cardíacas.

Como ya se mencionó, el RS es el sitio principal de depósito de Ca^{2+} intracelular. La retoma de Ca^{2+} por el RS es fundamental para asegurar que haya Ca^{2+} disponible para su futura liberación. Además, después de la contracción cardíaca los niveles de Ca^{2+} deben disminuir para permitir la adecuada relajación muscular [26].

La función de SERCA2a está estrechamente regulada mediante la interacción con su proteína regulatoria fosfolamban (PLN) [27]. Esta última sólo se encuentra en células cardíacas y actúa como un inhibidor endógeno. Cuando PLN está

asociada a SERCA, la retoma de Ca^{2+} se reduce [28], mientras que al disociarse de SERCA, ésta aumenta. La interacción SERCA-PLN puede ser modificada por fosforilación [29,30]. En un estado desfosforilado se reduce la afinidad de SERCA2a por el Ca^{2+}, disminuyendo así la velocidad de recaptura del ion. Por el contrario, al ser fosforilada, PLN libera la inhibición física sobre SERCA aumentando la velocidad de retoma de Ca^{2+}. Su fosforilación por la proteína quinasa A (PKA) en el residuo serina 16 (Ser16) o por CaMKII en el residuo treonina 17 (Thr17) tienen importancia fisiológica al ser mediadores clave de los efectos inotrópicos positivos y relajantes de la estimulación β1 adrenérgica [31,32].

Más recientemente se ha descripto que existen mecanismos de regulación adicionales a la interacción SERCA-PLN, como aquel dado por la proteína del RS HAX-1 (proteína X-1 asociada a HCLS1), que interactúa con PLN y es responsable de aproximadamente 50% del efecto inhibitorio ejercido por PLN sobre SERCA2a, siendo entonces un modulador importante de la actividad de SERCA y de la contractilidad en el corazón [33,34].

Por último, es necesario mencionar que SERCA también tiene importancia farmacológica al ser diana de diversos agentes, principalmente de uso experimental pero también de un agente con potencial aplicación clínica, el istaroxime.

Receptor de rianodina (RyR)

Los receptores de rianodina (RyR) son canales de Ca^{2+} intracelulares ubicados en la membrana del RS, principalmente en las cisternas terminales [35,36], que permiten la salida de Ca^{2+} desde esta organela hacia el citosol.

El RyR es el canal iónico más grande conocido y su estructura está bien conservada entre especies. Estructuralmente es un gran complejo macromolecular tetramérico formado por cuatro monómeros idénticos. Tiene forma de hongo, con un tallo que atraviesa la membrana del RS y una cabeza orientada hacia el citoplasma, ocupando el espacio entre el RS y el sarcolema. La región citosólica contiene sitios de anclaje para moléculas moduladoras. Se encuentran insertados

en la membrana del RS conformando grupos (en inglés clusters) de 30 a 250 RyR2 [37].

Existen tres isoformas principales (RyR1, RyR2, RyR3), que se expresan en diferentes tejidos y son codificadas por genes separados. RyR1 se encuentra principalmente en músculo esquelético, RyR2 predomina en músculo cardíaco y RyR3 se expresa más ampliamente, pero especialmente en cerebro [38]. En esta tesis haremos referencia al RyR2, ya que es el principal mediador de la "liberación del Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}" (CICR) durante el AEC en el cardiomiocito, aportando la mayor parte del Ca^{2+} utilizado para la contracción cardíaca y siendo de esta manera un componente fundamental para la función del corazón.

El funcionamiento del RyR2 es regulado por acción directa del Ca^{2+} citoplasmático que ingresó por los canales de Ca^{2+} tipo L y que induce su apertura mediante el proceso de CICR, que ya fue descripto previamente. Además, RyR2 es sensible a la concentración intraluminal de Ca^{2+} dentro del RS, donde cantidades elevadas inducen la apertura espontánea del RyR2 por un proceso denominado "liberación de Ca^{2+} inducida por sobrecarga de Ca^{2+}" [39,40,41,42].

Adicionalmente, las modificaciones postraduccionales del RyR2 [43,44], como la fosforilación por enzimas como la proteína quinasa A (PKA) en el sitio S2808 [45] y en S2030 [46], la CaMKII en S2814 [47,48] o la proteína quinasa G (PKG) en S2808 y S2030 [49,50], así como la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) [51] en sitios específicos, regulan su función y aumentan la probabilidad de apertura del RyR2 [52,53]. Está descripto que RyR2 también puede ser fosforilado en otros sitios (S2808, S2811), si bien su efecto no es tan claro.

RyR2 también se asocia directa o indirectamente a proteínas endógenas moduladoras que regulan su función. Entre ellas encontramos a CaM, Calstabina-2 (o FKBP12.6), junctina, triadina, sorcina y otras [41,54].

Además, el RyR es diana de diversos agentes farmacológicos, entre los que se encuentran la cafeína y la tetracaína, de uso experimental, y fármacos de uso clínico como el dantrolene, que reduce su probabilidad de apertura. Este y otros agentes que utilizaremos en este trabajo son conocidos como "estabilizadores" del RyR2 y serán descriptos en profundidad más adelante.

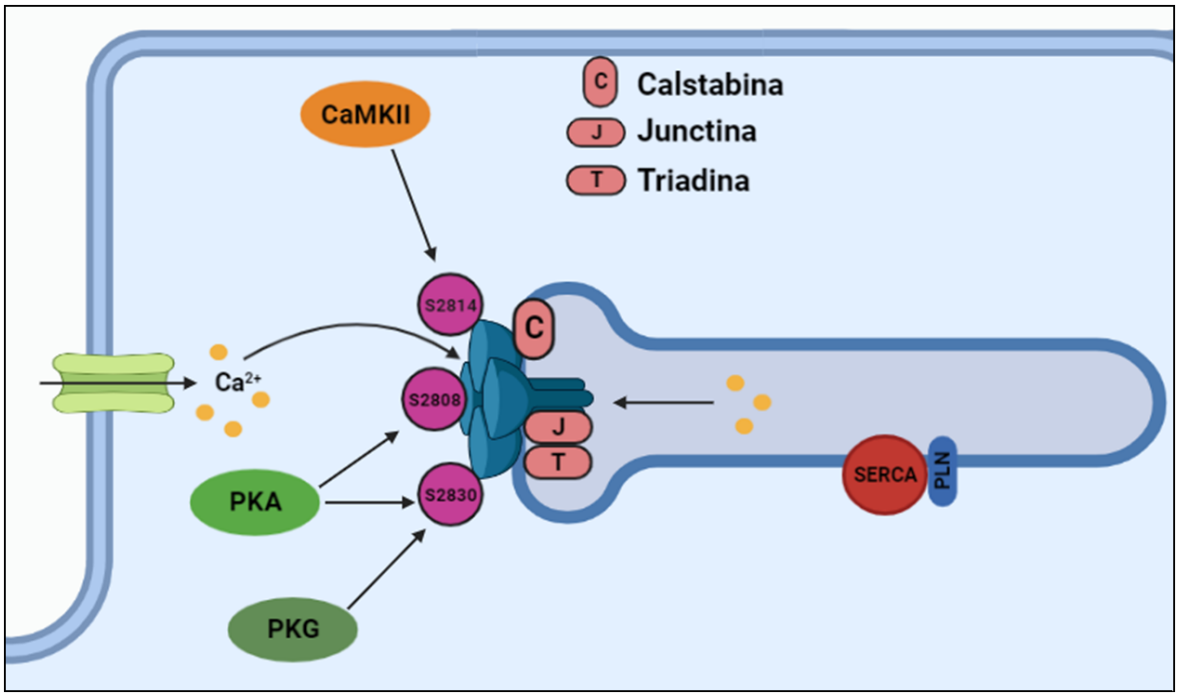

Figura 2: *Representación esquemática del RyR2, donde se observa su regulación dependiente de Ca^{2+}, su fosforilación en sitios específicos por quinasas* y *su interacción con proteínas asociadas.*

2.b.3 Mitocondria

Las mitocondrias son organelas vitales para la función de los cardiomiocitos, donde ocupan casi el 40% del volumen citosólico [55]. Desempeñan un papel en el metabolismo celular al ser necesarias para la producción de ATP, proporcionando la energía necesaria para diversas funciones como la contracción muscular [56]. El ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria permite la activación de enzimas deshidrogenasas necesarias para la generación del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, que es necesario para la generación del ATP. Por lo tanto, el Ca^{2+} actúa como un mensajero que comunica a las mitocondrias la demanda energética de la célula [57].

La mitocondria también participa en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Después de la liberación de Ca^{2+} del RS, actúa como un amortiguador o buffer de Ca^{2+} al absorber rápidamente una gran cantidad de este ion debido a su

yuxtaposición con esta organela. Los iones de Ca^{2+} pueden extruirse rápidamente de regreso al citosol por el intercambiador NCX mitocondrial (mNCX) y el intercambiador de H^+/Ca^{2+} mitocondrial (HCX) [58].

Han sido identificadas un gran número de proteínas involucradas en el ingreso y egreso de Ca^{2+} en la mitocondria. Su entrada está mediada principalmente por un gran complejo macromolecular conocido como uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) [59]. que consiste en proteínas que componen el poro y proteínas reguladoras [60,61].

Es importante destacar que la concentración mitocondrial de Ca^{2+} es baja en condiciones fisiológicas, y si bien la transferencia de Ca^{2+} del RS hacia la mitocondria es necesaria para la función cardíaca normal, el ingreso excesivo de Ca^{2+} puede ser perjudicial. Se ha descripto que en condiciones patológicas en las que se altera la homeostasis de Ca^{2+} y aumentan sus concentraciones intracelulares por liberación de Ca^{2+} desde el RS, las mitocondrias pueden acumular cantidades mayores, causando sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y desencadenando vías celulares que inducen la muerte celular [62,63].

3- Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II (CaMKII)

3.a Generalidades de CaMKII

Con los años se ha vuelto cada vez más claro que no solo el Ca^{2+} sino también varias proteínas dependientes del Ca^{2+} contribuyen al “ajuste fino” del AEC. Entre ellas, la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}-calmodulina (CaMK) es una quinasa serina / treonina multifuncional cuya actividad se regula en respuesta al aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} [64]. En su estado activado, estas enzimas fosforilan diferentes proteínas dianas, participando en múltiples y variados procesos fisiológicos.

CaMK tipo II (o CaMKII) es la predominante en el corazón y presenta cuatro isoformas distintas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) que están codificadas por cuatro genes separados. Estas difieren en la distribución en los tejidos, encontrándose en neuronas

(principalmente α y β), en cardiomiocitos (principalmente δ y algunos γ) y en otros sitios. CaMKIIδ es la isoforma predominante en miocitos y es la más relacionada con la enfermedad cardíaca, mientras que CaMKIIγ es un componente menor. La isoforma δ tiene varias variantes de empalme con diferente localización intracelular. En miocitos existe en dos variantes principales, CaMKIIδB y CaMKIIδC [65]. CaMKIIδB está predominantemente localizada en el núcleo, mientras que CaMKIIδC está principalmente en el citosol [66]. Hay evidencia de que esta diferente localización refleja diferencias en la función, ya que la variante δB regularía predominantemente la transcripción, mientras que la δC influiría más bien en el AEC.

Todas las isoformas de CaMKII tienen una estructura básica similar y parecen compartir mecanismos reguladores comunes [67]. Estructuralmente, CaMKII es un complejo proteico compuesto por 12 subunidades o monómeros ensamblados en dos anillos hexaméricos que forman una estructura en forma de rueda. Cada una de estas subunidades contiene un dominio catalítico amino terminal, un dominio regulador y un dominio de asociación carboxilo terminal. El dominio catalítico contiene sitios de unión para ATP y para proteínas de anclaje, por lo que puede hidrolizar ATP a ADP y transferir el fosfato de ATP a una serina/treonina en una proteína diana específica. Como su nombre lo indica, el dominio regulador es crítico para la regulación de la actividad de CaMKII. Contiene una región de unión a Ca^{2+}-CaM y una región autoinhibitoria, además de sitios de unión para Ca^{2+}-CaM y para modificaciones postraduccionales. El dominio de asociación es responsable de la multimerización de las subunidades.

3.b Mecanismos de activación y regulación de CaMKII

En condiciones de reposo, el dominio catalítico está bloqueado por la región autoinhibitoria del dominio regulador, que bloquea el acceso de sustratos e inhibe así la actividad de la enzima. Cuando los niveles intracelulares de Ca^{2+} aumentan durante la sístole, la CaM se une a cuatro iones Ca^{2+} y el complejo Ca^{2+}/CaM se une al dominio regulador, desplazando el segmento autoinhibidor y activando la enzima al permitir que el dominio catalítico fosforile a sus sustratos [68]. Luego, a

medida que disminuye la $[Ca^{2+}]_i$, el complejo Ca^{2+}/CaM se disocia del dominio regulador y CaMKII disminuye su actividad. Se ha demostrado que la actividad de CaMKII puede mantenerse incluso después de la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, ya que puede permanecer en un estado activado por la autofosforilación del sitio Thr287 en el segmento autoinhibidor mediante la adición de un grupo fosfato a sí misma. Este proceso aumenta la afinidad por Ca^{2+}/CaM y enlentece su disociación. Si bien la autofosforilación no es esencial para la actividad enzimática, permite mantenerla activa incluso después de que la $[Ca^{2+}]_i$ haya disminuido, como ocurre durante la diástole [69].

Además de producirse en respuesta a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, la activación de CaMKII puede implicar modificaciones postraduccionales. El dominio regulador contiene sitios para la fosforilación, oxidación, glicosilación y S-nitrosilación. A lo largo de los años se han identificado diferentes sitios, como M281/282 para la oxidación [70,71], S279 para la glicosilación [72] y C273 y C290 para la nitrosilación [73]. Más recientemente, se reportó por primera vez que la misma CaMKII puede ser fosforilada y activada por la quinasa RIPK1 [74].

CaMKII persistirá activada hasta que se elimine el grupo fosfato agregado. Por lo tanto, para que se produzca su inactivación, la enzima debe ser desfosforilada mediante fosfatasas como PP1, PP2A y PP2C.

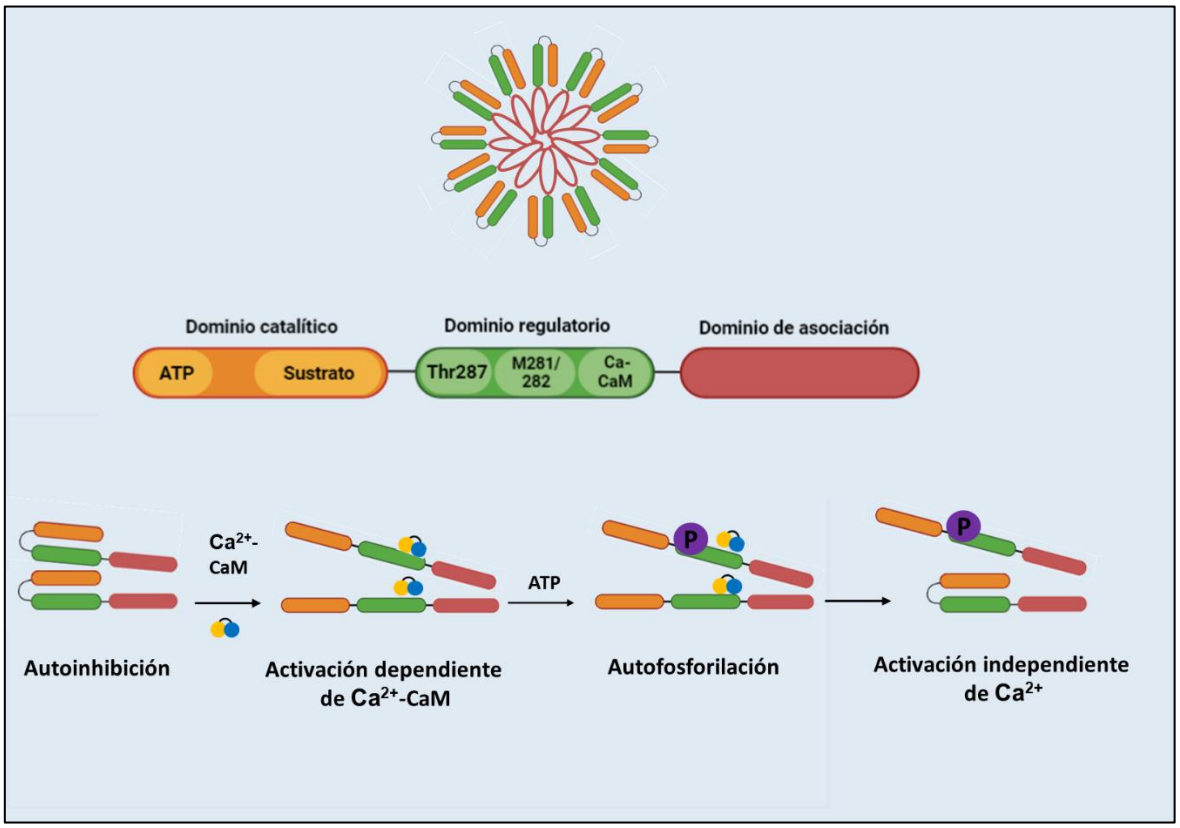

Figura 3: *Esquema representativo de la estructura de CaMKII, donde se observan su dominio catalítico, regulatorio y de asociación, y abajo, el mecanismo de activación dependiente del complejo Ca^{2+}-Calmodulina.*

3.c Efectos fisiológicos y patológicos de CaMKII sobre el manejo del calcio en el corazón

Debido a que CaMKII es ubicua y multifuncional, regula diferentes funciones celulares al fosforilar proteínas en la membrana (p. ej. canales iónicos), el citosol (p. ej. proteínas contráctiles) y el núcleo (p. ej. factores de transcripción). Su función e importancia han sido estudiadas en múltiples tejidos. A modo de ejemplo, fuera del corazón se ha demostrado que tiene un papel crítico en los procesos neurológicos fisiológicos como la formación de la memoria y el aprendizaje [75]. En el corazón regula el AEC mediante fosforilación de diferentes proteínas, contribuyendo así a regular el manejo del Ca^{2+}intracelular [5] (Bers., 2006). Por ejemplo, fosforila varias subunidades de los canales de Ca^{2+} tipo L

facilitando la apertura de los mismos [76]. La fosforilación de PLN en el residuo Thr17 alivia la inhibición de PLN sobre SERCA [31,77], facilitando la recaptación de Ca^{2+} al RS y la relajación. Thr17 es un sitio diana exclusivo de CaMKII, por lo cual su grado de fosforilación se evalúa experimentalmente para diferenciar el efecto mediado por CaMKII del efecto dependiente de otras enzimas, como por ejemplo la enzima PKA que actúa sobre Ser16. A su vez, CaMKII fosforila proteínas contráctiles que participan en la regulación de la fuerza y la cinética de la contracción muscular, incluida la proteína de unión a miosina C (MyBP-C), la troponina I, la cadena ligera de miosina-2 y también la titina [78]. RyR2 es otro blanco fundamental de CaMKII y está bien establecido que la fosforilación del sitio S2814 por CaMKII incrementa su probabilidad de apertura [47,48]. Esto ha demostrado ser relevante en situaciones en donde la expresión y actividad de esta quinasa están elevadas, como sucede en la IC [79]. Más aún, y de gran importancia en esta tesis, nuestro grupo de trabajo demostró previamente que la fosforilación CaMKII-dependiente en S2814 media los efectos cardiotóxicos de los digitálicos [2,3]. Debido a su relevancia en este trabajo, el mecanismo por el cual CaMKII induce la generación de arritmias será descripto detalladamente más adelante.

Es importante destacar que a pesar de que algunos de los efectos mediados por CaMKII se consideran adaptativos y de gran importancia fisiológica, su actividad sostenida conduce a alteraciones del manejo del Ca^{2+} que son perjudiciales para la función cardíaca. En el miocardio enfermo, la actividad aumentada de CaMKII juega un papel central en procesos como el remodelado miocárdico y la disfunción cardíaca [80,81], la arritmogénesis [82], la inflamación y la muerte celular [83,84]. Así, el papel de CaMKII está bien establecido en la fisiopatología de enfermedades cardíacas prevalentes que incluyen la IC [85], la lesión por isquemia-reperfusión (I/R) [86], la fibrilación auricular [87] y la miocardiopatía diabética [72]. En este sentido, y como ya se ha mencionado anteriormente, experimentos de nuestro laboratorio han permitido demostrar que la activación de CaMKII participa en la toxicidad cardíaca durante el tratamiento agudo y crónico

con digitálicos [2,3], mientras que su inhibición ha logrado ser protectora en este contexto.

Como se desprende del título de este trabajo, nuestro objetivo fue el estudio de estrategias farmacológicas para reducir la cardiotoxicidad de los inhibidores de la NKA, motivo por el cual a continuación se describirán en detalle estos fármacos.

4. Inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa: usos actuales y limitaciones

La IC es un síndrome clínico caracterizado por una perfusión sistémica que no logra satisfacer las demandas metabólicas de los tejidos, como resultado de una función cardíaca deteriorada. Dependiendo de la gravedad y la duración, se puede clasificar como aguda o crónica. Teniendo en cuenta la patogenia, se habla de IC con fracción de eyección reducida, a veces también llamada IC sistólica, que se caracteriza por un deterioro del vaciamiento ventricular causado por la reducción de la contractilidad miocárdica [88,89]. Por el contrario, la IC con fracción de eyección conservada, también conocida como IC diastólica, se define por un llenado ventricular defectuoso causado por la incapacidad del corazón para relajarse adecuadamente entre latidos. Constituye una causa principal de morbilidad y mortalidad y una causa frecuente de hospitalizaciones [90,91]. En las últimas décadas, a pesar de los avances médicos, el pronóstico de esta entidad continúa siendo malo, especialmente en aquellos pacientes hospitalizados por IC aguda descompensada. El tratamiento continúa presentando dificultades graves, ya que a menudo no logra controlar los síntomas ni mejorar la calidad de vida. Un porcentaje considerable de pacientes no puede evitar la progresión de la enfermedad y muere durante los primeros 5 años de diagnóstico [92].

Los fármacos inotrópicos disponibles actualmente, si bien son necesarios como terapia de rescate para pacientes con descompensación aguda porque mejoran los parámetros hemodinámicos, no son medicamentos ideales debido al mayor riesgo de efectos adversos. Los efectos proarrítmicos parecen ser en gran parte responsables del aumento de la mortalidad, pudiendo causar arritmias graves que conducen a muerte súbita [93]. Sin embargo, a pesar de sus potenciales efectos

adversos, los inotrópicos continúan utilizándose debido a la falta de alternativas mejores y más seguras.

Los glucósidos cardíacos, también llamados glucósidos cardiotónicos (GC) o más comúnmente digitálicos, son una familia de fármacos descubiertos por William Withering en el siglo XVI y que se obtienen de plantas del género Digitalis *(Digitalis spp).*

Sus principales acciones derivan de su capacidad de inhibir a la bomba Na^+ /K^+ ATPasa, resultando en una acumulación de $[Na+]_i$ que revierte la fuerza impulsora del NCX, desfavoreciendo la extrusión de Ca^{2+} mediada por este intercambiador y aumentando el Ca^{2+} disponible en el RS. Debido a que la mayor parte del Ca^{2+} necesario para la contracción proviene del RS, la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y la fuerza de contracción dependen en gran medida de la cantidad de Ca^{2+} almacenado en esta organela. De este modo, estos fármacos aumentan la fuerza de contracción del miocardio, por lo cual han sido utilizados eficazmente en el tratamiento de la IC [94]. Adicionalmente presentan actividad simpaticolítica y vagotónica [95], por lo que se utilizan en situaciones en las que se necesita reducir la frecuencia de la contracción ventricular.

A pesar de su utilidad, su uso ha disminuido fuertemente porque no han demostrado reducir la mortalidad en ensayos clínicos [1,96], y debido a su potencial toxicidad que incluye arritmias [97,98] y pérdida de miocitos cardíacos [99,3]. Estas limitaciones motivan la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas con un mejor perfil de seguridad.

A continuación, se describirán detalladamente los mecanismos conocidos que explican sus efectos tóxicos. En particular, se hará hincapié en las alteraciones del manejo del Ca^{2+} inducidas por estos fármacos, ya que son las responsables de su cardiotoxicidad.

4.a Alteraciones en el manejo del calcio intracelular como determinantes de mecanismos arritmogénicos durante el tratamiento con inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa

4.a.1 Rol de las proteínas del RS: importancia del RyR2 y de SERCA

Como podemos concluir de lo expuesto anteriormente, se requiere un control estricto de la liberación de Ca^{2+} para que el corazón funcione correctamente. El aumento del Ca^{2+} citosólico en sístole debe ser sincronizado, transitorio y autolimitado en tiempo y espacio. Para ello es especialmente importante el funcionamiento adecuado de las proteínas SERCA y RyR_2.

La actividad de RyR2 está altamente regulada para asegurar su apertura sincronizada y la liberación apropiada de Ca^{2+} en la sístole. Idealmente, el RyR_2 se cerraría por completo durante la diástole, frenando la salida de Ca^{2+} y permitiendo que la relajación se desarrolle eficientemente. Pero si bien durante la diástole la liberación de Ca^{2+} del RS se reduce casi por completo, algunos RyR_2 pueden abrirse espontáneamente generando liberación de Ca^{2+} en ausencia de estímulo eléctrico. Esta pérdida de Ca^{2+} se conoce como “fuga diastólica de Ca^{2+}” (calcium leak en inglés), definida como aquella liberación de Ca^{2+} distinta de la que se produce durante el proceso de AEC normal [100,18]. El mejor ejemplo de esta pérdida son eventos espontáneos y localizados observados por microscopía confocal conocidos como “chispas de Ca^{2+}” (o Ca^{2+} sparks en inglés), que fueron descriptos por Cheng en el año 1993 [101] y que corresponden a aperturas estocásticas de grupos individuales de RyR2, totalmente independientes de la entrada de Ca^{2+} a la célula [102]. Suelen ser limitadas en tiempo y espacio. Aquellas pequeñas y localizadas, generalmente están confinadas a la zona cercana al sitio de inicio o liberación porque el Ca^{2+} es bombeado rápidamente de regreso al RS, por lo que el Ca^{2+} en zonas vecinas es demasiado baja para activar RyR2 en otra región de la célula. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, como cuando existe alta $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol o en el RS, o si el RyR2 está “sensibilizado” como ocurre al ser fosforilado en S2814 o S2808, una chispa de Ca^{2+} puede

activar la liberación de Ca^{2+} por otros RyR2 en regiones vecinas y producir “ondas de Ca^{2+}” (o Ca^{2+} waves en inglés) que se propagan a través de la célula a través del proceso de CICR [103].

La importancia de esta pérdida diastólica radica en que genera un sustrato proarritmogénico. Cuando una onda de Ca^{2+} se propaga a través del cardiomiocito, parte de ese Ca^{2+} puede ser extruido fuera de la célula en intercambio por Na^{+} mediante el NCX electrogénico actuando en modo directo, generando una corriente despolarizante transitoria (Iti o transient inward current en inglés) que cuando es lo suficientemente grande puede causar despolarizaciones tardías (delayed afterdepolarizations o DADs en inglés) [104]. Estas DADs pueden despolarizar la membrana lo suficiente como para desencadenar PA ectópicos, los que a su vez pueden provocar arritmias ventriculares [105]. En el miocardio normal, si bien ocurren chispas de Ca^{2+}, generalmente estas no se propagan para formar ondas de Ca^{2+} proarritmogénicas. Por el contrario, en condiciones patológicas hay incremento de la frecuencia y magnitud de estas chispas, que a su vez tienden a originar ondas [106]. De este modo, las ondas de Ca^{2+} y las DADs son el sustrato de taquiarritmias ventriculares observadas en la toxicidad digitálica [107,108,109], de forma similar a lo que sucede en diferentes situaciones patológicas frecuentes, como la IC [110,111], la I/R [112,113] y las arritmias de causa genética como la taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica (también llamado CPVT) [114]. Es de destacar que CaMKII, al fosforilar al RyR2 y promover pérdida de Ca^{2+} [115,52,53] juega un rol primordial en la aparición de arritmias [116,117].

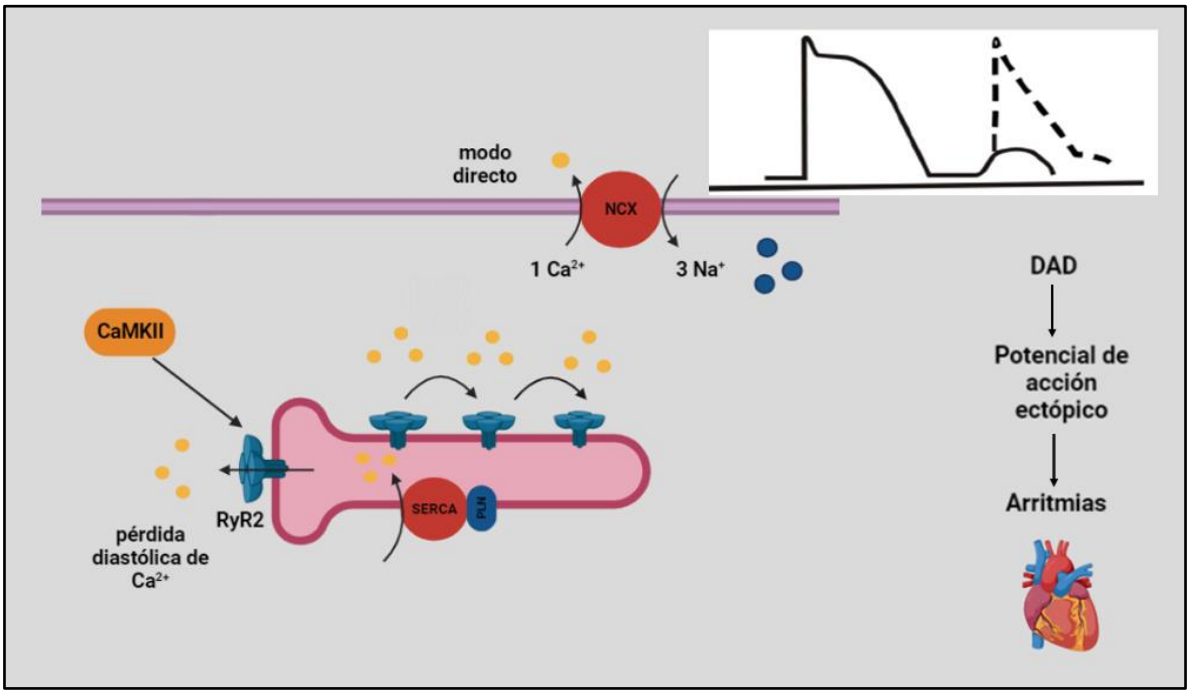

Figura 4: *Esquema representativo de la generación DADs. La propagación de ondas de Ca^{2+} a través del proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} genera despolarizaciones tardías (delayed afterdepolarizations o DADs), pudiendo dar lugar a potenciales de acción ectópicos y taquiarritmias ventriculares.*

4.a.2 Rol de la enzima CaMKII como mediadora de mecanismos arritmogénicos durante el tratamiento con digitálicos

Nuestro laboratorio ha brindado evidencia contundente que demuestra que la fosforilación del sitio Ser2814 del RyR2 por la enzima CaMKII es un determinante clave en las arritmias asociadas al tratamiento con inhibidores de la NKA [2,3,117], ya que aumenta la probabilidad de apertura de este receptor, facilitando la liberación espontánea de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol y la aparición de DADs. Adicionalmente, el grupo de *Ho y colaboradores* ha propuesto que los digitálicos promueven la producción de ROS vía NADPH Oxidasa 2 (NOX2) que pueden activar a CaMKII por oxidación, que una vez activada, fosforila al RyR2 facilitando su apertura [118].

4.b Alteraciones en el manejo del calcio intracelular como determinantes de muerte celular de cardiomiocitos durante el tratamiento con inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa

4.b.1 Mecanismos celulares y moleculares asociados a la muerte celular

Se ha demostrado que la pérdida de cardiomiocitos es un proceso asociado a la cardiotoxicidad de los digitálicos [3], por lo cual conlleva efectos perjudiciales sobre la contractilidad cardíaca a largo plazo.

Desde hace tiempo se reconoce que la alteración en el manejo del Ca^{2+} desempeña un papel importante en diferentes modalidades de muerte [119]. El exceso de ondas de Ca^{2+} ha sido asociado con la inducción de apoptosis a través de diversos mecanismos, entre ellos la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial o la activación de quinasas dependientes de Ca^{2+} [120,121,122]. Ha sido demostrado que la interacción RS-mitocondria lleva a la apoptosis mediante un mecanismo que implica la liberación de Ca^{2+} desde el RS y su captación por parte de las mitocondrias [123,124]. De este modo, la sobrecarga Ca^{2+} mitocondrial puede desencadenar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) [125,62,126] y un aumento brusco de la permeabilidad a los solutos, con lo cual se disipa rápidamente el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) causando despolarización y alterando el gradiente de protones y la cadena de transporte de electrones que impulsa la síntesis de ATP. El déficit energético altera el transporte iónico, alterando el gradiente osmótico y conduciendo a hinchazón o “swelling” mitocondrial, que puede provocar la ruptura de la misma y la liberación masiva de Ca^{2+} y de factores proapoptóticos al citosol.

4.b.2 Rol de CaMKII en la muerte de cardiomiocitos inducida por inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa

La activación de CaMKII desempeña un papel central en la muerte de cardiomiocitos al ser un punto de convergencia para diferentes estímulos nocivos [84]. Su actividad sostenida ha mostrado ser uno de los mecanismos clave del efecto perjudicial en situaciones como la I/R, la hiperglucemia y la taquicardia

crónica [120,122,127]. De forma similar, nuestro grupo ha demostrado que los digitálicos tienen un efecto proapoptótico en el cual es clave la activación de la enzima CaMKII, que al fosforilar a los RyR2 facilita la liberación de Ca^{2+} desde el RS y favorecería su transferencia hacia la mitocondria, con la consecuente sobrecarga de Ca^{2+} y muerte de los cardiomiocitos [3]. La asociación de los digitálicos con arritmias y apoptosis motivan la búsqueda de estrategias capaces de disminuir los efectos adversos secundarios a su uso.

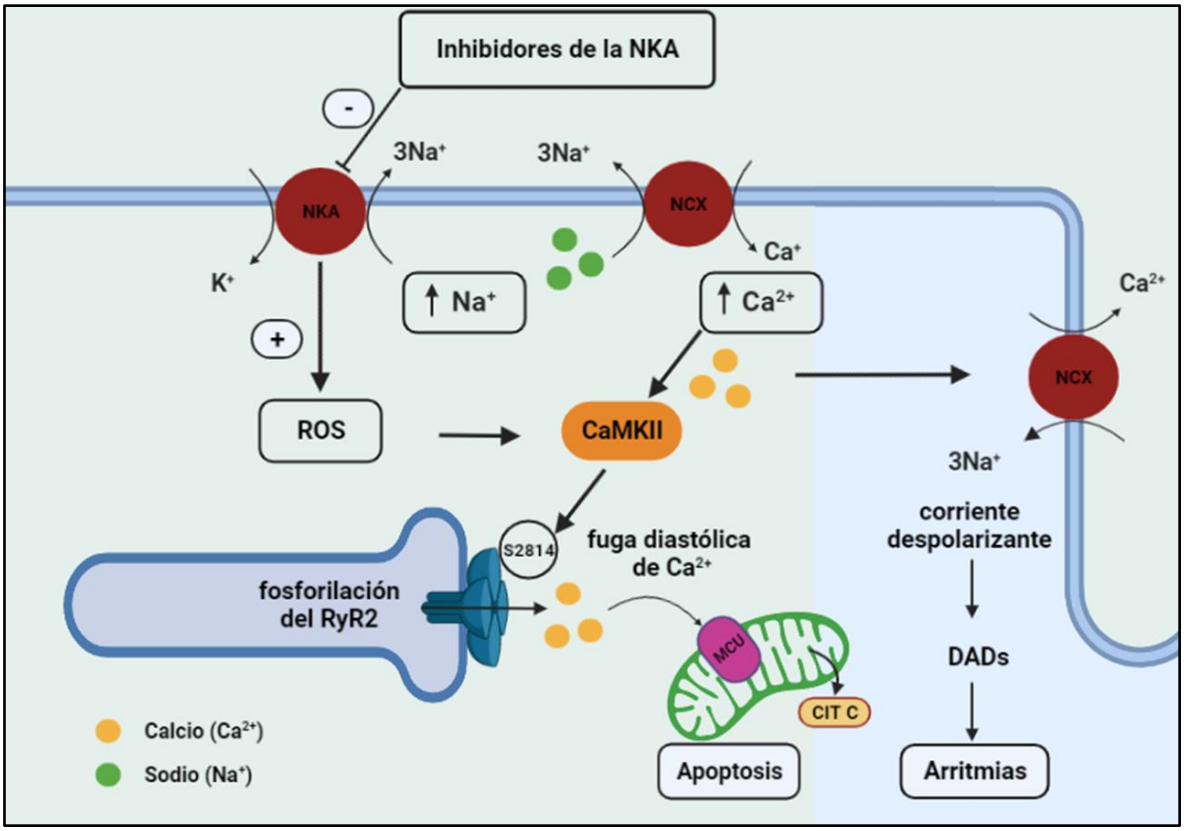

Figura 5: *Mecanismos CaMKII-dependientes de las arritmias y la muerte celular durante el tratamiento con digitálicos.*

5. Istaroxime como fármaco emergente

El istaroxime es un fármaco descripto por primera vez en el año 2002 [128] (Micheletti y col., 2002) y que actualmente continúa en estudio para su utilización clínica. En un contexto clínico, ha demostrado ser eficaz y seguro para el tratamiento de la IC tras períodos cortos de administración, habiendo concluido con éxito dos ensayos clínicos de fase II. En estos demostró mejorar la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo. Durante su administración en pacientes durante 6 y 24 horas [129,130,131] no se observaron eventos adversos cardíacos graves como arritmias, hipotensión o eventos isquémicos, a diferencia de lo que sucede con el uso de inotrópicos tradicionales [132]. Con respecto al perfil farmacocinético, tiene un inicio y una finalización de acción muy rápidos, lo que hace que este medicamento sea especialmente adecuado para el uso en pacientes críticos. Estos resultados prometedores respaldan el papel potencial de istaroxime para el tratamiento de la IC. Si bien hasta la fecha no se han realizado ensayos clínicos más grandes y actualmente no existen indicaciones precisas para su uso, la investigación de este novedoso fármaco continúa actualmente en curso.

Se trata de un compuesto esteroide, y si bien estructuralmente no está relacionado con los digitálicos, comparte ciertas características farmacodinámicas. Es un miembro de una nueva generación de inhibidores de la NKA no glucosídicos [128]. Tiene un doble mecanismo de acción que combina la inhibición de la NKA con la estimulación de la bomba SERCA2a [133].

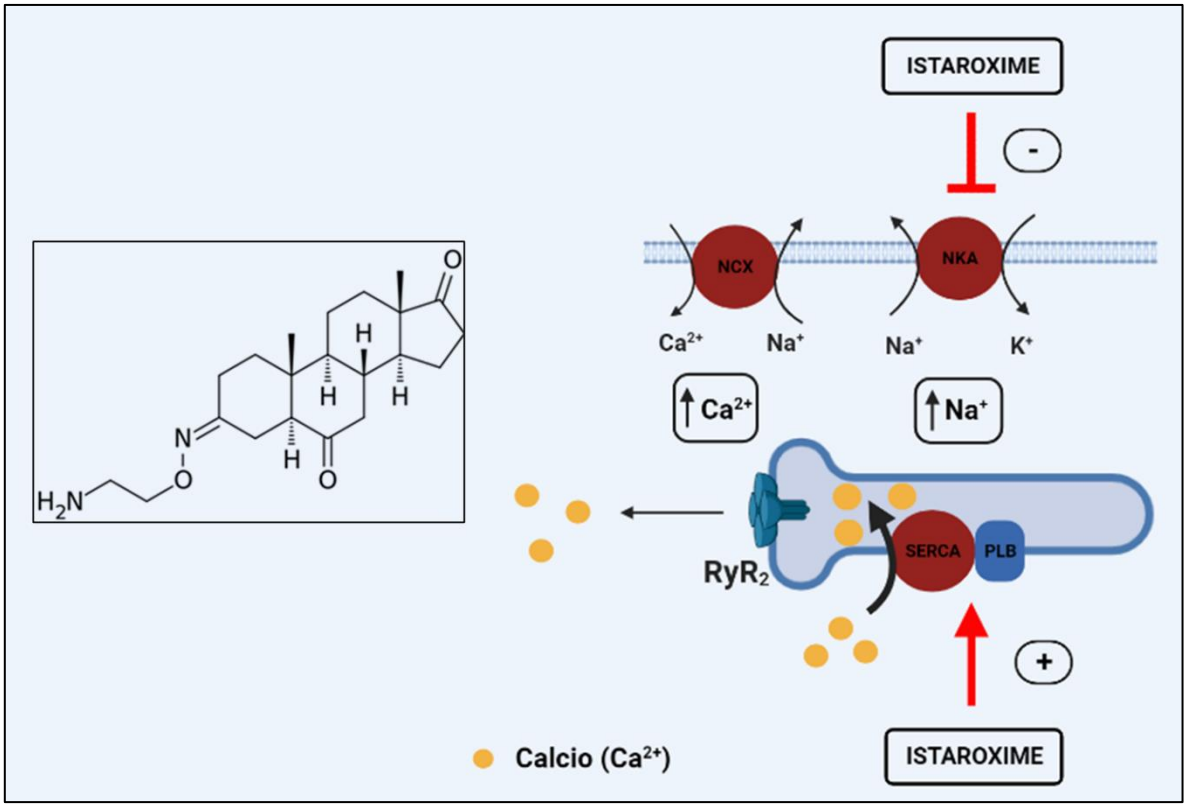

Figura 6: *Estructura molecular del istaroxime (3Z,5α)-3-[(2-Aminoethoxy) imino]androstane-6,17-dione (izquierda) y su mecanismo de acción (derecha).*

Al igual que con los GC, la inhibición de la NKA provoca una alteración en la homeostasis del Na^+ y el Ca^{2+} que lleva al aumento en el contenido de Ca^{2+} disponible en el RS, mejorando la contractilidad cardíaca (efecto inotrópico). Además, la estimulación de SERCA2a acelera la recaptación de Ca^{2+} por el RS, reduciendo los niveles de Ca^{2+} citoplasmático durante la diástole y mejorando la relajación (efecto lusitrópico) [134]. El mecanismo actualmente aceptado para el efecto lusitrópico y su baja arritmogenicidad es su capacidad para disociar SERCA2a de su proteína inhibidora PLN [135].

Muchos de los efectos adversos observados con los inotrópicos disponibles, incluidos los GC, están mediados por un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico [132]. A nivel preclínico en modelos animales, un estudio comparativo en miocitos de ratón utilizando concentraciones equiinotrópicas del digitálico clásico digoxina o de istaroxime, mostró que este último se asocia a menor acumulación

de Ca^{2+} diastólico [136]. Por lo tanto, esta combinación peculiar de dos mecanismos de acción parece conferir al istaroxime un mejor perfil de seguridad en comparación con otros inhibidores de la NKA, con menor riesgo de arritmias desencadenadas por sobrecarga de Ca^{2+}. Considerando estos datos, es de gran importancia profundizar aún más el conocimiento de los mecanismos subcelulares que subyacen a su menor potencial arritmogénico.

Por otro lado, además de sus efectos beneficiosos sobre la función cardíaca, istaroxime ha mostrado efectos antineoplásicos en líneas celulares tumorales y en xenoinjertos, [137]. Teniendo en cuenta este antecedente y el hecho de que los inhibidores clásicos de la NKA promueven la pérdida de cardiomiocitos [3], surgió nuestro interés en conocer si el istaroxime también es capaz de provocar muerte celular en tejidos no tumorales como el corazón.

6. Estabilizadores farmacológicos del RyR2: Carvedilol y VK-II-86

La importancia del RyR2 para el funcionamiento normal de los cardiomiocitos ya ha sido bien establecida, siendo este canal el que inicia los transitorios de Ca^{2+} responsables de la contracción del corazón sano. Como ya se mencionó, la sensibilidad del RyR2 al Ca^{2+} está regulada por sus proteínas asociadas, como calstabina-2 (FKBP12.6), CaM y calsecuestrina (CSQ), que inducen cambios conformacionales del canal que alteran la probabilidad de apertura del mismo [41].

La importancia de la pérdida diastólica de Ca^{2+} a través del RyR2 como sustrato de diversas arritmias ventriculares mortales que se producen durante el tratamiento con digitálicos y en diferentes situaciones patológicas ya fue descripta en detalle. Debido al rol central de la disfunción del RyR2 en la patogénesis de estas arritmias, numerosos grupos de investigación han intentado desarrollar compuestos capaces de modular farmacológicamente a este canal, con el fin de prevenir la liberación arritmogénica de Ca^{2+} del RS [138,115]. La “estabilización del RyR2” consiste en disminuir selectivamente la probabilidad de apertura del RyR2 durante la diástole, sin afectar la liberación de Ca^{2+} durante la sístole [139]. Esto se debe a la interacción molecular directa de determinados compuestos con el RyR2 [140,141].

Existen agentes farmacológicos de uso experimental con estas características, entre los que se pueden mencionar el JTV-519. Durante la fase de reposo, la proteína calstabina-2 (FKBP12.6) se une al RyR2, estabilizando su estructura tetramérica, manteniéndolo en un estado cerrado [142]. Por el contrario, la disociación de calstabina-2 del RyR2 aumenta la probabilidad de apertura del canal. JTV-519 es una molécula pequeña que mejora la unión de la proteína calstabina al RyR2 y aumenta la probabilidad de que el canal permanezca cerrado [45].

Adicionalmente, se cuenta con fármacos de uso clínico que fueron diseñados para otros fines, pero que como efecto adicional alteran la sensibilidad del RyR2 al Ca^{2+}. Entre ellos está el dantrolene, que actualmente se utiliza clínicamente como relajante muscular para el tratamiento de la hipertermia maligna, una reacción a los anestésicos causada por mutaciones en el RyR1 del músculo esquelético, desencadenando una liberación anormal de Ca^{2+} por este canal y contracción muscular excesiva [143]. Recientemente se describió la estructura tetramérica del RyR2 utilizando criomicroscopía electrónica de alta resolución [37], revelando que las interacciones entre los dominios N-terminal y central de subunidades vecinas son un requisito crucial para el funcionamiento correcto del canal. En el RyR2 normal, estas interacciones son fuertes (estado denominado “zipping” en inglés) y estabilizan la estructura tetamérica, inhibiendo la disociación de CaM y manteniendo al canal en estado cerrado. El mecanismo de acción de dantrolene parecería implicar la estabilización de las interacciones mencionadas, evitando así pérdidas diastólicas de Ca^{2+} a través del RyR2 [144].

Otro fármaco que merece ser mencionado es el carvedilol, un bloqueante no selectivo de los receptores beta (β) adrenérgicos cardíacos, muy utilizado en la terapia de la IC ya que reduce la mortalidad, en gran parte debido a sus efectos antiarrítmicos [145]. El grupo del doctor Chen estudió los mecanismos que subyacen a los beneficios antiarrítmicos del carvedilol, demostrando que además de su efecto β-bloqueante, tiene una propiedad única que consiste en reducir la probabilidad de apertura de los RyR2 y el tiempo que permanecen abiertos, suprimiendo así la liberación espontánea de Ca^{2+} del RS y previniendo arritmias.

Sin embargo, las concentraciones de carvedilol necesarias para observar este efecto son considerablemente más altas que las que bloquean al receptor β (~1 nM) y podrían asociarse a la aparición de efectos adversos secundarios a un bloqueo excesivo de los mismos, como por ejemplo bradicardia. Por este motivo, desarrollaron análogos estructurales novedosos como el VK-II-86, que conservan la actividad del carvedilol en el RyR2 y los efectos antiarrítmicos, pero que carecen de efectos sobre el receptor β, por lo cual no impactan en el ritmo cardíaco [146].

Como parte de esta tesis evaluamos la estabilización del RyR2 mediante el uso de carvedilol y VK-II-86 como estrategia terapéutica para prevenir la cardiotoxicidad del tratamiento con digitálicos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Considerando los antecedentes descriptos en la introducción, el objetivo del presente trabajo de tesis doctoral fue estudiar los efectos que la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa (NKA) tiene en cardiomiocitos cuando se realiza en combinación con dos estrategias farmacológicas capaces de modular el manejo del Ca^{2+} por el RS: por un lado, la estimulación de la recaptación de Ca^{2+} mediada por la proteína SERCA2a mediante la utilización de istaroxime, y por otro lado, la modulación farmacológica de la apertura de los RyR2 cardíacos mediante los fármacos carvedilol y VK-II-86.

En este contexto, se plantearon las siguientes hipótesis:

- El istaroxime no induce la activación de CaMKII en el cardiomiocito, siendo de esta forma menos cardiotóxico que los inhibidores clásicos de la NKA, lo que lo convierte en una alternativa a los digitálicos.

- El tratamiento conjunto de inhibidores clásicos de la NKA con estabilizadores del RyR2 previene la liberación arritmogénica de Ca^{2+} y la apoptosis, convirtiéndose en una estrategia capaz de reducir la cardiotoxicidad de los digitálicos.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue determinar si la modulación del manejo del Ca^{2+} del RS en cardiomiocitos adultos previene la liberación arritmogénica de Ca^{2+} y la apoptosis inducida por inhibición de la NKA sin afectar la respuesta inotrópica.

A continuación, se describirán los objetivos específicos abordados para dar respuesta a nuestras preguntas.

2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Determinar el impacto del tratamiento con istaroxime en la viabilidad de los cardiomiocitos

• Evaluar si el tratamiento con istaroxime induce la muerte celular de cardiomiocitos, comparando los resultados con el efecto obtenido con el digitálico ouabaína a dosis equiinotrópicas

• Evaluar si el tratamiento con istaroxime cursa con igual o menor grado de activación de la CaMKII, en comparación al registrado en presencia de ouabaína

Objetivo 2: Describir los mecanismos involucrados en el manejo del Ca^{2+} por los cuales el uso de istaroxime se asocia a menor aparición de arritmias

• Determinar si el istaroxime induce la liberación diastólica de Ca^{2+} en forma de chispas y ondas de Ca^{2+} de forma comparable a los digitálicos

• Evaluar las características de las ondas de Ca^{2+} en presencia de istaroxime, en comparación con las que se presentan con ouabaína

• Estudiar la relevancia de PLN en el efecto antiarritmogénico producido por istaroxime

Objetivo 3: Determinar si la estabilización de los RyR2 puede reducir el potencial arritmogénico de los inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa sin afectar significativamente la respuesta inotrópica alcanzada

• Determinar si el tratamiento conjunto de digitálicos con estabilizadores del RyR2 genera menor liberación arritmogénica de Ca^{2+} en comparación a la observada con ouabaína sola

• Determinar si el agregado de estabilizadores del RyR2 al tratamiento con digitálicos afecta el grado de activación de CaMKII, en comparación al observado con digitálicos únicamente

Objetivo 4: Determinar si la estabilización de los RyR2 protege frente al efecto proapoptótico de los inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa

• Determinar si el tratamiento conjunto de digitálicos con estabilizadores del RyR2 induce menor efecto proapoptótico de cardiomiocitos cultivados, en comparación al registrado en presencia solamente de ouabaína

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aspectos generales. Cuidado y uso de animales

Todos los experimentos de este trabajo fueron realizados de acuerdo a las normativas generales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, estipuladas en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio", (NIH publicación nº 85-23, 1996) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Plata (número de Protocolo: T10-01-18).

Como modelos animales se trabajó con ratas Wistar (200-300 gramos) y ratones machos (25-30 gramos) de 3 a 4 meses de edad. Se utilizaron tanto cepas de ratones silvestres y como ratones transgénicos que no expresan la proteína fosfolamban (cepa PLN knockout o PLN-KO). Los experimentos fueron realizados utilizando cardiomiocitos ventriculares aislados que fueron obtenidos mediante la técnica de digestión enzimática con colagenasa tal como se describe a continuación.

2. Aislamiento de miocitos cardíacos

Los corazones fueron extraídos por realización de una toracotomía, la cual se realizó mediante una incisión quirúrgica para abrir la cavidad torácica y acceder al corazón. Previo a la cirugía, las ratas fueron anestesiadas vía inyección intraperitoneal de uretano (1.2–1.4 g/kg), mientras que en los ratones se realizó dislocación cervical. En ambos casos, se comprobó una correcta anestesia y analgesia al determinar la ausencia de reflejos corneal y tendinoso y la ausencia respuesta frente a otros estímulos.

Posteriormente, se retiró el pericardio y, en el caso de las ratas, se procedió a inyectar 1 ml de heparina sódica (200 U/ml) dentro de la cavidad auricular para evitar la formación de coágulos. Con el mismo fin, en los ratones, 0,5 ml de heparina sódica fueron inyectados por vía intraperitoneal (200 U/ml) previamente a la analgesia y anestesia.

Finalmente se realizó la canulación de la arteria aorta, se removió el órgano y se suspendió en un sistema de perfusión tipo Langerdorff. Esta técnica se basa en la perfusión retrógrada del corazón al irrigar las arterias coronarias a través de una cánula insertada en la aorta. Cuando se alcanza una presión adecuada se produce el cierre de la válvula aórtica y se desvía el flujo hacia los orificios de las coronarias, de modo que se perfunde la masa ventricular y el corazón late *ex vivo* [147].

La perfusión se realizó durante aproximadamente 5 minutos con solución buffer HEPES conformada por cloruro de sodio (NaCl) 146,5 mM, cloruro de potasio (KCl) 4,69 mM, Glucosa 11 mM, HEPES 10 mM, NaH2PO4.H2O 0,35 mM, MgSO4.7H2O 1,05 mM, con 1 mM cloruro de calcio ($CaCl_2$) que le permite al corazón seguir latiendo mientras se limpia el órgano y se estabiliza su función contráctil. Luego se procedió a perfundir durante 5 minutos con la misma solución, pero ahora libre de Ca^{2+} y con el agregado de 0,1 mM del quelante de Ca^{2+} EGTA, con lo cual el corazón deja de latir y se debilitan las uniones intercelulares, facilitando su posterior digestión (Vila Petroff M. Aislamiento de Miocitos. En: Introducción al Análisis Científico del Aparato Cardiovascular en Bioingeniería 2004). En el caso del ratón, el corazón solo se perfundió con la solución HEPES 0.1 mM de ácido etilenglicol tetracético (EGTA) [148].

Por último, se perfundió durante 15 minutos con una solución de digestión enzimática compuesta por 0,5 mM CaCl2, 0,50 mg/ml de colagenasa tipo II (300 U/ml, de Worthington Biochemical), 0,01mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0,5 mg/ml. que disgregará la red de colágeno y permitirá liberar los miocitos del tejido. Todas las soluciones fueron ajustadas a pH 7,4 con hidróxido de sodio (NaOH) y burbujeadas continuamente con oxígeno (O2) al 100% y se perfundió a una presión constante de perfusión de 70-80 mmHg.

Una vez concluida la digestión, el corazón fue desmontado, el tejido auricular fue descartado y el tejido ventricular aún no digerido fue disociado mecánicamente con tijeras. De esta forma se obtuvo una suspensión de miocitos en la solución utilizada, que luego fue centrifugada para descartar la solución enzimática.

Los miocitos así obtenidos fueron resuspendidos en soluciones de concentraciones crecientes de $CaCl_2$, hasta llegar a una concentración final de 1 mM de Ca^{2+} que se utilizará en los posteriores experimentos. Después de cada resuspensión las células se dejaron sedimentar por 5 a 10 minutos. Este proceso permitió la recalcificación paulatina de los mismos, evitando la muerte celular.

En la ***figura 7*** se observa un corazón perfundido mediante el sistema de perfusión retrógrada de Langendorff para la obtención de los cardiomiocitos ventriculares.

Finalmente, las células aisladas fueron conservadas en suspensión en solución buffer Hepes a temperatura ambiente (20-24 Cº) con una concentración de Ca^{2+} de 1mM en rata y 1,8 mM en ratón hasta su utilización dentro de las siguientes 6 a 8 horas tras el aislamiento, siendo estas concentraciones de Ca^{2+} las necesarias en condiciones fisiológicas en cada especie [2,120].

Para el uso experimental los miocitos fueron elegidos en base a su morfología (patrón sarcomérico conservado y bordes regulares (***fig. 7***), a su capacidad de contraerse ante la estimulación eléctrica y a la ausencia de contracciones espontáneas.

Solución amortiguadora HEPES (en mMoles/L. Ajustada a pH 7.4 con NaOH):

ClNa 146.2

ClK 4.7

Cl_2Ca 1

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

PO_4NaH_2 0.35

SO_4Mg 1.05

Glucosa 10

Figura 7: *A la izquierda, técnica de aislamiento de miocitos mediante el sistema de perfusión retrógrada de Langendorff mediante digestión enzimática. A la derecha, imagen de campo claro de un miocito ventricular de rata donde puede observarse un patrón sarcomérico conservado y bordes regulares, siendo estas características morfológicas indicativas de viabilidad conservada.*

3. Registro de parámetros mecánicos en miocitos aislados

Se evaluó en tiempo real el estado inotrópico (contractilidad) de cardiomiocitos aislados de ratas Wistar adultas en condiciones basales y en respuesta a diferentes tratamientos farmacológicos. Para esto, las células fueron colocadas sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200). Las mismas fueron perfundidas con solución HEPES pH 7.4 (células control) o con la misma solución con el agregado de ouabaína o istaroxime a dosis equiinotrópicas. La perfusión se realizó a un flujo constante de 1 ml/minuto y las células fueron estimuladas eléctricamente a una frecuencia de 0.5 o 1 Hertz (Hz) según el protocolo, a través de dos electrodos de platino, colocados a cada lado de la cámara de perfusión.

Con el propósito de medir el acortamiento celular, se generó contraste óptico entre los bordes de la célula y el fondo de la cámara de perfusión. La célula a estudiar fue iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible. De esta forma se logra la detección de los bordes celulares, lo que permite registrar la longitud y monitorear el acortamiento de los cardiomiocitos en tiempo real.

Los datos adquiridos fueron almacenados en el software *ION Optix* para su análisis. Este software proporciona datos que informan sobre la velocidad y la magnitud de los cambios en el Ca^{2+} intracelular, así como del acortamiento y la relajación de las células, los resultados permitiendo la comparación de las respuestas entre diferentes células de forma objetiva. En la ***figura 8*** se observa un registro representativo del acortamiento de un cardiomiocito, en el que se ve la etapa de contracción celular, en la que disminuye la longitud celular, y la etapa de relajación, en la cual la célula retorna a su longitud basal. La amplitud del acortamiento representa la diferencia entre la longitud basal y la mínima longitud. Debido a que las longitudes de las células individuales pueden ser heterogéneas, el cambio porcentual es el mejor parámetro para medir la contracción de los miocitos. La constante de tiempo TAU (no representado) es una función exponencial del tiempo que tarda la célula en retornar a su largo basal. Este parámetro es una medida de la velocidad de relajación de la célula, por lo que cuanto menor sea su valor, más rápida es la relajación del miocito.

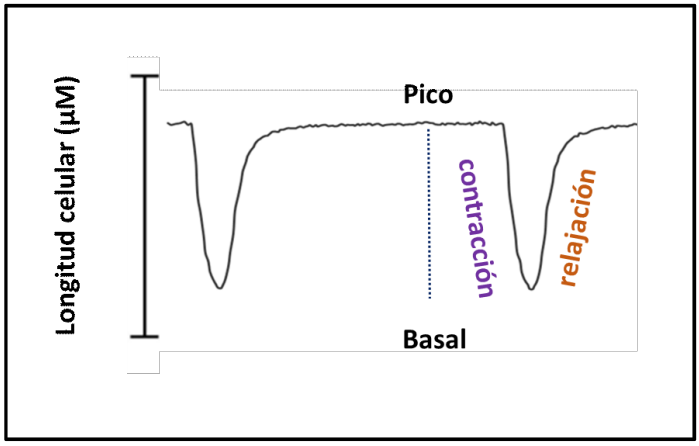

Figura 8: *Representación gráfica de un registro de acortamiento celular obtenida mediante el* software *ION Optix.*

4. Detección de la liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplásmico por microscopía confocal

La liberación espontánea de Ca^{2+} del RS se estudió en tiempo real mediante microscopía confocal (microscopio invertido confocal Zeiss 410, LSM Tech, Pennsylvania, USA) en cardiomiocitos de rata y ratón cargados con el indicador sensible a Ca^{2+} Fluo-4. Dicha carga se realizó incubando a las células con 10 µM de Fluo-3 (ThermoFisher Scientific) durante 10 minutos en oscuridad, previo a la realización de los experimentos.

Para lograr la obtención de señal fluorescente sensible a Ca^{2+} citosólico, la célula seleccionada es excitada con luz de 488 nm proveniente de un láser Argón y la señal emitida es recolectada en el rango de 510 a 560 nm por un fotomultiplicador. En estos experimentos se realiza el barrido longitudinal de la célula en un plano focal específico (tanto el sector a barrer como el plano focal son seleccionados antes de comenzar cada experimento, buscando obtener una buena relación célula/fondo y evitando atravesar los núcleos celulares). A diferencia de la información obtenida en experimentos realizados mediante epifluorescencia, el barrido lineal realizado en un plano focal específico permite obtener resolución espacial de la liberación de Ca^{2+} dentro de la célula evaluada. De este modo se obtienen imágenes bidimensionales, donde se puede ver la distancia del cardiomiocito en el eje vertical y el tiempo en el horizontal.

Mediante esta técnica se pueden detectar eventos de liberación local y transitoria de Ca^{2+}, conocidos como “chispas de Ca^{2+}”, y también la propagación del Ca^{2+} a través del miocito en forma de “ondas de Ca^{2+}” ***(Fig. 9)***, pudiendo evaluarse las características espaciales y temporales de las mismas.

El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el complemento *Sparkmaster* del software *Image J.* Dicho complemento es un programa de análisis automatizado que ha sido diseñado y validado para estudiar de forma veloz y fiable la frecuencia y características individuales de las chispas y ondas de Ca^{2+} [149]. De esta manera se cuantificó la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} y se analizaron las características morfológicas individuales de las chispas de Ca^{2+}: la amplitud, el ancho a la mitad de la altura máxima (Full Width at Half

Maximum o FWHM en inglés) y la duración a la mitad de la altura máxima (Full duration at Half Maximum o FDHM en inglés). Para el análisis de la velocidad de las ondas de Ca^{2+} se realizó la división: distancia (µm) / tiempo (seg) a partir de la conversión de pixeles a µm o segundos según el plano correspondiente.

Para los experimentos destinados a la evaluación del istaroxime, estos eventos fueron evaluados en miocitos perfundidos con solución HEPES con o sin el agregado de ouabaína o istroxime a dosis equiinotrópicas. La ocurrencia de chispas y ondas de Ca^{2+} se registró inmediatamente luego de retirar el estímulo eléctrico en miocitos. En los experimentos con estabilizadores del RyR2, se realizó el mismo protocolo en miocitos perfundidos con solución HEPES más ouabaína y que además fueron pretratados con o sin VK-II-86.

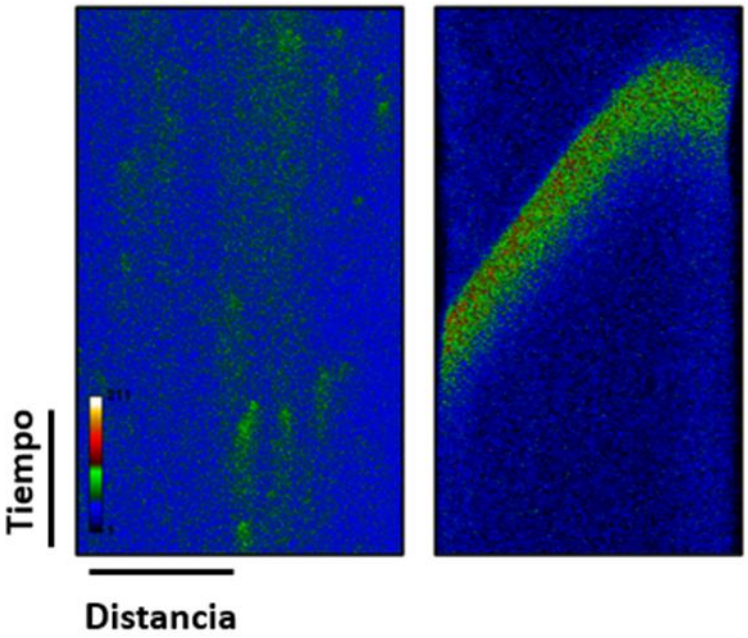

Figura 9: *Imágenes representativas de registros de Ca^{2+} citosólico en células sin marcapaseo eléctrico, donde se puede observar la ocurrencia de chispas de Ca^{2+} en la figura izquierda y de una onda de Ca^{2+} en la derecha. Ambos eventos se desarrollan durante el período diastólico. En el plano vertical se ve la longitud del cardiomiocito (micrones) y en el horizontal el tiempo (segundos).*

5. Inmunodetección proteica por análisis de western blot

Luego de ser aislados mediante el sistema de perfusión tipo Langendorff, los miocitos obtenidos de corazones de ratas Wistar fueron incubados durante 1 hora con y sin el agregado de ouabaína o istaroxime y luego fueron congelados en nitrógeno líquido. Por otro lado, los experimentos utilizando carvedilol y VK-II-86 fueron realizados con homogenatos preparados a partir de tejido ventricular pulverizado de corazón de ratas perfundidas con estas drogas.

La cantidad de proteína fue medida por el método de Bradford (Bradford y col., 1976) usando albúmina sérica bovina como proteína estándar para la curva de calibración. Los lisados (~90 µg de proteína por línea de corrida del gel) fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore). Los blots fueron incubados durante la noche con anticuerpos específicos contra PLN (ABR, California, Estados Unidos), fosfo-treonina17-PLN (Badrilla, Leeds, Reino Unido), CaMKII (Chemicon international, Lake placid, NY), fosfo-Treonina286-CaMKII (Badrilla, Leeds, UK), fosfo-Serina 2814 RyR (Badrilla, Leeds, UK) y anti GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos).

En miocitos de rata incubados durante 1 hora con y sin el agregado de ouabaína o Istaroxime se evaluó la activación de apoptosis a través de la inmunodetección de las proteínas proapoptóticas Bax y CHOP y de la proteína antiapoptótica Bcl-2 por Western Blot usando anticuerpos específicos. Como se mencionó en la introducción, la familia de proteínas Bcl2 posee proteínas proapoptóticas, como (Bax) y antiapoptóticas como (Bcl-2) entre otras. La relación entre proteínas pro y antiapoptóticas controla la integridad de la membrana mitocondrial y la liberación de las proteínas proapoptóticas, como el Citocromo C (CitC). Cuando la relación Bax/Bcl-2 aumenta, es indicativo de activación del proceso de apoptosis. El análisis del grado de expresión de estas proteínas se detectó a través de los

anticuerpos específicos anti-Bax (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-Bcl2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA).

Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas con TBS-T y luego incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Peroxidasa. La inmunoreactividad fue visualizada mediante un kit de detección basado en la quimioluminiscencia basada en una reacción enzimática inducida por Peroxidasa (Amersham Biosciences) utilizando el sistema de adquisición de imágenes *Chemidoc*. Se obtuvieron así, bandas de diferente intensidad y tamaño de acuerdo a la cantidad de antígeno detectado [86], cuya fue cuantificada por densitometría utilizando el programa de análisis de imágenes Image J (NIH, Estados Unidos).

6. Estudio de la viabilidad celular en cultivo celular

Los cardiomiocitos adultos de rata utilizados para cultivo fueron resuspendidos en medio de cultivo fresco M199 (M0393 Sigma) o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado (en g/L) con 0.017 de ácido ascórbico, 2 de BSA, 0.4 de L-carnitina, 0.66 creatina, 0.62 taurina, 50 U/mL penicilina y 50 U/mL de estreptomicina) según el protocolo utilizado (ver sección resultados y ***Fig. 10A***), y fueron sembrados a una densidad de aproximadamente $2x10^4$ células/ml en placas individuales de 35x10 mm previamente tratadas con laminina por 1 hora para favorecer la adherencia de las células a la base de las mismas.

Una vez adheridas las células, se procedió a cambiar el medio de cultivo por el mismo pero esta vez con o sin el agregado de los diferentes fármacos en estudio (ouabaína, istaroxime, carvedilol o VK-II-86, según el protocolo). Las células fueron incubadas en una estufa a 37 °C con una atmósfera de CO2 al 5% y cultivadas durante 24 horas en presencia de las distintas alternativas de tratamiento de acuerdo con los diferentes protocolos experimentales que se observan en la ***Figura 10***. En cada grupo se evaluó la viabilidad de los miocitos y se compararon los resultados obtenidos con cada tratamiento a concentraciones equivalentes con el porcentaje de viabilidad registrado en células mantenidas en medio de cultivo sin drogas.

Luego de 24 horas de cultivo, se evaluó la viabilidad celular a través de criterios morfológicos, en el que las células fueron clasificadas en viables o muertas de acuerdo a la relación largo/ancho de las células (una célula con una relación mayor o igual a 3 fue considerada viable), como fue previamente descrito [2,150]. En la ***figura 10B*** se puede observar la estructura de un cardiomiocito viable, con sus estriaciones y bordes definidos, y por el otro, un cardiomiocito muerto que ha perdido su forma y sus estriaciones típicas.

Para el recuento de los cardiomiocitos se tomaron fotos en un microscopio Nikon Diaphot 200 con una cámara acoplada Nikon y un objetivo Uplan FLN de 20X. Se fotografiaron por lo menos 8 campos al azar por cada placa de Petri. Las imágenes fueron almacenadas en formato JPG y se realizó el recuento de manera manual en cada foto. Todos los datos de viabilidad celular se expresaron como porcentaje del número total de células de cada imagen.

Para determinar la equivalencia de dosis de istaroxime y ouabaína nos basamos no solo en resultados publicados por otros grupos, sino también en resultados propios obtenidos mediante video-detección de bordes con registro simultáneo de Ca^{2+} citosólico, descriptos en la sección “Registro de acortamiento celular por microscopía”.

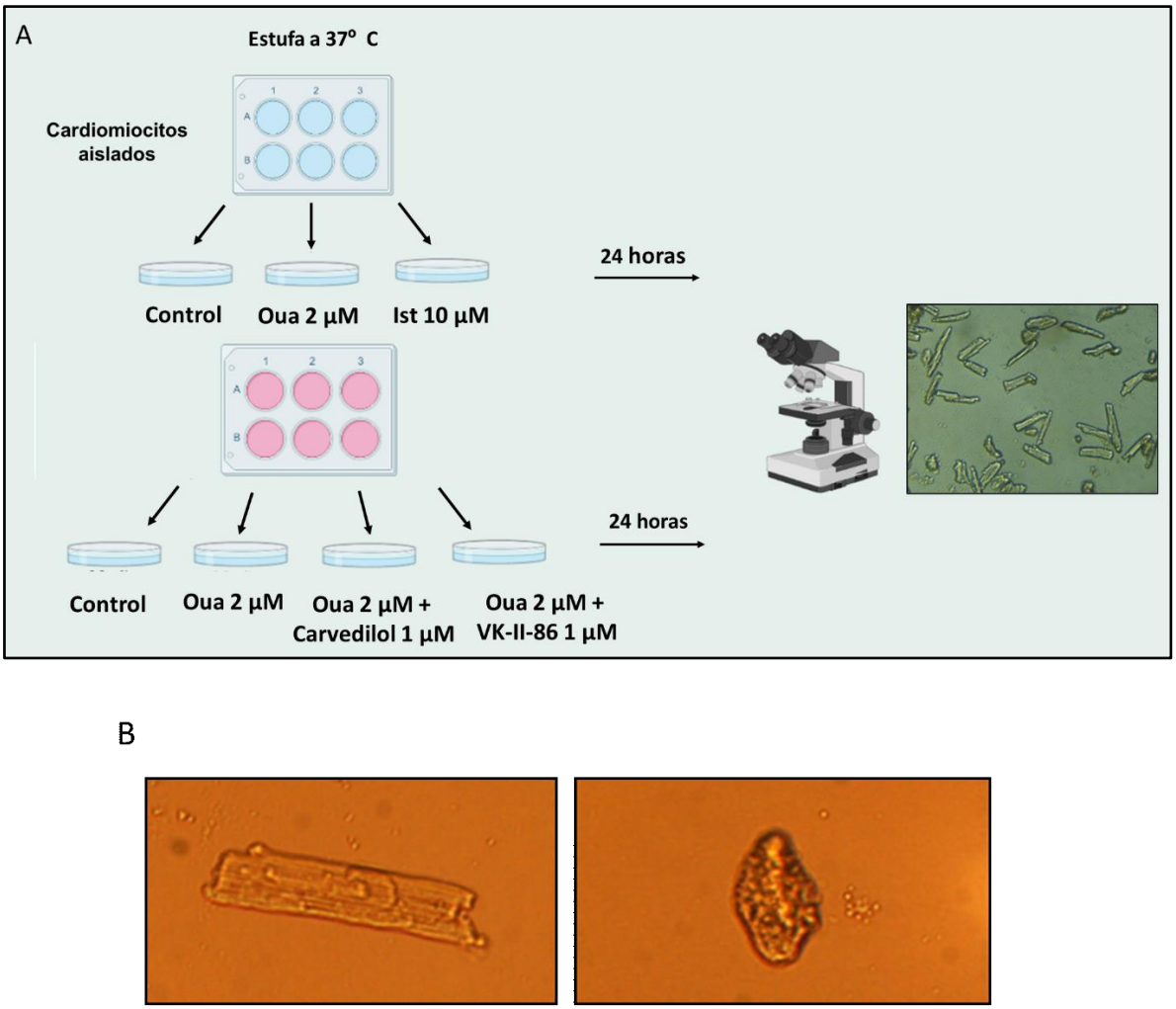

Figura 10: *A. Esquema representativo del protocolo de cultivo primario de cardiomiocitos aislados, sembrados en placas de Petri individuales contenidos en medio de cultivo, con o sin el agregado de fármacos, conservados en estufa durante 24 horas. B. Imágenes representativas de un miocito cardíaco de rata vivo (izquierda) y otro muerto (derecha), con un 40X de aumento.*

7. Evaluación de la muerte celular por apoptosis

En células cultivadas en presencia o ausencia de carvedilol o VK-II-86, la muerte celular por apoptosis fue evaluada adicionalmente mediante la detección de activación de caspasa 3 por fluorescencia. Esta caspasa es una efectora final de la cascada apoptótica [151]. La actividad de la misma fue determinada utilizando un kit comercial (PhiPhiLux® G1D2 de OncoImmunin). Se añadieron 2,5 µmol/l del sustrato Phiphilux a cada placa de cultivo y se dejó durante 1 hora en

estufa a 37 °C. Luego, los miocitos fueron lavados suavemente y se tomaron imágenes mediante un microscopio de fluorescencia.

8. Análisis estadístico

Los resultados promedio se expresan como la media ± error estándar. Para estudios de significación estadística se utilizó el test de Student en caso de dos muestras, y el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el post test de Tukey-Cramer para comparar más de dos muestras. El procesamiento estadístico de los datos obtenidos para cuantificar la proporción de miniondas se realizó con la prueba exacta de Fisher. Todo el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad prism y en todos los casos de consideró $p<0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Istaroxime

1. 1 El tratamiento agudo con 10 μM de istaroxime aumenta la contractilidad de forma semejante a 2 μM de ouabaína

Previamente se ha demostrado que la concentración de 2 μM de ouabaína corresponde a una dosis terapéutica en cardiomiocitos de ratón [3,25] capaz de provocar un efecto inotrópico positivo moderado [3]. Sin embargo, si se utiliza de forma sostenida, esta concentración puede asociarse a la activación de CaMKII e inducción de apoptosis en cardiomiocitos [2,3]. A su vez, en esta especie animal se ha reportado que entre 4 y 10 μM de istaroxime corresponden a concentraciones terapéuticas, es decir que provocan un efecto inotrópico moderado [136].

Con el fin de poder comparar los mecanismos subcelulares que explican el diferente perfil de seguridad de ouabaína y de istaroxime, en primer lugar, nos propusimos encontrar concentraciones de ambos compuestos capaces de inducir una respuesta inotrópica equivalente en cardiomiocitos de rata. Para evaluar los efectos agudos que el tratamiento con ouabaína e istaroxime provoca sobre la función contráctil, registramos la amplitud de acortamiento celular en cardiomiocitos ventriculares estimulados eléctricamente a 1 Hz y perfundidos con una solución de buffer Hepes. Luego de 5 minutos de estabilización de la función contráctil mediante la circulación continua de esta solución, se continuó la perfusión con el agregado de ouabaína o istaroxime. Tras 10 minutos de exposición a las drogas, medimos el aumento en la amplitud de acortamiento celular con respecto a la longitud basal previa al agregado de las drogas. En la ***figura 11A*** pueden observarse trazos representativos del registro continuo del acortamiento de cardiomiocitos. En estas imágenes puede verse que ambas drogas promovieron un aumento en la amplitud de acortamiento, demostrando el

efecto inotrópico positivo de los dos tratamientos, en concordancia con los datos previos obtenidos por otros grupos de trabajo [136].

En un primer ensayo, las células habían sido tratadas con istaroxime 4 µM, mostrando un efecto inotrópico de 8,1 ± 4,9% (n=9 células). Posteriormente, se probaron dosis mayores (10 µM) del compuesto. Como se ve en la **figura 11B**, determinamos que después de 10 minutos de perfusión, ouabaína 2 µM e istaroxime 10 µM inducen un efecto inotrópico equivalente (38.44 ± 8.02 % y 38.63 ± 8.93 % respectivamente, n=15-23 células extraídas de 8-10 corazones diferentes). Por lo tanto, concluimos que estas concentraciones son equiinotrópicas y fueron las utilizadas para continuar nuestros experimentos.

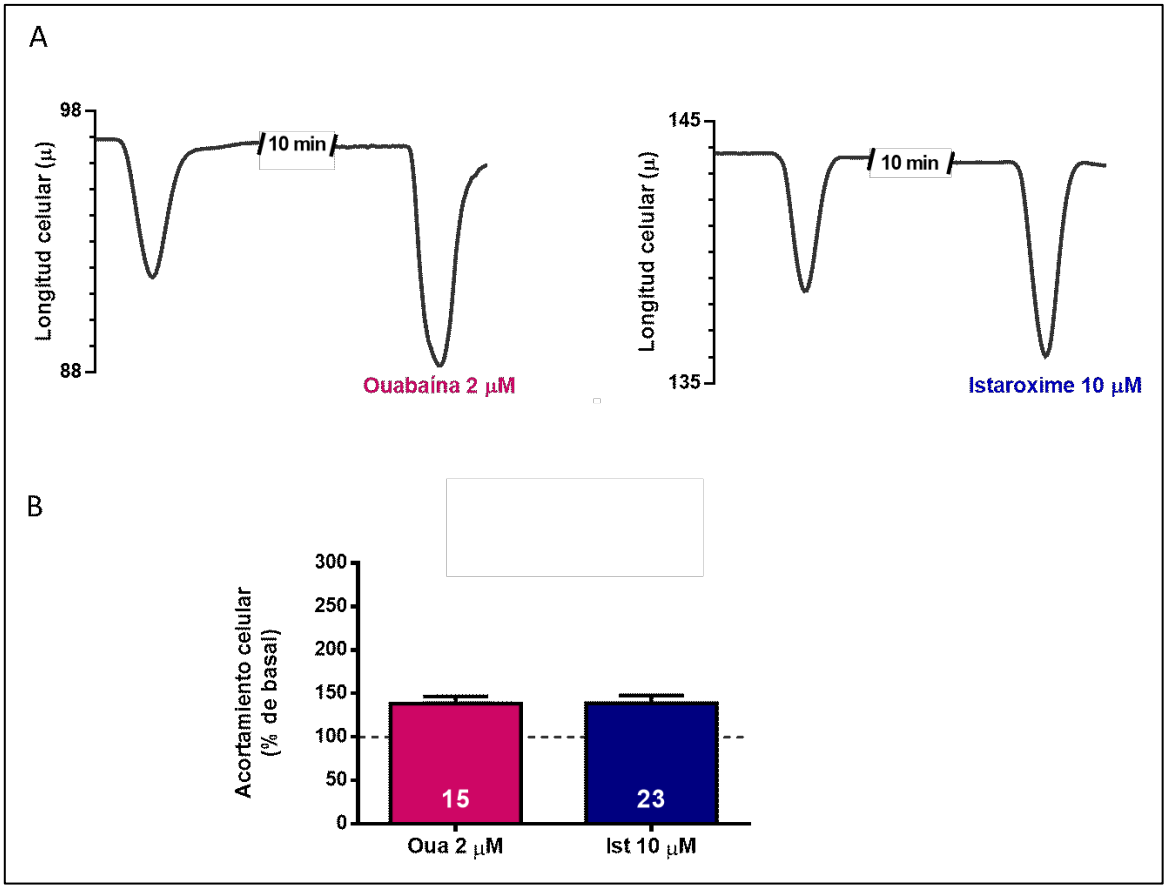

Figura 11: *Trazos representativos del registro de acortamiento celular (fig. A) y datos promedio (fig. B) del efecto de ouabaína (oua) e istaroxime (ist) sobre la amplitud de la contracción de los cardiomiocitos antes y después de 10 minutos de perfusión con las drogas mencionadas (ouabaína: Hepes Ca^{2+} 1 mM + ouabaína 2 µM; istaroxime: Hepes Ca^{2+} 1 mM + istaroxime 10 µM). Los números en las barras indican el número de células individuales analizadas en cada grupo experimental. P > 0.5 considerado no significativo.*

Por otro lado, mediante este protocolo también se evaluó el porcentaje de cambio en el parámetro de relajación TAU promovido por el tratamiento farmacológico mencionado. Como se mencionó previamente, este parámetro es un indicador de la velocidad de relajación de la célula. La ***figura 12*** muestra que el efecto en la relajación celular observado fue significativamente diferente al comparar ambos fármacos. Mientras que no se observaron cambios significativos en el caso del tratamiento con ouabaína, istaroxime provocó una reducción del TAU, indicando que aceleró el tiempo de relajación celular (n=15-23 células extraídas de 8-10 corazones diferentes). Estos resultados son compatibles con el efecto relajante o lusitrópico de istaroxime descripto previamente por otros grupos en modelos clínicos y preclínicos.

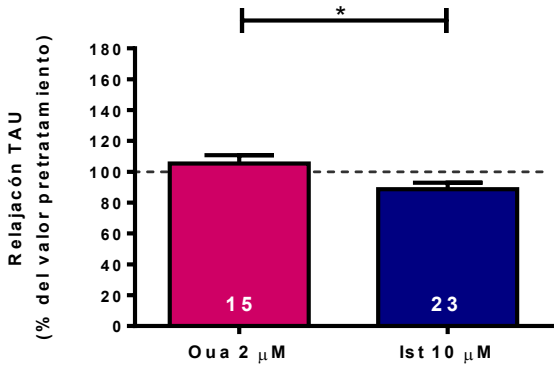

Figura 12: *Valores promedio del efecto de concentraciones equiinotrópicas de ouabaína (Oua) e istaroxime (Ist) en la relajación de los cardiomiocitos evaluada mediante el parámetro de relajación TAU. Los números en las barras corresponden al número de células individuales utilizadas en cada grupo experimental. * = p <0.05.*

En base a estos resultados, concluimos que ouabaína 2 μM e istaroxime 10 μM son concentraciones equiinotrópicas pero que presentan diferente efecto lusitrópico, siendo istaroxime el único que induce un efecto relajante.

1.2 El tratamiento con istaroxime no induce la muerte de cardiomiocitos

Debido a que está descripto que la exposición de miocitos a ouabaína lleva a la muerte de cardiomiocitos [3], estudiamos si el tratamiento con istaroxime también induce la pérdida de los mismos. Para evaluar esto, cultivamos miocitos aislados de rata adultas en presencia de ouabaína o istaroxime a las concentraciones equiinotrópicas descriptas anteriormente (ouabaína 2 μM e istaroxime 10 μM). La dosis de 2 μM de ouabaína y el tiempo de cultivo (24 horas) utilizados para la evaluación de la viabilidad se eligieron en base a que, a esta concentración, nuestro grupo observó en trabajos previos un efecto inotrópico positivo moderado sin presencia de actividad arritmogénica tóxica [3].

En primer lugar, se cuantificó la viabilidad celular mediante la evaluación morfométrica ya descripta. Se consideraron cardiomiocitos viables a aquellos en los que se observara el patrón sarcomérico conservado y a aquellas cuya relación entre el largo y ancho fuera mayor a 3.

La ***figura 13*** muestra imágenes representativas y datos promedio de la viabilidad celular luego de 24 horas de cultivo celular en presencia y ausencia de ouabaína e istaroxime. Como puede observarse en esta imagen, contabilizamos los siguientes porcentajes de viabilidad celular: control sin tratamiento farmacológico 52 ± 2.5%; ouabaína 2 μM 33 ± 3%; istaroxime 10 μM 46 ± 3% respectivamente (n=11, 9 y 6 cultivos respectivamente, cada uno correspondiente a un corazón). De este modo, podemos determinar que solamente se produjo una reducción significativa de la viabilidad celular en presencia de ouabaína 2 μM, mientras que dicha reducción no se detectó en nuestras condiciones experimentales en presencia de istaroxime 10 μM y tampoco decayó significativamente cuando la concentración de istaroxime se duplicó a 20 μM (42 ± 6%; n=4 cultivos).

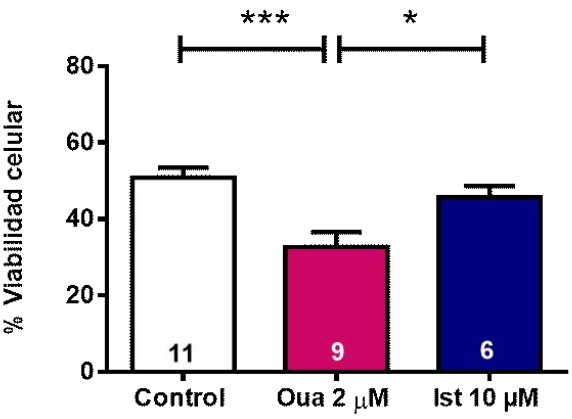

Figura 13: *Fotos representativas de cultivo primario de cardiomiocitos de rata y datos promedio que permiten observar el porcentaje de viabilidad celular de cada grupo evaluado a través del análisis morfométrico de los cardiomiocitos después de 24 horas de cultivo en ausencia (control) presencia de ouabaína o istaroxime. Los números en las barras indican el número de cultivos realizados para cada grupo experimental. *** = $p < 0.001$ y * = $p < 0.05$.*

Como se ha comentado, la apertura del poro de transición mitocondrial representa un evento que conduce a la apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial está altamente regulada y controlada por las interacciones entre diferentes proteínas de la familia Bcl-2, siendo Bax uno de los miembros proapoptóticos y Bcl-2 uno antiapoptótico. Por este motivo, el índice Bax/Bcl-2 es utilizado rutinariamente como indicador de la inducción de apoptosis. Con el fin de investigar el grado de activación de la cascada apoptótica, realizamos la cuantificación de las proteínas Bax y Bcl-2 por western blot en muestras obtenidas de cardiomiocitos aislados después de 1 hora de incubación de estas células en ausencia o presencia de ouabaína o istaroxime a las concentraciones

equiinotrópicas mencionadas. Los geles representativos y los resultados promedio de la cuantificación proteica se muestran en la ***figura 14***. A diferencia de lo sucedido con ouabaína, que aumentó significativamente el índice Bax/Bcl-2 (n=4 blots por grupo experimental, cada uno correspondiente a 1 corazón), la utilización de istaroxime no se asoció a un incremento significativo del mismo, sugiriendo que no induce apoptosis en cardiomiocitos.

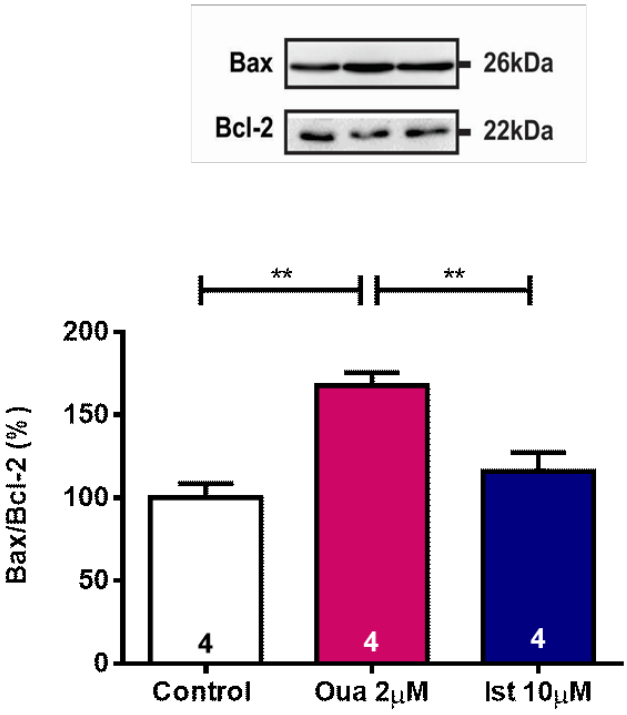

Figura 14*: Western blots representativos y resultados promedio de la cuantificación de las proteínas Bax y Bcl-2 en cardiomiocitos control o después de 1 hora de tratamiento en con ouabaína o istaroxime. El índice Bax/Bcl-2 se utilizó como indicador de apoptosis. Dentro de las barras se detalla el número de blots realizados para cada grupo experimental. **= p< 0.01.*

Por lo tanto, en base a los resultados hasta aquí obtenidos, concluimos que a diferencia de lo que sucede con ouabaína, el tratamiento con istaroxime no provoca un impacto significativo en la viabilidad de cardiomiocitos ni induce activación de la cascada apoptótica.

1.3 El tratamiento agudo con istaroxime en dosis terapéuticas no induce activación de CaMKII

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación demostraron que los digitálicos son capaces de promover la activación de la enzima CaMKII en cardiomiocitos cultivados durante 24 horas en presencia de ouabaína 2 μM [3]. Con el fin de establecer si el tratamiento agudo con istaroxime también es capaz de activar a esta quinasa, se realizó inmunodetección por western blot en cardiomiocitos incubados con ouabaína 2 μM o istaroxime 10 μM durante 1 hora. En primer lugar, se utilizó un anticuerpo específico para medir la autofosforilación de CaMKII en el residuo Thr287 (p-CaMKII), ya que se sabe que la fosforilación en este sitio reduce el efecto inhibidor del dominio regulador sobre el dominio catalítico, resultando en la activación de la enzima. Por otro lado, ya se ha mencionado que CaMKII también puede ser activada por oxidación [118]. Debido a que la inhibición farmacológica de la NKA promueve un aumento en la producción de ROS, que han demostrado ser capaces de oxidar y activar a esta enzima [70,71], en paralelo medimos la activación de CaMKII por oxidación del sitio metionina 281/282 (M281 / 282) (oxi-CaMKII).

Las ***figuras 15A y 15B*** muestran los blots originales y los porcentajes promedio de p-CaMKII y oxi-CaMKII expresado respecto del control sin tratar, tomando a la proteína GAPDH como control de carga. Se puede ver que la incubación con ouabaína 2 μM aumentó significativamente tanto la forma fosforilada de la quinasa (p-CaMKII) como la oxidada (oxi-CaMKII), corroborando resultados previos [2,118]. Por el contrario, istaroxime 10 μM no provocó dicha activación. Del mismo modo, debido a que el residuo treonina 17 (Thr17) de la proteina PLN es una diana de la fosforilación por p-CaMKII, se cuantificó a PLN fosforilada en este sitio como índice de actividad de esta quinasa sobre sus proteínas blanco. En la ***figura 15C*** muestra el mismo efecto diferencial con ouabaína e istaroxime cuando se estudió la fosforilación de este sustrato específico (n=4 blots por grupo experimental, utilizando 4 corazones diferentes).

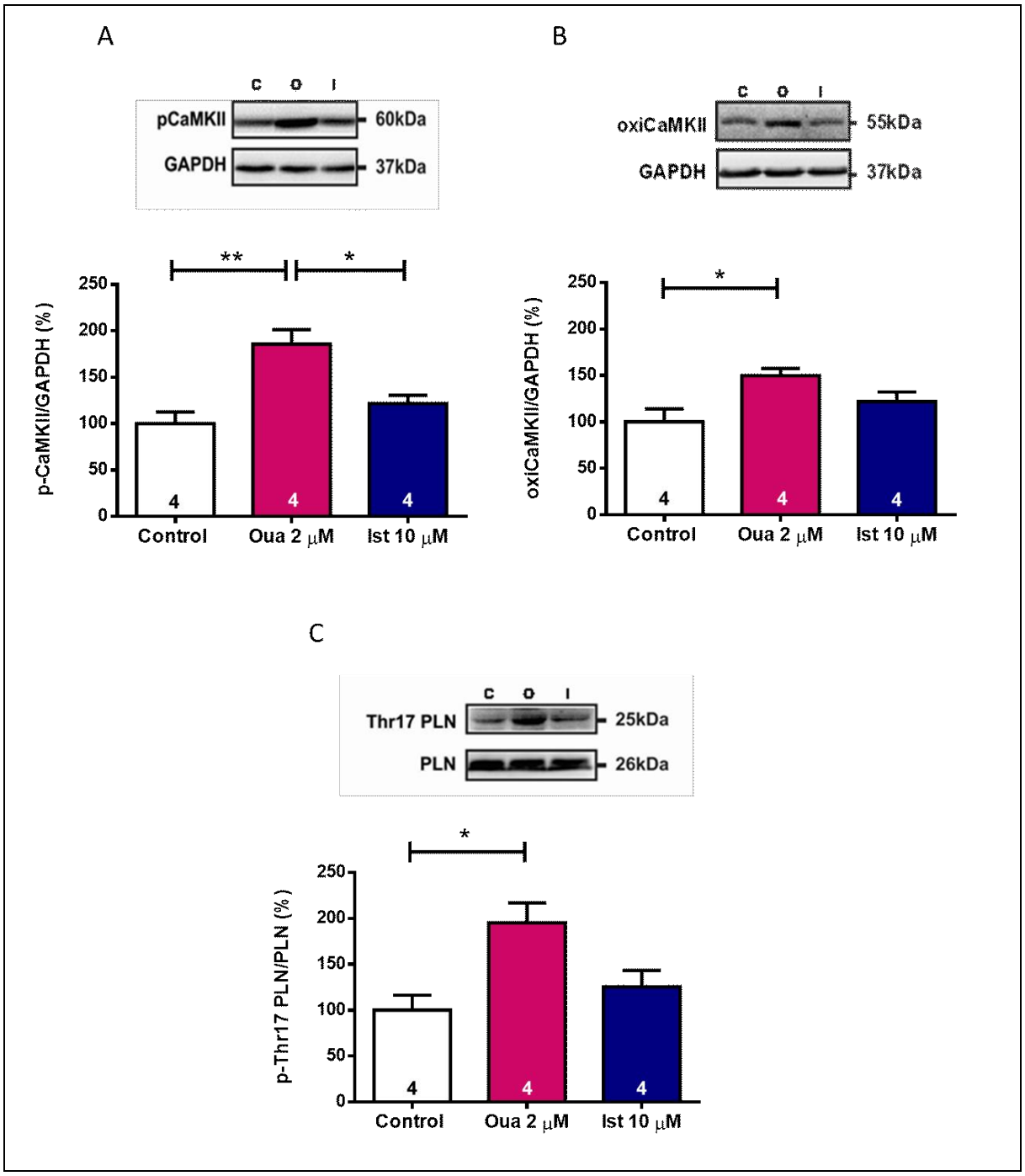

Figura 15: *Blots representativos y datos promedios del efecto promovido por el tratamiento con ouabaína 2 µM e istaroxime 10 µM en la fosforilación de CaMKII en Thr287 (p-CaMKII) (fig. A), en la oxidación de CaMKII en M281 / 282 (oxi-CaMKII) (fig. B) y en la fosforilación de PLN en Thr17 (fig. C). Dentro de las barras se detalla el número de blots realizados para cada grupo experimental. * = p <0.05, ** = p <0.01.*

Con estos datos demostramos que a diferencia de lo que sucede con ouabaína, el tratamiento con concentraciones terapéuticas de istaroxime no induce la activación de CaMKII.

1.4 Dosis equiinotrópicas de ouabaína e istaroxime difieren en la liberación proarritmogénica de calcio

Ya se ha comentado que los RyR2 pueden abrirse de forma espontánea y transitoria ocasionando la liberación diastólica de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol, ya sea en forma espacialmente localizada, llamado chispa de Ca^{2+}, o en forma propagada a través de la célula, conocida como onda de Ca^{2+}. Las características de dicha liberación, tales como la frecuencia, tamaño y velocidad, pueden ser evaluadas en tiempo real por microscopía confocal mediante el uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} con la finalidad de evaluar la actividad del RyR2.

Previamente nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento con ouabaína produce un aumento significativo de chispas y ondas de Ca^{2+} [2]. Teniendo en cuenta la importancia ya mencionada de esta liberación diastólica de Ca^{2+} en la arritmogénesis y en la inducción de muerte celular de los digitálicos, decidimos comparar el efecto de concentraciones equiinotrópicas de ouabaína e istaroxime sobre la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} en cardiomiocitos de rata. Para ello, las células fueron incubadas durante 1 hora en presencia de los fármacos mencionados. Además, fueron cargadas con Fluo-4, un indicador sensible al Ca^{2+}, y la liberación de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol fue registrada a través del aumento en la señal fluorescente. De esta manera, tras 10 minutos iniciales de marcapaseo a 1 Hz, monitoreamos la frecuencia de chispas y ondas durante 30 segundos (10 barridos de 3 segundos cada uno) luego de transcurrido 1 minuto sin estímulo eléctrico y perfundiendo las células durante toda la duración del experimento con solución buffer Hepes Ca^{2+} 1 mM (grupo control) o con soluciones de Hepes Ca^{2+} 1 mM con las drogas en estudio (ouabaína 2 μM o istaroxime 10 μM).

La ***figura 16A*** muestra imágenes representativas de microscopia confocal registradas, observándose en la imagen superior ejemplos de chispas de Ca^{2+} pequeñas y esporádicas que se presentaron en un cardiomiocito control. La imagen central, en cambio, muestra un ejemplo de onda de Ca^{2+} secundaria al uso de ouabaína. La figura **16B** permite observar los datos promedio del análisis de las mismas.

Existe evidencia contundente que indica que el tratamiento con ouabaína provoca un aumento en la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} [2]. En concordancia con esos antecedentes, aquí observamos que las células expuestas a ouabaína presentaron una frecuencia significativamente más alta de chispas y ondas de Ca^{2+} en comparación con las células del grupo control. Por el contrario, la exposición a istaroxime a concentración equiinotrópica no generó este aumento de forma significativa. Se puede observar también que las células control presentaron baja frecuencia de ambos parámetros (n=15,18 y 16 células, extraídos de 6 corazones).

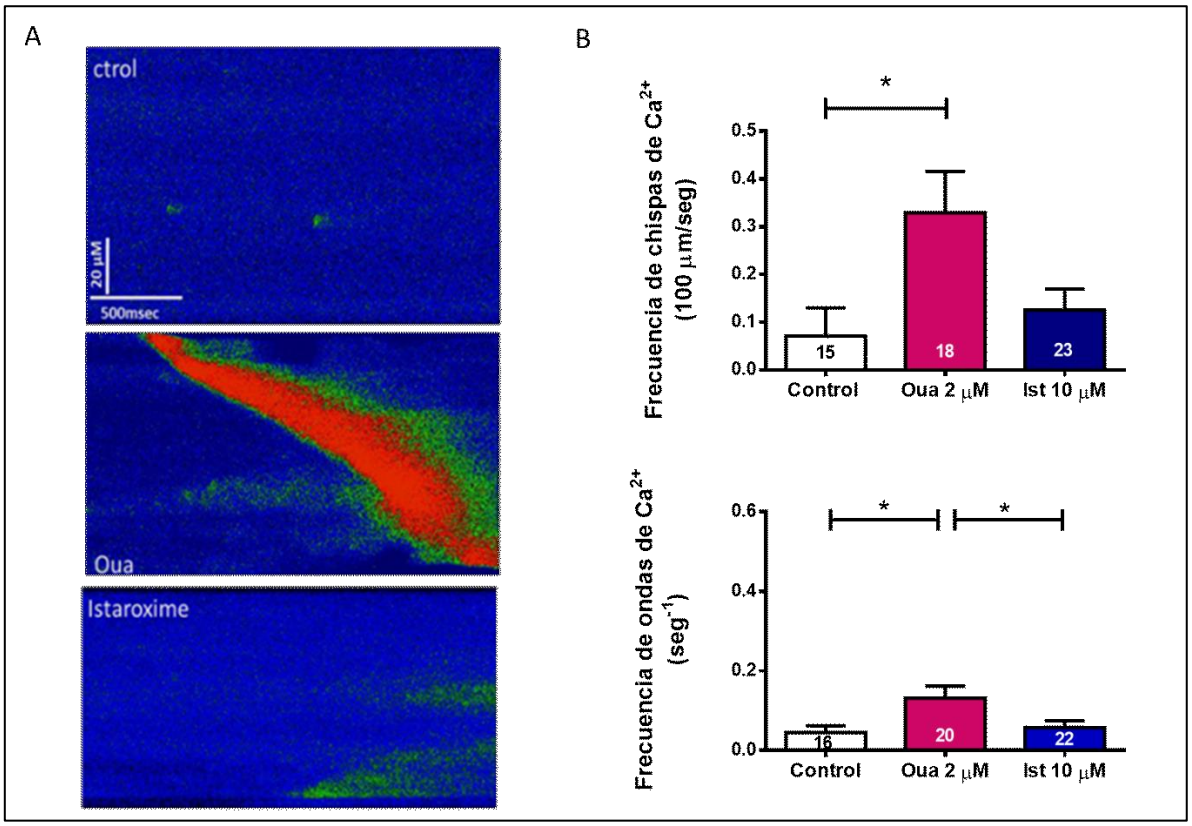

Figura 16: *A. Imágenes bidimensionales representativas de microscopia confocal donde se observa liberación diastólica de Ca^{2+}. B. Valores promedio que muestran la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} en miocitos ventriculares control y en aquellos tratados con ouabaína o istaroxime. Los números en las barras muestran el número de miocitos individuales utilizados en cada grupo experimental. *= $p< 0.05$.*

Estos resultados sugieren que dosis equiinotrópicas de ouabaína e istaroxime difieren en la liberación proarritmogénica de Ca^{2+} y esto podría explicar la menor incidencia de arritmias descripta por otros grupos en modelos animales in vivo y en ensayos clínicos en humanos [129,130,131].

1.5 El tratamiento con istaroxime impide la propagación de las ondas de calcio

Como se comentó anteriormente, la asociación de SERCA con su proteína moduladora PLN inhibe la recaptación de Ca^{2+} desde el citosol hacia el RS, mientras que su disociación da como resultado una aceleración de este proceso.
La aceleración de la retoma de Ca^{2+} por SERCA dada por la disrupción de la interacción SERCA-PLN es el mecanismo descripto para explicar la baja arritmogenicidad de istaroxime [135]. Debido a que diversos trabajos han demostrado que la captación mejorada de Ca^{2+} hacia el RS rompe las ondas de Ca^{2+} transformándolas en ondas no propagables o abortadas (también denominadas “miniondas” o “miniwaves”) y que éstas son menos arritmogénicas [152,153], el siguiente paso fue evaluar si la perfusión con istaroxime genera la aparición de estas ondas características, lo que podría explicar su menor arritmogenicidad. La proporción de ondas de Ca^{2+} no propagables que se visualizaron en cardiomiocitos incubados durante 1 hora con ouabaína y en aquellos tratados con istaroxime fueron cuantificadas. Adicionalmente, buscamos evaluar si la aceleración de la retoma de Ca^{2+} con istaroxime se asocia a una reducción de la velocidad de las ondas de Ca^{2+}.

En la ***figura 17*** se pueden ver imágenes representativas de microscopía confocal que muestran a la izquierda el desarrollo de una onda de Ca^{2+} originada a partir de una chispa de Ca^{2+} y que se propaga en ambas direcciones a lo largo de la célula, mientras que a la derecha se representa el aumento de la señal de Ca^{2+} citosólico que se produce durante su desarrollo y propagación. Estos experimentos permitieron observar que el tratamiento con istaroxime se acompañó de un menor incremento en el Ca^{2+} citosólico constituyente de estas ondas. Esto no se asoció con cambios significativos en la velocidad de propagación de las mismas (***figura 18***) (n=8, 29 y 14 miocitos, de 6 corazones).
Además, las células incubadas con istaroxime presentaron un porcentaje significativamente mayor de miniondas (***figura 19***).

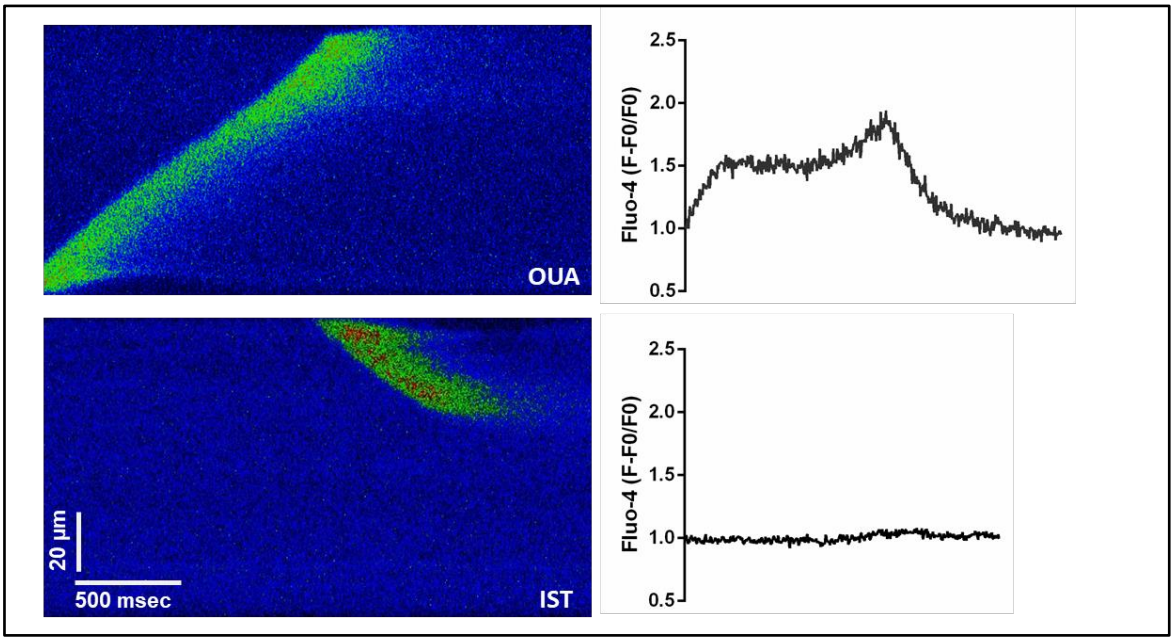

Figura 17: *Imágenes bidimensionales representativas de microscopia confocal que muestran la propagación de ondas de Ca^{2+} (izquierda) y los cambios asociados en la señal emitida por Fluo-4 (derecha).*

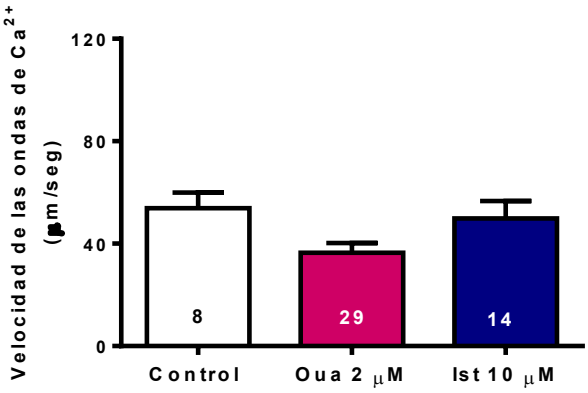

Figura 18: *Promedios de la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{2+} observadas durante el tratamiento con ouabaína e istaroxime. Dentro de las barras se detalla el número de células analizadas para cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas en las distintas condiciones experimentales.*

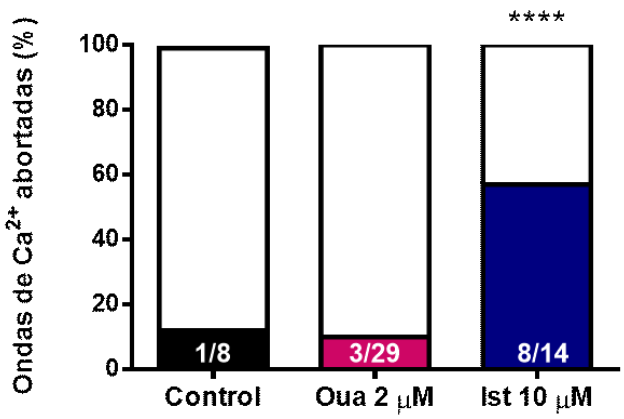

Figura 19: *Porcentaje de ondas de Ca^{2+}abortadas (miniondas) observadas en miocitos control y en presencia de ouabaína e istaroxime. Dentro de las barras se detalla el número de células analizadas para cada grupo experimental. ****P<0.0001.*

En conjunto, estos resultados sugieren que istaroxime es menos arritmogénico que ouabaína a concentraciones que generan un efecto inotrópico semejante, al no promover un aumento significativo de chispas y ondas de Ca^{2+} y al impedir la propagación de estas últimas, transformándolas en ondas no propagables.

1.6 El efecto de ouabaína e istaroxime difiere aún en ausencia de fosfolamban

Para comprender mejor los mecanismos subyacentes al diferente perfil arritmogénico de istaroxime, realizamos experimentos utilizando ratones transgénicos que no expresan la proteína fosfolamban (PLN knockout o PLN-KO) [154]. Esta cepa se caracteriza por una mayor retoma de Ca^{2+} por SERCA, una mayor carga de Ca^{2+} en el RS, y de forma característica, un alto porcentaje de ondas de Ca^{2+} abortadas o miniondas. Teniendo en cuenta que la disociación entre SERCA y su proteína inhibitoria PLN es el mecanismo principal descripto para explicar el menor potencial arritmogénico de istaroxime, esperaríamos encontrar en estas células una falta o disminución del efecto del fármaco.

La frecuencia de ondas de Ca^{2+} fue medida en cardiomiocitos aislados de estos animales del mismo modo que se describió en la sección anterior. La ***figura 20A*** muestra imágenes bidimensionales obtenidas por microscopía confocal y registros de Ca^{2+} citosólico registrados en cardiomiocitos PLN-KO, después de 1 hora de incubación en presencia o ausencia de ouabaína 2 μM o istaroxime 10 μM. Los resultados promedio mostrados en la ***figura 20B*** demuestran que la diferencia significativa observada en la frecuencia de onda de Ca^{2+} entre los cardiomiocitos tratados con ouabaína e istaroxime permanece presente aun cuando estas células carecen de PLN. Además, en relación a lo discutido anteriormente con respecto a la aceleración de la retoma de Ca^{2+} hacia el RS y la ruptura de las ondas de Ca^{2+}, los miocitos PLN-KO mostraron un alto porcentaje de ondas de Ca^{2+} abortadas, en concordancia con lo demostrado por otros grupos de trabajo [152,153]. Sorprendentemente, este porcentaje fue mayor en las células tratadas con istaroxime (100% de las ondas) que en las células tratadas con ouabaína (67% de las ondas) (n=8,18 y 13 células, de 6 corazones).

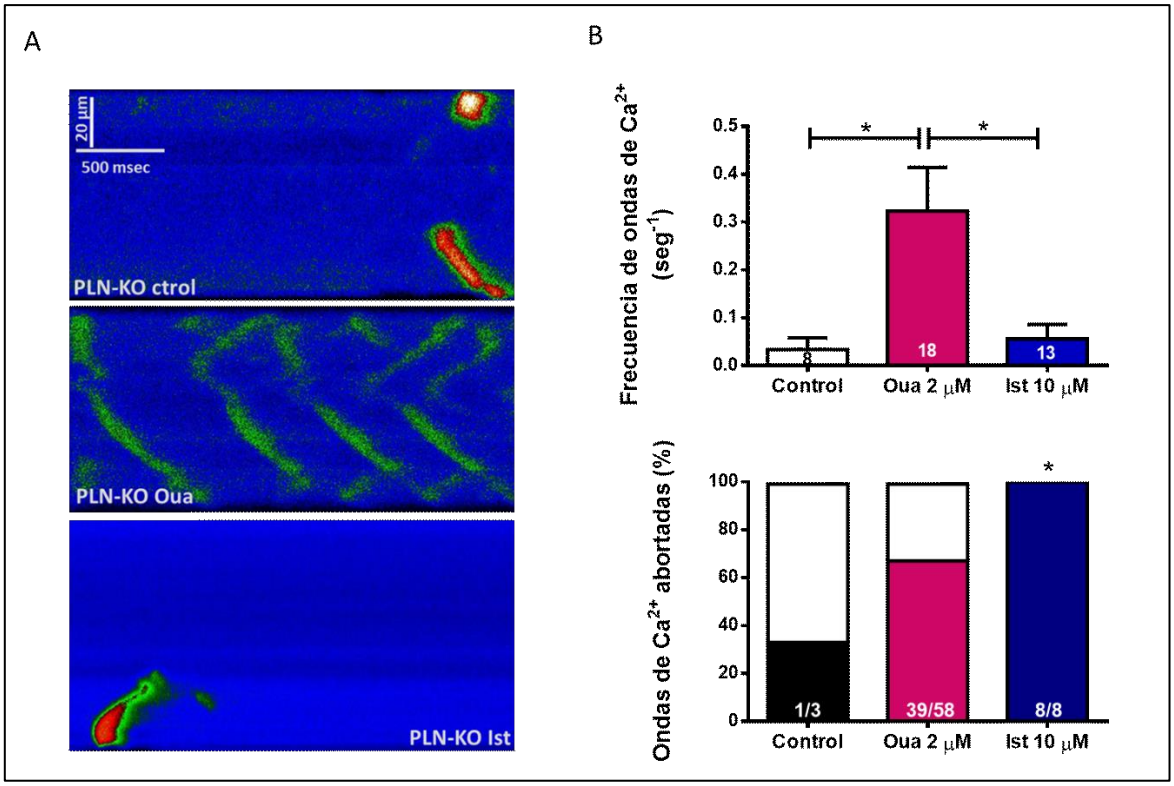

Figura 20: *Imágenes representativas (fig. A) y resultados promedio (fig. B) que muestran la incidencia de ondas de Ca^{2+} (ondas completas o mini ondas) en células control y tratadas con ouabaína o istaroxime aisladas de ratones PLN-KO. Dentro de las barras se detalla el número de células analizadas para cada grupo experimental. *= $p< 0.05$.*

Por lo tanto, istaroxime conservó su menor liberación arritmogénica de Ca^{2+} incluso en ausencia de la proteína PLN, sugiriendo que además de la disrupción de la interacción SERCA-PLN, otro mecanismo contribuiría al diferente impacto que ejercen ambos fármacos sobre la liberación espontánea Ca^{2+}.

2. Estabilización del RyR2: VK-II-86

2.1 La estabilización del RyR2 no modifica el efecto inotrópico positivo de los digitálicos

La dosis de 50 µmol de ouabaína ha demostrado ser arritmogénica [155] y nuestro laboratorio ha utilizado estas concentraciones en trabajos anteriores con el fin de estudiar los mecanismos subcelulares implicados en las arritmias inducidas por digitálicos, ya que esta dosis fue capaz de producir arritmias de manera sistemática y reproducible [2]. Por esta razón, esta fue la concentración de ouabaína utilizada en los experimentos que se describen a continuación, que se realizaron con el fin de investigar la eficacia de la estabilización del RyR2 en la reducción de la liberación arritmogénica de Ca^{2+} y de la muerte de miocitos inducidas por ouabaína.

Como se describió previamente, el tratamiento con ouabaína aumenta la tendencia a la apertura espontánea de los RyR2, permitiendo la pérdida diastólica de Ca^{2+} en forma de chispas y ondas. Debido a la importancia de estas en las arritmias clínicas por GC y teniendo en cuenta la capacidad previamente descripta de carvedilol y VK-II-86 para modular las propiedades del RyR2, nos propusimos estudiar la eficacia de la estabilización de este canal para prevenir la liberación arritmogénica de Ca^{2+} inducida por dosis tóxicas de ouabaína.

Es importante remarcar que a diferencia de nuestros experimentos estudiando istaroxime, que se describen en la primera sección de resultados y para los cuales se trabajó con dosis de ouabaína consideradas terapéuticas (2 µM), nuestro objetivo ahora no fue estudiar un fármaco alternativo a los digitálicos, sino evaluar si la combinación de GC a dosis arritmogénicas (50 µmol) con estabilizadores del RyR2 previenen la cardiotoxicidad de los primeros. Por otro lado, la dosis de carvedilol que ha demostrado efectos modulatorios sobre el RyR2 se encuentra en el rango de 0.3 a 1 µM. Se determinó que el pretratamiento de miocitos con 1 µM de carvedilol o con VK-II-86 durante 30 minutos previos a la exposición a digitálicos genera un efecto antiarrítmico [146]. Por ello, elegimos la concentración

de 1 μM de ambos compuestos estabilizadores para llevar a cabo nuestros experimentos.

Para estudiar si carvedilol afecta el efecto inotrópico positivo de ouabaína, los miocitos fueron perfundidos con una solución de Hepes con el agregado de ouabaína 50 μM y estimulados a 0.5 Hz. De forma consistente con resultados previos, en los trazos representativos del registro del acortamiento celular de la ***figura 21*** se ve que el tratamiento con ouabaína produjo un efecto inotrópico positivo, ya que indujo un aumento en el acortamiento celular (51.9 ± 13.3%) (n= 11-12 células, de 7-10 corazones por grupo). El pretratamiento de los miocitos con 1 μM de carvedilol durante 30 minutos no se asoció a una disminución del efecto observado con ouabaína en la contractilidad.

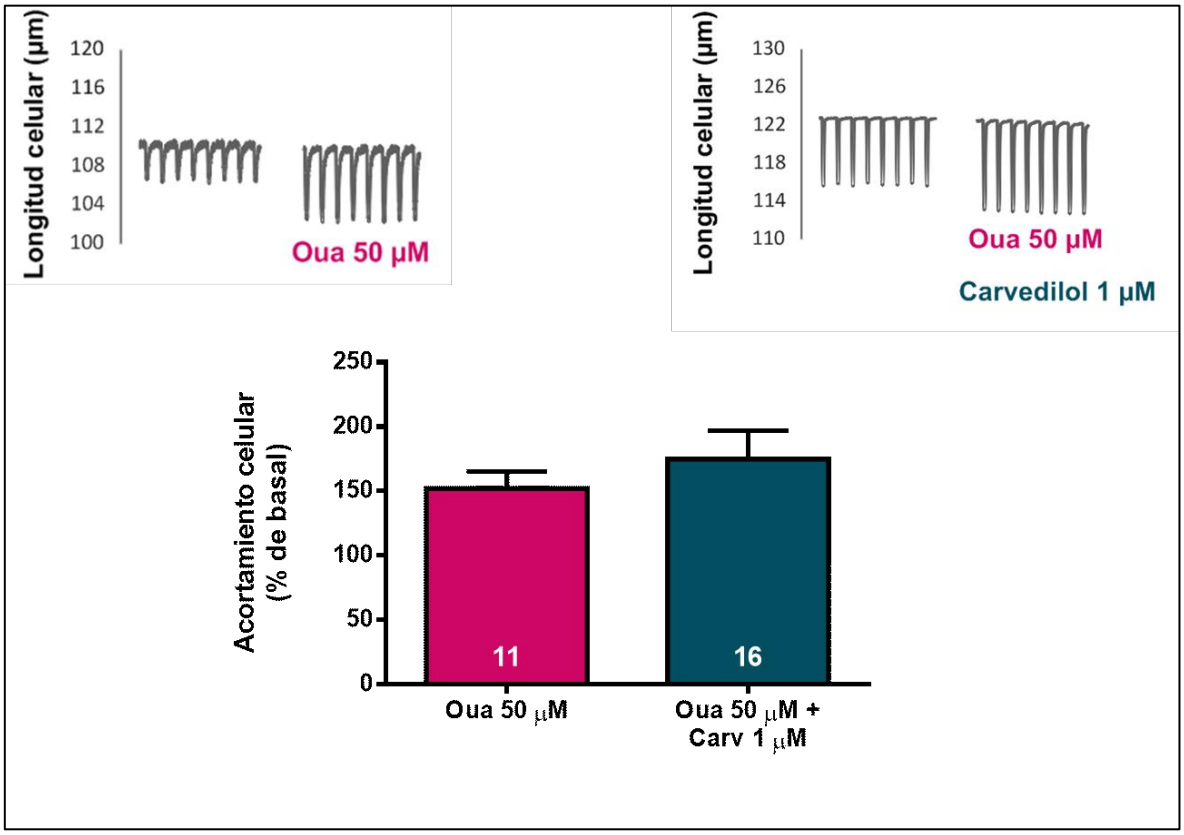

Figura 21: *Trazos representativos y resultados promedio del acortamiento celular durante la perfusión con ouabaína en ausencia y presencia de pretratamiento con carvedilol (Ouabaína: Hepes Ca^{2+} 1 mM + ouabaína 50 μM; Carvedilol: Hepes Ca^{2+} 1 mM + carvedilol 1 μM). El número en las barras indica el número de células analizadas en cada grupo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.*

Si bien el carvedilol ha demostrado efectos antiarrítmicos atribuidas a su capacidad de modular al RyR2, es necesario destacar que las concentraciones requeridas para estabilizar el RyR2 son más altas que las necesarias para su efecto β bloqueante, e inducirían efectos adversos como la bradicardia o la hipotensión. Por esta razón, decidimos enfocar nuestro estudio en su análogo estructural, el VK-II-86, ya que conserva el efecto sobre el RyR2, pero sin tener acción sobre los receptores β, que es el responsable de los eventos adversos mencionados.

De forma semejante a lo observado con el pretratamiento con carvedilol, la preincubación de las células con 1 μM de VK-II-86 tampoco disminuyó el efecto inotrópico de la ouabaína (***figura 22***) (n=11-18 células, de 7-10 corazones por grupo). Para los experimentos con VK-II-86, la perfusión se realizó con una solución de ouabaína a la cual se agregó como dimetil sulfóxido (DMSO), ya que el VK-II-86 se encuentra disuelto en este compuesto. Para todos los experimentos que se mostrarán a continuación en los cuales se trabajó con ouabaína + VK-II-86, este vehículo se agregó en las células control y en aquellas tratadas con ouabaína sola.

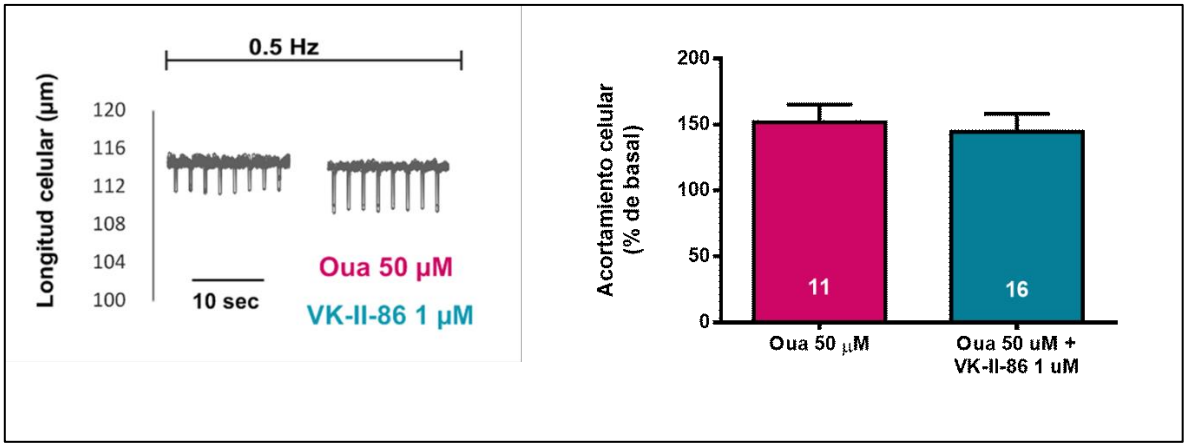

Figura 22: *Trazos representativos y resultados promedio del acortamiento celular de miocitos perfundidos con ouabaína en ausencia y presencia de pretratamiento con VK-II-86 (Ouabaína: Hepes Ca^{2+} 1 mM + ouabaína 50 μM; VK-II-86: Hepes Ca^{2+} 1 mM + VK-II-86 1 μM). El número en las barras indica el número de células analizadas en cada grupo. P > 0,05, considerado no significativo.*

2.2 La estabilización del RyR2 con VK-II-86 reduce el sustrato arritmogénico inducido por ouabaína sin afectar su efecto inotrópico positivo

A continuación, se evaluó el efecto que tiene la estabilización del RyR2 en la liberación diastólica de Ca^{2+} mediante microscopía confocal, del mismo modo que fue evaluado durante el tratamiento agudo con istaroxime (ver apartado III de la sección resultados).

Como se puede observar en los resultados promedio de la ***figura 23***, del mismo modo que en experimentos anteriores, las células tratadas con ouabaína presentaron una frecuencia significativamente más alta de chispas y ondas de Ca^{2+} en comparación con las células no tratadas del grupo control, mientras que este aumento logró ser prevenido mediante preincubación durante 30 minutos con 1 µM de VK-II-86 (n=8-12 células obtenidas de 4-6 corazones por grupo).

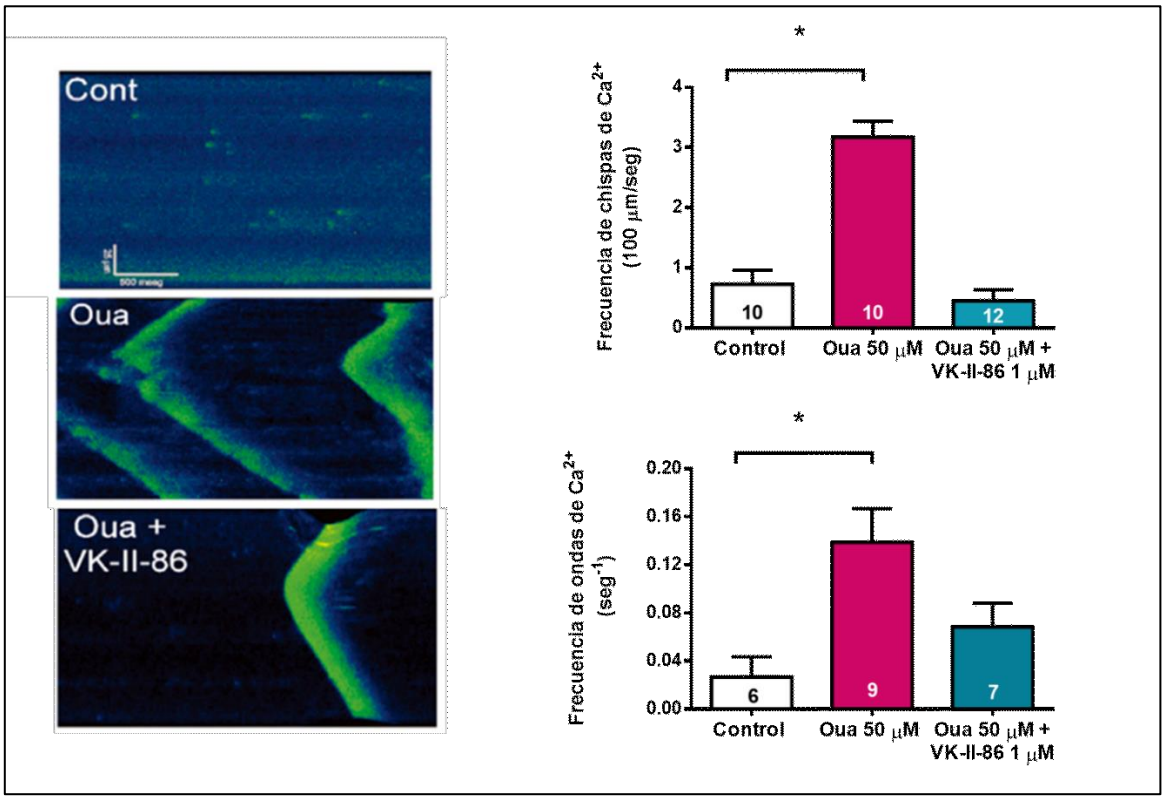

Figura 23: *Fotos de microscopía confocal donde se observan imágenes típicas de ondas de Ca^{2+} (fig. izquierda) y resultados promedio (derecha) de la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} en ausencia de tratamiento (control) en presencia de ouabaína 50 µM o de ouabaína + VK-II-86 (1 µM). *= p< 0.05.*

Por otro lado, mediante la utilización del programa *Sparkmaster* (ver metodología), se evaluaron las características individuales de las chispas de Ca^{2+}: la amplitud, el ancho a la mitad de la altura máxima (full Width at Half Maximum o FWHM en inglés) y la duración a la mitad de la altura máxima (full duration at Half Maximum o FDHM en inglés). La chispa de Ca^{2+} es un evento observable que proporciona una medida directa de la activación de los RyR2 y proporciona información en tiempo real sobre el comportamiento de los mismos. Por lo tanto, la evaluación de las características morfológicas de las chispas mediante estos parámetros brinda información sobre la cantidad del Ca^{2+} liberado, su distribución espacial y temporal.

Mientras que las chispas de Ca^{2+} constituyen eventos localizados de liberación de Ca^{2+} del RS, las ondas de Ca^{2+} se dan cuando un aumento local en la $[Ca^{2+}]_i$ en un lugar de la célula desencadena la apertura sucesiva de múltiples canales de RyR2 en zonas vecinas. Por lo tanto, la velocidad de las ondas de Ca^{2+} puede ser utilizada como una medida de las propiedades de apertura del RyR2 en respuesta al Ca^{2+} citosólico. Por este motivo, adicionalmente se midió la velocidad de las ondas como indicador de la capacidad de apertura de los RyR2 en respuesta al Ca^{2+} citosólico. Si bien VK-II-86 evitó el aumento inducido por la ouabaína en la frecuencia de las chispas y ondas de Ca^{2+}, no afectó la morfología de estas chispas (***figura 24***) (n=205,195 y119 eventos individuales, de 4-6 corazones por grupo experimental) ni tampoco la velocidad de propagación de las ondas observadas (***figura 25)*** (n=8–12 células obtenidas de 4-6 corazones por grupo).

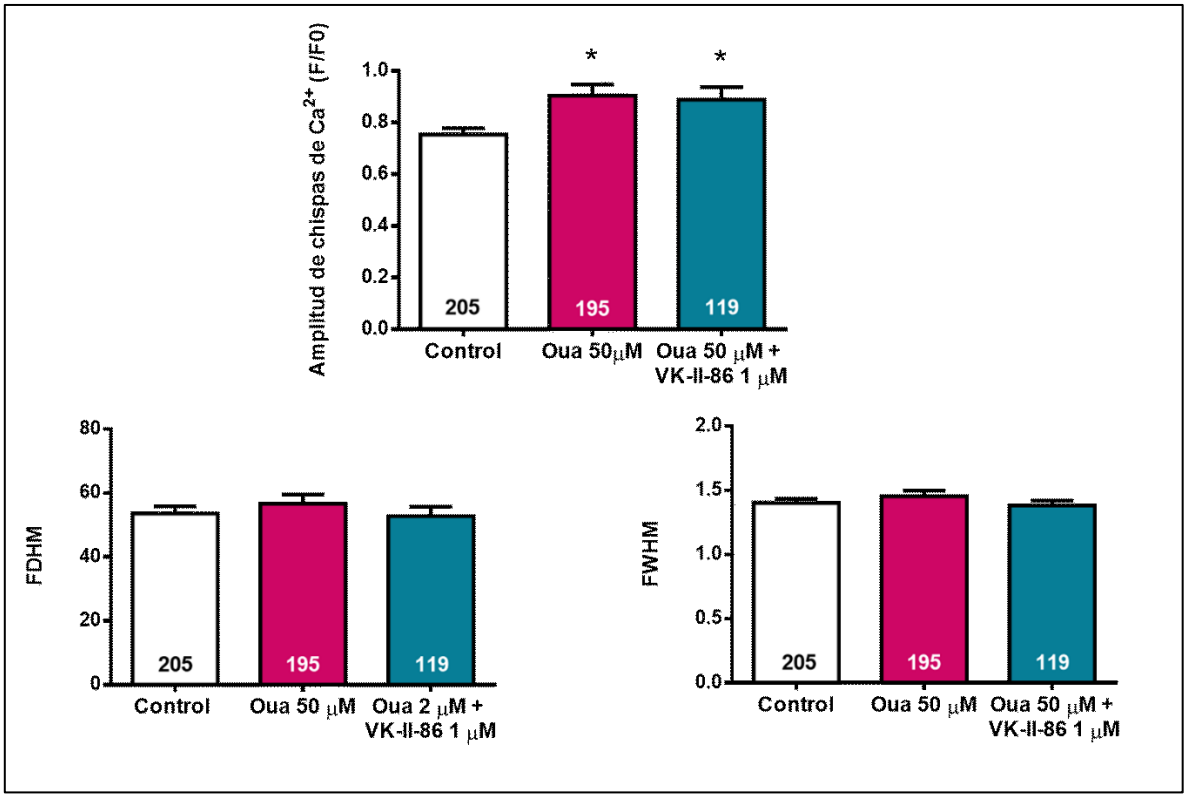

Figura 24: *Gráficos de barra donde se observa el efecto de VK-II-86 en las características individuales de las chispas de Ca^{2+} (arriba: amplitud; abajo: FWHM y FDHM) obtenidas del análisis de imágenes de microscopía confocal. En las barras se indica el número de eventos individuales analizados. No se encontraron diferencias significativas en las distintas condiciones experimentales.*

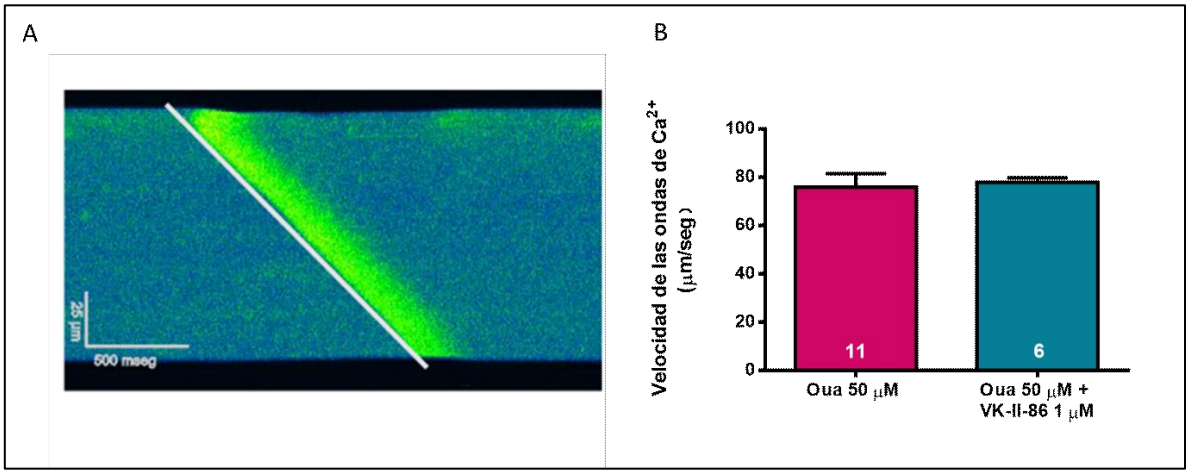

Figura 25: *A. Foto representativa de microscopía confocal que muestra una onda de Ca^{2+} en un miocito tratado con ouabaína 50 µM. La línea blanca marca la pendiente de la onda, y su medición (en µm/seg) fue utilizada para evaluar la velocidad de propagación de la onda. B. Datos promedio de la velocidad de las ondas de Ca^{2+}. No se observaron diferencias significativas.*

2.3 VK-II-86 no afecta la activación de CaMKII

Teniendo en cuenta datos previos de nuestro laboratorio que mostraron que la fosforilación de RyR2 dependiente de CaMKII es un determinante crucial de las arritmias inducidas por digitálicos, nos propusimos estudiar si la estabilización del RyR2 con VK-II-86 afecta la activación de CaMKII inducida por ouabaína, ya que una menor actividad de esta quinasa podría explicar parte de la acción antiarrítmica de estos compuestos.

Con este fin, al igual que lo realizado para evaluar el efecto de istaroxime, medimos el grado de activación de CaMKII por autofosforilación del sitio Thr287 (p-CaMKII) y por oxidación del sitio metionina 281/282 (M281 / 282) (oxi-CaMKII), y también la fosforilación de sus proteínas diana PLN (residuo Treonina 17) y RyR2 (residuo Serina 2814). Observamos en la ***figura 26*** que el aumento inducido por ouabaína en la actividad de CaMKII y en la fosforilación de PLN y RyR2 se conservan en presencia de VK-II-86 (n=4 blots por cada grupo, cada uno correspondiente a un corazón).

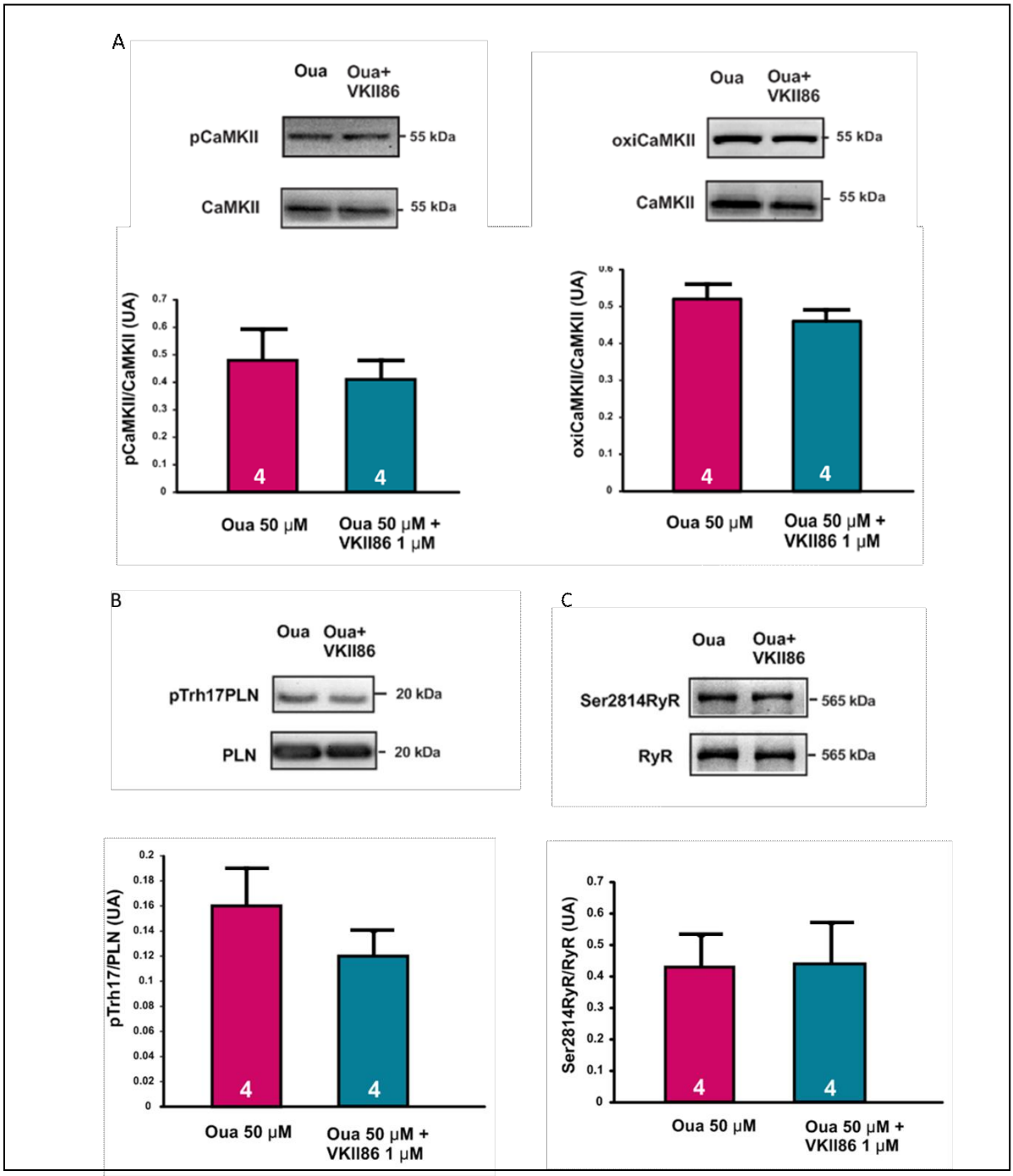

Figura 26: *Western blots representativos y resultados promedio que muestran el efecto promovido por el tratamiento con ouabaína 50 µM en ausencia y presencia de VK-II-86 (1 µM) sobre la fosforilación de CaMKII en Thr287 (p-CaMKII) y la oxidación de CaMKII en M281 / 282 (oxi-CaMKII) (fig. A), en la fosforilación de PLB en Thr17 (fig. B) y en la fosforilación del sitio Ser2814 de RyR2 (fig. C). No se evidenciaron diferencias significativas entre grupos.*

De este modo, demostramos que el efecto antiarrítmico beneficioso obtenido mediante el pretratamiento con VK-II-86 no se debe a una menor activación de CaMKII.

2.4 Carvedilol y VK-II-86 previenen la muerte de cardiomiocitos inducida por ouabaína

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, trabajos previos han mostrado que la exposición a concentraciones no tóxicas de ouabaína (2 μM), llevan a la pérdida de cardiomiocitos viables por apoptosis. Para estudiar si la estabilización del RyR2 protege de la muerte inducida por ouabaína, realizamos nuevamente cultivo celular de cardiomiocitos aislados de rata, utilizando medio de cultivo DMEM con o sin el agregado de ouabaína (2 μM) y en presencia o ausencia de los estabilizadores del RyR2 carvedilol (1 μM) o VK-II86 (1 μM). Se cuantificó la viabilidad celular mediante la evaluación morfológica de las células como se describió anteriormente (ver apartado II de la sección de resultados). Adicionalmente con el fin de investigar el grado de apoptosis, se realizó la detección de activación de caspasa 3 por fluorescencia mediante la utilización de un kit comercial (ver metodología: apartado “Evaluación de muerte celular por apoptosis”).

La ***figura 27*** muestra que la muerte celular inducida por ouabaína se pudo prevenir mediante el uso de carvedilol o de VK-II-86 (n=5 cultivos por grupo, cada uno utilizando 1 corazón). En experimentos control, se observó que ni el carvedilol ni el VK-II-86 afectaron, per se, la viabilidad celular (no representado).

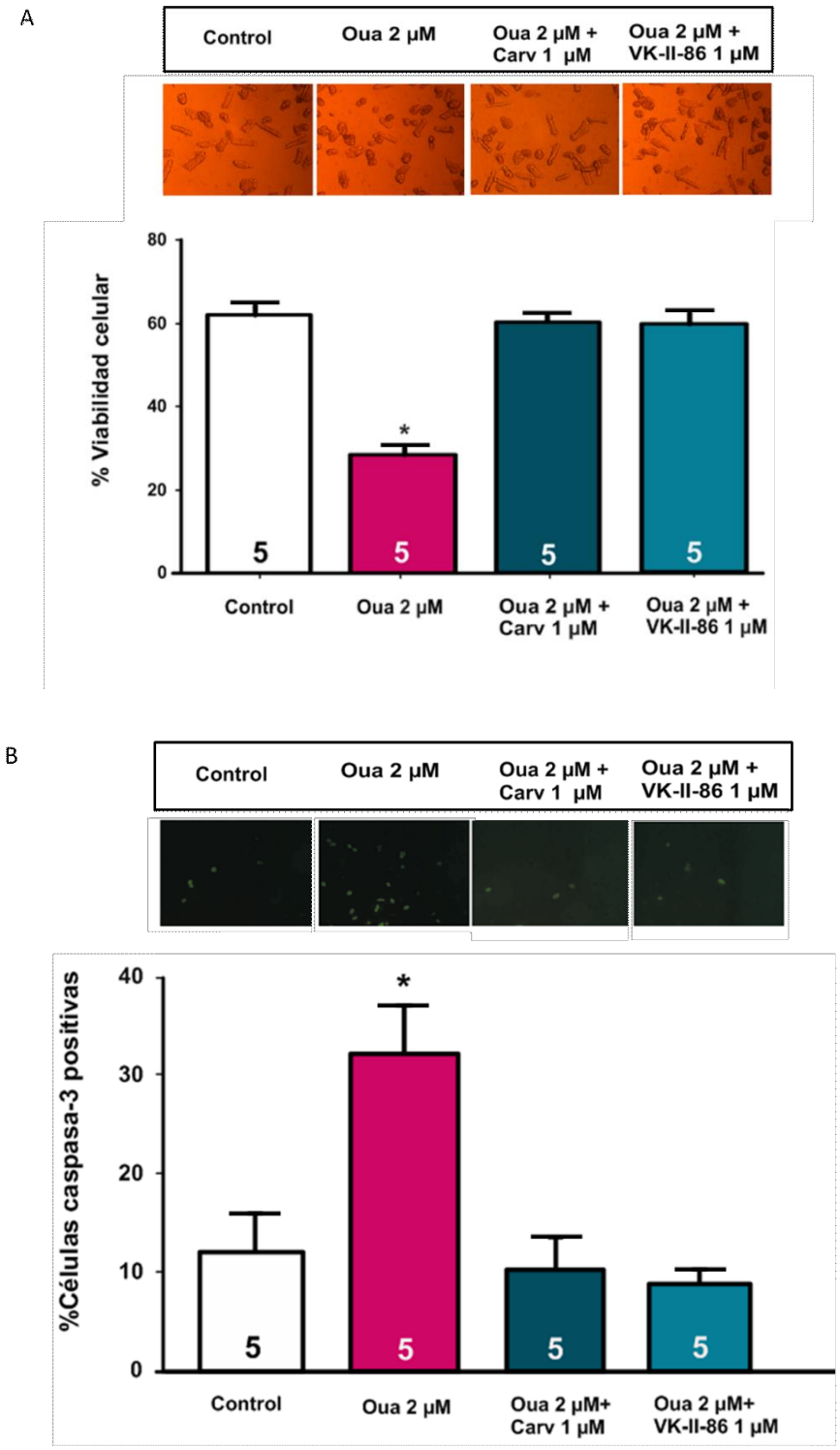

Figura 27. *Imágenes representativas y gráficos del promedio de la viabilidad (fig. A) y de la actividad de caspasa-3 (fig. B) en miocitos cultivados en medio de cultivo solo (control) o suplementado con 2 µM de ouabaína, ya sea en ausencia o en presencia de 1 µM de carvedilol o 1 µM de VK-II-86. * P ≤ 0.05 vs control.*

Estos resultados indican que la estabilización del RyR2 es eficaz para prevenir la muerte por apoptosis de cardiomiocitos inducida por ouabaína.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis nos enfocamos en el estudio de la modulación de proteínas del RS como estrategia para reducir la cardiotoxicidad de los inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa, o digitálicos (GC), mediante la evaluación de dos estrategias farmacológicas diferentes: la aceleración de la recaptación del Ca^{2+} hacia el RS mediante la estimulación de la actividad de SERCA con istaroxime, y la estabilización farmacológica del RyR2. Con fines comparativos, utilizamos ouabaína como representante de los digitálicos clásicos.

Por un lado, nos basamos en la hipótesis de que el tratamiento con istaroxime es menos cardiotóxico que los inhibidores clásicos de la NKA. Los resultados presentados comprueban que el tratamiento agudo con istaroxime a dosis terapéuticas es capaz de inducir una respuesta inotrópica semejante a la de los digitálicos, pero acompañándose de menor impacto en la viabilidad de los miocitos cardíacos. Demostramos también que a diferencia de lo observado con ouabaína, el tratamiento con istaroxime no se acompaña de la activación de CaMKII**,** lo que explicaría, al menos en parte, tanto el menor impacto en la sobrevida de los miocitos como la menor arritmogenicidad reportada con este fármaco. Adicionalmente, proporcionamos explicaciones novedosas en cuanto a los mecanismos que explican el menor potencial arritmogénico de istaroxime reportado en modelos clínicos y preclínicos. Así, describimos su capacidad para generar no solo menor liberación diastólica de Ca^{2+} sino también menor propagación de ondas arritmogénicas de Ca^{2+}, pudiendo ser este un mecanismo que contribuye a su menor cardiotoxicidad. Los resultados obtenidos profundizan el conocimiento sobre el istaroxime y agregan evidencia que respalda su potencial uso clínico como alternativa terapéutica efectiva y segura a los digitálicos.

Por otro lado, teniendo en cuenta la importancia que tiene la alteración funcional de los RyR2 en el mecanismo proarritmogénico y proapoptótico de los digitálicos, hipotetizamos que la combinación de inhibidores clásicos de la Na^+/K^+ ATPasa con agentes estabilizadores del RyR2, como carvedilol o VK-II-86, es una estrategia

farmacológica eficaz para reducir la toxicidad en cardiomiocitos tratados con ouabaína. Nuestros resultados evidencian que estos agentes constituyen una estrategia eficaz no solo para reducir el sustrato arritmogénico sino también la apoptosis de cardiomiocitos inducida por la inhibición de la NKA.

A continuación, se discutirán en detalle los resultados obtenidos en relación a los antecedentes existentes sobre el tema.

I. Istaroxime como alternativa farmacológica a los digitálicos

I.a Istaroxime se asocia a menor cardiotoxicidad directa sobre cardiomiocitos y no induce la activación de CaMKII

Previamente se ha mencionado que el tratamiento con digitálicos se asocia a pérdida de cardiomiocitos. Los resultados de *Sapia y col.* han determinado que la exposición crónica durante 24 horas a dosis terapéuticas (2μM) de ouabaína generan la activación de CaMKII y la apoptosis CaMKII-dependiente de estas células. Por el contrario, la inhibición de esta enzima previene la apoptosis inducida por ouabaína [3], lo que respalda que CaMKII está involucrada en la muerte de los cardiomiocitos inducida por digitálicos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos evaluar si el tratamiento con istaroxime también induce la muerte de cardiomiocitos, ya que, si no la produce, sería una alternativa más beneficiosa en contraste con los digitálicos. Además, teniendo en cuenta el rol protagónico de CaMKII en la muerte de miocitos por digitálicos, quisimos evaluar si istaroxime se asocia a la activación de esta quinasa.

Mediante experimentos realizados en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas adultas, somos los primeros en demostrar que istaroxime no induce muerte de cardiomiocitos ni activación de CaMKII. Sugerimos que la aceleración de la retoma de Ca^{2+} hacia el RS provocada por istaroxime, al generar menor acumulación de Ca^{2+} citosólico, evita la activación Ca^{2+}-dependiente de CaMKII (p-CaMKII) en comparación con lo que se produce durante el tratamiento con

ouabaína. Esta falta de activación de CaMKII podría explicar, al menos en parte, la falta de impacto de este fármaco en la viabilidad celular de cardiomiocitos.

Al interactuar con NKA, los digitálicos también han demostrado ser capaces de activar vías de señalización intracelulares en paralelo a los cambios que generan en las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+}, y esto implica la producción de ROS. Está descripto que este exceso de ROS puede conducir a la activación de CaMKII y de otras dianas por oxidación [118]. En nuestros experimentos en cardiomiocitos aislados, detectamos que el tratamiento con istaroxime no se acompaña de activación de CaMKII por fosforilación dependiente de Ca^{2+} (p-CaMKII) ni tampoco por oxidación (oxi-CaMKII), como se observa en la ***figura 15***. Si bien no lo hemos abordado en detalle en esta tesis, no podemos descartar que istaroxime está desencadenando menor activación de estas vías de señalización y que de este modo esté promoviendo menor producción de ROS, pudiendo ser éste un mecanismo adicional que explique su menor impacto en la viabilidad celular y en la falta de activación de CaMKII. Si bien faltan estudios al respecto, ha sido sugerido que istaroxime podría unirse a un sitio de unión de NKA diferente al de los GC o a isoformas diferentes de esta proteína [133]. Esto podría llevar a que istaroxime no active estas vías adicionales. Un desafío importante a futuro será evaluar el efecto de istaroxime en la producción de ROS.

Como se describió en la introducción, la activación de CaMKII desempeña un papel central en diferentes modalidades de muerte celular al ser un punto de convergencia para diferentes estímulos nocivos [156,84]. La participación de CaMKII en la muerte de cardiomiocitos ha sido extensamente estudiados en diferentes modelos patológicos, entre los que se incluyen el daño cardíaco por I/R [86,122], la taquicardia crónica [120] y la prediabetes [127]. La inhibición de esta quinasa, por el contrario, se asoció a protección contra esta muerte en estos mismos trabajos.

En cuanto al potencial mecanismo por el cual la activación de CaMKII puede llevar a muerte de cardiomiocitos, hay que considerar que el aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el RS provoca un exceso de Ca^{2+} en las mitocondrias y puede inducir apoptosis al abrir los poros de transición de permeabilidad

mitocondrial (mPTP) [62]. La falta de activación de CaMKII que observamos con istaroxime podría acompañarse de menor fosforilación del RyR2, generando menor pérdida diastólica de Ca^{2+}. Además, al acelerar la retoma de Ca^{2+} hacia el RS, istaroxime podría interferir en la transferencia de Ca^{2+} desde el RS hacia las mitocondrias.

Los resultados obtenidos en este trabajo motivan estudios futuros para profundizar aún más la caracterización de este fármaco y explicar los mecanismos involucrados en su menor impacto en la viabilidad.

Otro punto importante de mencionar es que CaMKII ha sido identificada como un componente de la matriz mitocondrial, donde regularía procesos claves como el ingreso de Ca^{2+} que lleva a la muerte celular [157]. Hace unos años, *Joiner y col.* [158] han descripto que CaMKII fosforila al MCU, aumentando el ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria y la muerte celular en respuesta a la isquemia miocárdica. Sin embargo, otros grupos no detectaron los efectos descriptos de la quinasa en el MCU [159]. De hecho, hay evidencia reciente que argumenta en contra del papel de CaMKII en la regulación directa del MCU en condiciones fisiológicas, sugiriendo que CaMKII no tiene un papel relevante como regulador del manejo mitocondrial de Ca^{2+} [160]. Por lo tanto, el papel preciso de CaMKII en el MCU aún es controvertido.

Si bien en este trabajo de tesis no hemos estudiado los eventos que suceden a nivel mitocondrial, es posible especular con la posibilidad de que la falta de activación de CaMKII, la menor frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} y la menor propagación de las ondas observadas con istaroxime se asocien a un menor ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria, pudiendo ser una explicación a la menor muerte celular observada en comparación con el impacto negativo de los digitálicos en la viabilidad celular. Quedan pendiente futuras investigaciones en nuestro laboratorio que permitan evaluar en detalle los eventos subcelulares que suceden en la mitocondria durante el tratamiento con istaroxime.

En relación a la muerte celular, es interesante mencionar que se han caracterizado diferentes modalidades, entre ellas apoptosis, necrosis, piroptosis, autofagia y otras [161]. La más estudiada en el corazón ha sido la apoptosis, un

proceso altamente regulado y que requiere energía. Esta puede iniciar por dos vías distintas, una que involucra receptores de muerte en la superficie celular y otra que involucra a las mitocondrias, que se conocen como vía extrínseca e intrínseca respectivamente, siendo la vía intrínseca la más frecuente en cardiomiocitos en respuesta a condiciones patológicas como I/R [86], taquicardia [162] y estrés oxidativo [156].

En cuanto al rol de CaMKII en la apoptosis, su importancia se ha estudiado ampliamente. Mientras que algunos estudios sugieren que diferentes isoenzimas y variantes de empalme de CaMKIIδ y su distinta localización subcelular podrían jugar roles diferentes en la apoptosis [163], otros trabajos no pudieron detectar esta diferencia [164]. A pesar de estas discrepancias, parece haber acuerdo en que CaMKII produce un efecto proapoptótico en el miocardio y que su inhibición sería beneficiosa. Adicionalmente, esta enzima ha demostrado estar implicada en otras modalidades de muerte. Entre ellas, en el año 2016 fue identificada como mediadora esencial de un tipo de muerte regulada denominada necroptosis [74]. Evidencia aún más reciente demuestra que también participa en la muerte de miocitos secundaria a inflamación [165].

Aunque este trabajo de tesis no estuvo dirigido a dilucidar los mecanismos específicos de muerte celular, y por lo tanto no hemos explorado en profundidad la contribución de la necrosis, la necroptosis o la apoptosis a la muerte de los cardiomiocitos en el contexto del tratamiento con istaroxime, los resultados aquí presentados sugieren que istaroxime no activaría la vía intrínseca o mitocondrial de la cascada apoptótica, ya que observamos mediante inmunodetección que no aumenta el índice apoptótico Bax/Bcl-2, como se ve en la figura 17. Nuestros resultados no nos permiten excluir que un menor efecto de istaroxime en otros tipos de muerte diferentes a la apoptosis puedan estar explicando su menor impacto en la viabilidad celular. Pero si bien sería interesante explorar en profundidad el efecto de istaroxime en diferentes modalidades de muerte celular, consideramos de mayor importancia conocer si istaroxime conducía o no a la muerte de cardiomiocitos a concentraciones inotrópicas, ya que su menor toxicidad directa la convierte en una alternativa muy atractiva a los GC.

Interesantemente, nuestros resultados contrastan con otros trabajos en los que se ha visto que una aceleración de la captación de Ca^{2+} por SERCA promueve en lugar de prevenir la muerte de los cardiomiocitos. En un trabajo publicado por Mazzochi y col., se evidenció que la aceleración de la retoma de Ca^{2+} hacia el RS secundario a la ablación de PLN se asoció al aumento del tamaño del infarto en ratones sometidos a I/R [166]. De forma similar, Zhang T y col., observó que la ablación de PLN se asoció a mayor muerte de cardiomiocitos [167]. Sin embargo, es importante destacar que se tratan de contextos diferentes a nuestro modelo experimental. En el primer caso, se trató de roedores que también presentan una mutación del RyR2 que los predispone a mayor pérdida diastólica de Ca^{2+}. En el segundo, la sobreexpresión de CaMKII también facilita dicha pérdida. Esta mayor predisposición a sufrir pérdidas diastólicas de Ca^{2+} por el RS explican por qué en esos contextos, la aceleración de la retoma sí predispone a la muerte de miocitos, a diferencia de lo que sucede con istaroxime.

Por último, además de sus efectos beneficiosos en la función cardíaca, istaroxime ha demostrado efectos antineoplásicos que son independientes de la mayor retoma de Ca^{2+} [137]. En concordancia con estudios previos con otros inhibidores de NKA, el grupo de *Alevizopoulos y col.* demostró que el istaroxime a una dosis de 5 uM induce un fuerte efecto antiproliferativo en líneas celulares tumorales y una reducción del crecimiento tumoral en xenoinjertos de cáncer de próstata, al afectar vías de señalización claves en la apoptosis [168]. Además de esta acción proapoptótica, el istaroxime inhibe la migración celular y la invasividad de células tumorales [169], por lo cual podría convertirse en un fármaco de interés en la terapia contra el cáncer. Sin embargo, su impacto en la viabilidad de miocitos cardíacos no había sido estudiado previamente. Esto es de interés, ya que muchos de los fármacos antitumorales usados actualmente se asocian a la aparición de eventos adversos cardíacos como arritmias, infarto agudo de miocardio e IC [170] que pueden limitar significativamente su uso terapéutico, especialmente en pacientes con enfermedad cardiovascular subyacente. Por ello, es esencial encontrar nuevos tratamientos antitumorales con perfiles de seguridad cardiovascular más favorables, como podría ser el caso de istaroxime. Los

trabajos de *Alevizopoulos* contrastan con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde demostramos que el tratamiento con istaroxime no impacta en la viabilidad celular de cardiomiocitos de rata**.** Sin embargo, es importante destacar que los efectos proapoptóticos descriptos por este grupo fueron observados en modelos experimentales que involucraron células no cardíacas y que además presentaban alteraciones fenotípicas de células neoplásicas. Estas diferencias justifican la disparidad observada en la viabilidad celular. Es relevante destacar que la concentración de istaroxime utilizada en este trabajo de tesis (10 *μM)* fue superior a la reportada como eficiente para promover la muerte de células tumorales (5 μM), lo que sugiere que el efecto antitumoral de istaroxime puede ser alcanzado sin promover cardiotoxicidad [168].

Consideramos que nuestros resultados, en los que mostramos la menor cardiotoxicidad de istaroxime en miocitos, son fundamentales porque respaldan su rol como alternativa más segura a los GC. Por otro lado, incluso si no llegara a ser utilizada como tratamiento para la IC, istaroxime podría tener un rol futuro como agente contra el cáncer muy atractivo por su menor toxicidad cardíaca.

I.b Mecanismos subcelulares determinantes del menor potencial arritmogénico del istaroxime

El istaroxime es el único fármaco capaz de inhibir a la bomba NKA y simultáneamente estimular a SERCA que ha sido probado en pacientes [129,130]. Su importancia clínica radica no sólo en su capacidad de favorecer la relajación miocárdica, sino también en su menor riesgo de arritmias reportado, que fue observado tanto en modelos clínicos como preclínicos [129,130,136].

La caracterización de los efectos del fármaco en cardiomiocitos fue abordada durante varios años por el grupo del *Dr. Rocchetti [133]*. Mediante un estudio comparativo utilizando como modelo celular cardiomiocitos de ratón tratados con concentraciones equiinotrópicas de digoxina o istaroxime, *Alemanni y col.* mostraron que el diferente perfil de seguridad de los dos fármacos se asoció con una mayor tendencia de digoxina a inducir acumulación de Ca^{2+} diastólico [136].

En un trabajo publicado en el año 2013, *Ferrandi y col.* sugirieron que el mecanismo que explica el efecto lusitrópico y la baja arritmogenicidad de istaroxime es su capacidad para disociar SERCA2a de su proteína inhibidora PLN [135]. De este modo, el cese de inhibición de SERCA aumentaría la velocidad de retoma del Ca^{2+} hacia el RS. Sin embargo, si este es el mecanismo exclusivo que explique su mejor perfil de seguridad no se exploró completamente.

I.b.1 La falta de activación de CaMKII podría asociarse a menor liberación arritmogénica de calcio

Como ya se mencionó, la importancia de la pérdida diastólica de Ca^{2+} en forma de chispas y ondas radica en que constituye un sustrato proarritmogénico, ya que una chispa de Ca^{2+} puede activar la liberación de Ca^{2+} en regiones cercanas, generando "ondas de Ca^{2+}" propagables a lo lago de la célula. Parte de ese Ca^{2+} puede ser extruido fuera de la célula por el NCX electrogénico a cambio de Na^{+}, generando DADs, potenciales de acción ectópicos y arritmias ventriculares [104].

Debido a que la mayor parte de este Ca^{2+} proviene del RS, la frecuencia de chispas de Ca^{2+} se relaciona directamente con la concentración de Ca^{2+} en el RS y con la probabilidad de apertura de los RyR2 individuales. Existe evidencia clara de que la elevación de la [Ca^{2+}] del RS aumenta la pérdida de Ca^{2+} porque los RyR2 son sensibles al Ca^{2+} luminal, por lo que la sobrecarga de Ca^{2+} en la luz del RS promueve la apertura de estos canales, aumentando la probabilidad de chispas [171]. Teniendo en cuenta estos conceptos, una pregunta importante que ha surgido a lo largo de los años ha sido si la aceleración de la retoma de Ca^{2+} por la proteína SERCA2a del RS exacerba o protege contra las arritmias provocadas por sobrecarga de Ca^{2+} en este contexto. Es razonable pensar que aumentar la tasa de retoma incrementaría el contenido de Ca^{2+} del RS, favoreciendo la sensibilización y apertura del RyR2, aumentando la susceptibilidad a la pérdida diastólica de Ca^{2+} y arritmias.

Varios grupos han abordado esta pregunta. Entre ellos, un artículo reciente de *Liu y col.* examinó el efecto de la sobreexpresión de SERCA2a en la arritmogénesis en un modelo de ratón transgénico caracterizado por

hiperactivación del RyR2 [172]. La sobreexpresión de SERCA2a exacerbó notablemente las arritmias ventriculares y auriculares in vivo y aumentó la tasa de ocurrencia de eventos de liberación diastólica de Ca^{2+}, sugiriendo que la mayor actividad de SERCA es una maniobra proarritmogénica. Por otro lado, *Fernandez y col.* estudiaron el efecto de la estimulación de SERCA con los agonistas farmacológicos OTA y jasmonate en la liberación proarritmogénica de Ca^{2+} en un modelo de cardiomiocitos ventriculares murinos expuestos a estimulación adrenérgica con isoproterenol, que constituye una maniobra capaz de inducir la pérdida de Ca^{2+} y la aparición de arritmias por Ca^{2+} [173]. Si bien en este contexto hubo una mayor carga de Ca^{2+} en el RS, también se observó un aumento sustancial del nivel de Ca^{2+} necesario dentro del RS para iniciar ondas de Ca^{2+}, independientemente del grado de fosforilación del RyR2, sugiriendo que el aumento de la retoma de Ca^{2+} por SERCA sería profundamente antiarritmogénico. A su vez, *Lyon y col.* estudiaron el impacto de la terapia génica con SERCA2a en la arritmogénesis de un modelo de ratas con IC crónica secundaria a isquemia [174]. De forma similar, observaron que la restauración del nivel y la actividad de SERCA2a redujo la pérdida diastólica de Ca^{2+} y previno la aparición de DADs en cardiomiocitos aislados y en corazones enteros, así como de arritmias ventriculares in vivo [174]. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis van de la mano con lo descripto por estos autores, ya que se observó mediante microscopia confocal que mientras que el tratamiento de cardiomiocitos con ouabaína produjo un aumento significativo en la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} con respecto a las células del grupo control, el tratamiento con istaroxime no se asoció a un aumento semejante (***figura 16***).

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación y otros demostraron que estos agentes son capaces de promover la activación Ca^{2+}-dependiente de CaMKII. Esto fue observado no solo durante el tratamiento agudo con dosis elevadas de ouabaína (50 μM), sino también en cardiomiocitos cultivados durante 24 horas en presencia de dosis más bajas (2 μM) [2,3].

La importancia fundamental que tiene la actividad de esta enzima en la inducción de arritmias por GC fue descripta en el trabajo de *Gonano y col.*, que demostró

cómo la fosforilación del sitio Ser2814 del RyR2 por CaMKII es un evento clave en la generación de las ondas de Ca^{2+} y en el proceso arritmogénico de estos fármacos [2]. La inhibición de CaMKII redujo el nivel de fosforilación del RyR2 y la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{+2}, protegiendo contra la aparición de arritmias, sin afectar el contenido de Ca^{+2} en el RS, sugiriendo que es la activación de CaMKII lo que provoca un aumento en la liberación espontánea de Ca^{2+}, y que el aumento inducido por los GC en el contenido de Ca^{2+} dentro del RS no es suficiente por sí solo para promover arritmias. En conjunto, estos datos confirmaron la importancia de la fosforilación del RyR2 por CaMKII como mediadora de las arritmias por digitálicos.

Considerando estos antecedentes, pensamos que la aceleración de la retoma de Ca^{2+} con istaroxime prevendría la activación dependiente de Ca^{2+} de CaMKII y la consiguiente fosforilación del RyR2 y la liberación diastólica de Ca^{2+}, y esto explicaría la menor incidencia de arritmias reportadas con istaroxime. Efectivamente, demostramos que el tratamiento con istaroxime a dosis terapéuticas no se acompaña de activación de CaMKII. Esto se puede visualizar en la **figura 15** y podría explicar, al menos en parte, su menor cardiotoxicidad.

Como se describió anteriormente, la activación de CaMKII puede darse también a través de su oxidación por ROS, como se ha visto en varios modelos de enfermedad cardíaca entre las que se destacan IC, la isquemia del miocardio [175] y durante la activación neurohumoral [70,71], hiperglucemia y diabetes [176]. Varios grupos de trabajo han demostrado que después de su unión a Na^{+}/K^{+} ATPasa, los CG pueden promover cambios conformacionales que activan cascadas de señalización intracelular que culminan en la producción de ROS a través de la NADPH Oxidasa 2 (NOX2) [16,17]. De esta forma, el grupo de *Ho y col.* ha descripto que los efectos arritmogénicos de los digitálicos están mediados por el aumento de ROS y de la activación de CaMKII por oxidación, que a su vez fosforila el RyR2 desencadenando pérdida de Ca^{2+} [118].

Interesantemente, en este trabajo de tesis hemos detectado que a diferencia de lo observado con ouabaína, el istaroxime no sólo no activa a CaMKII de forma secundaria al aumento de Ca^{2+} citosólico (p-CaMKII), sino que tampoco aumenta

su activación por oxidación (oxi-CaMKII). Nuestros resultados sugieren que istaroxime no estaría activando a la enzima CaMKII por este mecanismo, como se puede ver en la ***figura 15B***. Sin embargo, no podemos descartar con certeza si el istaroxime difiere con los GC en su la capacidad de aumentar la producción de ROS y si este sería un mecanismo adicional que explique su menor potencial arritmogénico.

I.b.2 La recaptación acelerada de calcio por istaroxime impide la propagación de ondas de calcio

Como ya fue mencionado, el mecanismo actualmente aceptado para explicar el efecto lusitrópico de istaroxime y su baja arritmogenicidad es su capacidad para disociar SERCA2a de su proteína inhibidora PLN [135]. De esta manera, el cese en la inhibición de SERCA2a por PLN aceleraría la recaptación del Ca^{2+} hacia el RS.

La recaptación más rápida de Ca^{2+} secundaria a la eliminación del efecto inhibitorio de PLN sobre la actividad de SERCA2a ha demostrado reducir la propagación espacial de las ondas de Ca^{2+}, generando su ruptura en ondas más pequeñas o miniondas no propagables a través de la célula. Esta estrategia de acelerar la retoma de Ca^{2+} ha demostrado representar un mecanismo eficaz para suprimir las DADs y las arritmias desencadenadas por Ca^{2+} en diferentes contextos. Entre ellos, el grupo de *Jones y col.* trabajó con miocitos ventriculares de ratones transgénicos que combinan una deficiencia en PLN con una mutación del RyR2 característica del síndrome de “taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica” (CPVT en inglés), que los hace propensos a presentar ondas de Ca^{2+}, DADs y arritmias inducidas por estrés. En este modelo, la aceleración de la retoma de Ca^{2+} secundaria a la eliminación del efecto inhibitorio de PLN sobre SERCA modificó las propiedades espaciales y temporales de las ondas de Ca^{2+}, fragmentándolas en miniondas y chispas de Ca^{2+}, y protegiendo a los ratones de arritmias ventriculares [152]. De forma similar, el grupo de *Valverde y col.* trabajó con corazones enteros de ratones transgénicos de la cepa “SDKO” sometidos a un

protocolo de I/R. Estos animales presentan un mayor secuestro de Ca^{2+} hacia el RS secundario a la deficiencia de PLN, así como un aumento de la pérdida de Ca^{2+} generado por una mutación que simula la fosforilación constitutiva del RyR2 en el residuo Ser2814 por CaMKII, haciéndolos susceptibles a la liberación arritmogénica de Ca^{2+}. De forma similar a lo reportado por Jones, el aumento de la retoma de Ca^{2+} hacia el RS interrumpió la propagación de las ondas, fragmentándolas y transformándolas en no propagadas a través del citosol, lo que resultó en el silenciamiento de las arritmias durante la etapa de reperfusión [153]. Estos dos trabajos refuerzan el beneficio potencial de aumentar la actividad de SERCA2a y acelerar el secuestro de Ca^{2+} hacia el RS para prevenir la aparición de arritmias desencadenadas por Ca^{2+}.

En base a estos antecedentes, en este trabajo estudiamos si la aceleración de la retoma de Ca^{2+} provocada por istaroxime dificultaría la propagación de las ondas de Ca^{2+}, llevando a que se alcance un menor pico de Ca^{2+} citosólico capaz de inducir despolarización celular y haciendo menos probable la generación de DADs arritmogénicas. Nuestros resultados graficados en la **figura 19** demostraron que istaroxime no solo no activa a CaMKII, por lo que genera menor liberación proarritmogénica de Ca^{2+}, sino que también evita la propagación de las ondas de Ca^{2+} al transformarlas en ondas más pequeñas no propagables. Por lo tanto, proponemos que ambos mecanismos contribuyen a su mejor perfil de seguridad.

1.b.3 El menor perfil arritmogénico de istaroxime no depende de la disociación SERCA-PLB

Por último, con el objetivo de comprender aún más los mecanismos subyacentes al diferente perfil arritmogénico de istaroxime, realizamos experimentos utilizando cardiomiocitos extraídos de ratones transgénicos que no expresan la proteína PLN (PLN-KO). Estos miocitos tienen una retoma de Ca^{2+} acelerada, una mayor carga de Ca^{2+} en el RS y mayor frecuencia y amplitud de chispas de Ca^{2+}. Sin embargo, curiosamente estos ratones no presentan mayor riesgo de arritmias en condiciones basales [154,167].

Debido a que el mecanismo previamente descripto por el cual istaroxime aceleraría la retoma de Ca^{2+} es su capacidad para disociar SERCA2a de su proteína inhibidora PLN [135], esperaríamos encontrar en estas células una falta o disminución del efecto beneficioso del istaroxime. En concordancia con lo demostrado por otros grupos con respecto a la aceleración de la retoma de Ca^{2+} hacia el RS y la ruptura de las ondas de Ca^{2+} características de esta cepa, los miocitos PLN-KO mostraron un alto porcentaje de ondas de Ca^{2+} abortadas. Sin embargo, nuestros experimentos arrojaron resultados sorprendentes, *ya* que demuestran que la diferencia significativa en la frecuencia de onda de Ca^{2+} entre las células tratadas con ouabaína e istaroxime permanece presente, como se observa en la ***figura 20***. Además, en esta misma figura se observa que el porcentaje de miniondas fue aún mayor en las células tratadas con istaroxime que en las células tratadas con ouabaína, aun cuando estos cardiomiocitos carecen de PLN. Estos resultados sugieren que además de la disrupción de la interacción SERCA-PLN, otro mecanismo subyacería al diferente impacto que ejercen ambos fármacos sobre la liberación espontánea Ca^{2+}, contrariamente a lo expuesto por *Ferrandi y col.*

Los resultados de *Ferrandi y col. se* basaron en experimentos de coinmunoprecipitación, y revelaron que istaroxime induciría la disociación física entre PLN y SERCA2a y la aceleración de la retoma de Ca^{2+} en microvesículas de RS. Sin embargo, si bien los autores proponen que esta disociación favorece un cambio conformacional de SERCA2A que acelera la recaptación del Ca^{2+}, dicho cambio de conformación no fue directamente demostrado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, sugerimos que el menor perfil arritmogénico de istaroxime podría ser explicado porque la aceleración de la retoma de Ca^{2+} hacia el RS por SERCA genera menor activación de CaMKII y fosforilación CaMKII-dependiente del RyR2, y también por la menor propagación de las ondas de Ca^{2+}, generando así menos probabilidad de producirse DADs arritmogénicas.

I.c Potencial valor clínico de la utilización de istaroxime

Los cardiomiocitos de pacientes con IC presentan un manejo del Ca^{2+} intracelular alterado que lleva a defectos en el AEC y afecta tanto la función sistólica como la diastólica [5]. Una de las causas subyacentes es la reducción de la recaptación de Ca^{2+} hacia el RS, que ha sido demostrada tanto en modelos animales como en pacientes humanos [9,132] y que se ha asociado con una disminución en la expresión y actividad de SERCA2a y con una mayor inhibición de SERCA2a por PLN [28,177]. Como resultado, existe una menor retoma de Ca^{2+} por SERCA hacia el RS durante la diástole, lo que conduce a una deficiencia en la relajación, y reduce la disponibilidad de Ca^{2+} llevando a una contractilidad deficiente [5]. Por lo tanto, la posibilidad de modulación de SERCA2a ha surgido como una estrategia terapéutica prometedora en la IC.

Una estrategia que ha sido muy estudiada a lo largo de los años tanto en modelos animales como en humanos es la terapia génica destinada a restaurar los niveles y la actividad de SERCA2a en el miocardio insuficiente. Esta intervención ha demostrado restaurar la función contráctil y energética del miocardio, así como una reducción en la probabilidad de arritmias ventriculares [174,177,178]. Se han desarrollado ensayos clínicos en humanos con el objetivo de determinar la seguridad y eficacia de la terapia génica de SERCA2a [179,180]. Sin embargo, a pesar de los resultados alentadores en modelos preclínicos y en ensayos clínicos pequeños de fase 1 y 2, ninguno de los estudios más grandes realizados hasta la fecha, han proporcionado evidencia del beneficio funcional de la terapia génica en pacientes con IC.

Estos antecedentes aumentaron nuestra motivación para estudiar agentes farmacológicos capaces de estimular de forma directa a SERCA2a. Si bien existen compuestos de uso experimental capaces de acelerar la recaptación de Ca^{2+} por SERCA en cardiomiocitos aislados, desafortunadamente, hasta la fecha no existe un agonista farmacológico específico de SERCA de uso clínico además de istaroxime.

Recientemente, el efecto del istaroxime fue evaluado en otros modelos patológicos. Entre ellos, hay que destacar un trabajo del grupo de Rochetti que

tuvo como objetivo evaluar el efecto del istaroxime en un modelo de ratas diabéticas, en el que observaron que la estimulación de SERCA2a mejoró la disfunción diastólica y las anomalías en el manejo del Ca^{2+} características de este modelo [181].

Los resultados de este trabajo de tesis agregan evidencia que respalda el beneficio de estimular la actividad de SERCA y el potencial uso clínico futuro de istaroxime.

2. Estabilización farmacológica de los RyR2 como estrategia para disminuir la cardiotoxicidad de los digitálicos

Teniendo en cuenta el rol central de la fosforilación del RyR2 por CaMKII en la apoptosis y las arritmias secundarias al uso de digitálicos, la inhibición de la actividad de esta quinasa mediante intervenciones farmacológicas o genéticas se ha propuesto como estrategia para prevenir la cardiotoxicidad durante el tratamiento con estos fármacos [2]. Desafortunadamente, la naturaleza ubicua de CaMKII y sus efectos sobre diferentes dianas dificulta su inhibición como herramienta terapéutica, ya que actualmente no están disponibles agentes inhibidores de CaMKII específicos para el corazón. Como alternativa, en este trabajo de tesis nos centramos en otra estrategia que podría optimizar el uso de estos fármacos y mejorar la seguridad: la estabilización del RyR2 [140,182].

En el año 2012 el grupo de *Sacherer y col.* utilizaron el agente farmacológico JTV-519 en cardiomiocitos a los cuales se administró ouabaína de forma aguda. JTV-519 estabiliza la interacción entre la proteína calstabina y el RyR2, manteniendo el canal en estado cerrado [183]. Si bien en este contexto este agente logró reducir la liberación arritmogénica de Ca^{2+}, su uso también se asoció a una disminución en la respuesta inotrópica de ouabaína debido a un efecto inhibitorio en la corriente de Ca^{2+} por el canal de tipo L, descartando la posibilidad de utilizarse de forma conjunta con este GC [183].

Este antecedente nos llevó a especular que una reducción en el tiempo de apertura del RyR2 y en la liberación arritmogénica de Ca^{2+}mediante el uso de los

estabilizadores del RyR2 carvedilol y VK-II-86 podría ser un enfoque eficaz para reducir los efectos cardiotóxicos de los digitálicos. La elección de carvedilol y un análogo del mismo estuvo sustentada por el hecho de que el primero se trata de un fármaco que ya es ampliamente utilizado en la práctica clínica, habiendo demostrado un claro efecto antiarrítmico.

2.a Estabilización de los RyR2 con VK-II-86 y prevención de las ondas arritmogénicas de calcio

Teniendo en cuenta el papel crucial de la liberación arritmogénica de Ca^{2+} en la génesis de arritmias por GC, en primer lugar, nos propusimos evaluar si la modulación farmacológica del RyR2 es capaz de prevenir esta liberación durante el tratamiento con dosis tóxicas de ouabaína. Como podemos observar en la ***figura 23*** obtenida mediante microscopía confocal en cardiomiocitos adultos de rata, detectamos que el pretratamiento de las células durante 30 minutos con VK-II-86 logró prevenir el aumento en la frecuencia tanto de chispas como de ondas de Ca^{2+} en miocitos tratados con dosis arritmogénicas de ouabaína (50 μM). Cabe mencionar que en experimentos en los cuales se midió la amplitud del acortamiento celular, la utilización de VK-II-86 no se asoció a una reducción en la respuesta inotrópica provocada por ouabaína, por lo cual VK-II-86 podría ser usado como fármaco adyuvante en combinación con GC. De este modo, los datos aquí presentados respaldan la utilización de VK-II-86 como potencial estrategia antiarrítmica durante la administración de digitálicos.

Nuestros resultados son consistentes con otros trabajos que muestran que diferentes agentes estabilizadores del RyR2 son capaces de prevenir la pérdida arritmogénica de Ca^{2+}. Un antecedente de importancia es el conjunto de trabajos utilizando dantroleno en cardiomiocitos ventriculares provenientes de animales con IC de etiología variada [144,184,185,186]. Mediante la estabilización de la interacción entre los dominios N-terminal y central del RyR2, este estabilizador del RyR2 ha demostrado reducir la pérdida diastólica de Ca^{2+}, reduciendo la frecuencia de chispas de Ca^{2+} y DADs, previniendo así la formación de un sustrato arritmogénico y a su vez aumentando el contenido de Ca^{2+} en el RS, preservando

el inotropismo. También ha demostrado ser eficaz para suprimir la taquicardia ventricular en pacientes con IC sin afectar la contractilidad ni el ritmo cardíaco [187].

Otro antecedente relevante surge del trabajo de *Chen y col.* Trabajando con cardiomiocito de ratones transgénicos que expresan una mutación del RyR2 que los predispone a pérdida de Ca^{2+}, DADs y aparición de taquiarritmias ventriculares en situaciones de estrés (síndrome conocido como CPVT), demostraron que el pretratamiento con carvedilol o su análogo VK-II-86 a dosis 1 µM durante 30 minutos es capaz de reducir significativamente frecuencia de ondas de Ca^{2+}, inhibiendo la aparición de arritmias in vivo en estos animales. Estos resultados fueron reproducidos por *Maruyama y col.*, quienes observando que tanto carvedilol como otro análogo del mismo (VK-II-36) inhiben la liberación diastólica de Ca^{2+} y previenen las arritmias ventriculares mediadas por DADs en corazones intactos de conejo [188]. Mas aún, carvedilol ha demostrado tener efectos antiarrítmicos en miocitos auriculares al prevenir las ondas de Ca^{2+} [189].

Los antecedentes mencionados, si bien surgen de trabajos realizados en escenarios diferentes al tratamiento con digitálicos, constituyen evidencia de que la estabilización del RyR2 logra reducir la liberación arritmogénica de Ca^{2+}. En todos estos contextos existe disfunción del RyR2, ya sea por mutaciones [190] o alteraciones postraduccionales del mismo [110,191], llevando a que el RyR2 sea más propenso a abrirse, desencadenando liberación diastólica de Ca^{2+}, DADs y un sustrato arritmogénico. Es decir, estos escenarios comparten con los digitálicos la importancia crucial de la pérdida diastólica de Ca^{2+} y las DADs en la aparición de arritmias.

Interesantemente, la reducción en la frecuencia de chispas de Ca^{2+} que observamos en presencia de ouabaína + VK-II-86 no se asoció a cambios en la morfología de las chispas ni tampoco en la velocidad de las ondas en comparación con ouabaína sola (***figuras 24 y 25)***. El hecho de que VK-II-86 no afectara estos parámetros sugiere que sus acciones antiarrítmicas no se deben a una reducción en la sensibilidad de los RyR2 al Ca^{2+} citosólico, sino a un mecanismo diferente.

Teniendo en consideración el papel fundamental ya descripto de CaMKII en la toxicidad digitálica, estudiamos también si el efecto antiarritmogénico de VK-II-86 se asocia a menor activación de esta quinasa. Mediante la realización de western blots en homogenatos de corazones perfundidos de ratas adultas, observamos que mientras que el tratamiento agudo con ouabaína provocó la activación de CaMKII, como se puede concluir a partir del aumento detectado en p-CaMKII, oxiCaMKII y la fosforilación de sus dianas RyR2 y PLN representado en la ***figura 26***, estos parámetros no presentaron cambios en corazones perfundidos en presencia de ouabaína en conjunto con VK-II-86. De este modo, el efecto beneficioso del VK-II-86 es independiente del grado de activación de CaMKII.

El hecho de que no se vio afectado el inotropismo, pero sí se redujo significativamente la liberación diastólica de Ca^{2+}, como se visualiza en las ***figuras 22 y 23*** respectivamente, sugiere que el contenido de Ca^{2+} del RS no se vio afectado. En conjunto, estos resultados sugieren que en lugar de deberse a una reducción de la actividad de CaMKII o de la sensibilidad del RyR2 al Ca^{2+} citosólico, el efecto antiarritmogénico de VK-II-86 se debe a un efecto modulatorio directo en el RyR2, que disminuye su apertura y la probabilidad de que se generen chispas de Ca^{2+}, y de forma secundaria reduciría la incidencia de ondas de Ca^{2+} durante el tratamiento con ouabaína. Esto es consistente con la evidencia de los trabajos mencionados, que muestran que el mecanismo antiarrítmico de estos agentes está mediado por su interacción directa con los RyR2.

2.b La estabilización farmacológica de los RyR2 protege a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por ouabaína

En el apartado 1.b de la discusión se ha discutido en detalle cómo la citotoxicidad de los cardiomiocitos inducida por ouabaína involucra la liberación diastólica de Ca^{2+} desde el RS y su posible captación por las mitocondrias, generando a sobrecarga de Ca^{2+} de las mismas e inducción de apoptosis.

Teniendo en cuenta esto, un objetivo adicional de este trabajo fue probar la eficacia de VK-II-86 para prevenir la pérdida apoptótica de cardiomiocitos que se produce durante el tratamiento con GC, ya que este aspecto no había sido

estudiado previamente. Mediante la realización de cultivos de cardiomiocitos aislados de ratas, comprobamos aquí que la estabilización del RyR2 con carvedilol y VK-II-86 protegió de la apoptosis inducida por ouabaína, lo que sugiere beneficios adicionales de reducir la liberación espontánea de Ca^{2+} mediada por RyR2 durante el tratamiento con digitálicos (***fig. 27***). Si bien no hemos explorado aún cuáles son los mecanismos que subyacen a la menor inducción de muerte de miocitos con Carvedilol y VK-II-86, la menor liberación espontánea de Ca^{2+} por el RyR2 podría asociarse a menor transferencia de Ca^{2+} desde el RS hacia las mitocondrias y menor inducción de la cascada apoptótica.

3. Limitaciones y perspectivas a futuro

Los experimentos realizados en esta tesis se han enfocado en la determinación de los efectos de istaroxime y los estabilizadores del RyR2 en cardiomiocitos obtenidos de ratas adultas sin patología cardiovascular. Sin embargo, es importante destacar que los digitálicos se utilizan principalmente como agentes inotrópicos en el manejo de pacientes con IC descompensada o con fibrilación auricular. Del mismo modo, el istaroxime se ha propuesto y continúa en estudio como fármaco inotrópico en la IC con descompensación aguda. Si bien parte de estos pacientes presentan IC aguda sin daño miocárdico previo, la gran mayoría presenta una patología cardiovascular de base o en asociación a otros cuadros clínicos, entre los que se destacan hipertensión arterial, diabetes o isquemia miocárdica [91,192]. Por este motivo, los mecanismos subcelulares de istaroxime que describimos en este trabajo merecen ser explorados también en modelos animales de IC crónica. De todos modos, actualmente se acepta que en cardiomiocitos insuficientes existe una reducción de la recaptación de Ca^{2+} hacia el RS debido a la disminución en la expresión y actividad de SERCA2a [9,132]. En este contexto, sería esperable observar un efecto beneficioso de istaroxime aún mayor que el que observamos en este trabajo utilizando miocitos de animales sanos.

Adicionalmente, en un futuro próximo nos proponemos estudiar el efecto de istaroxime en otros contextos, entre ellos en un modelo animal de IC secundaria a

sepsis. Entre los mecanismos responsables de esta disfunción cardíaca se describe una alteración en la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS, lo que causa disfunción contráctil (sistólica) al reducir el Ca^{2+} disponible en el RS, y también disfunción diastólica al empeorar la relajación [193,194]. También existe activación de CaMKII [195], que al fosforilar el RyR2 incrementa la pérdida de Ca^{2+}, disminuyendo el contenido en el RS. Sin embargo, no se ha evaluado la eficacia de acelerar la retoma de Ca^{2+} hacia el RS, por ejemplo, mediante el uso de istaroxime, para prevenir la IC en un contexto de sepsis. Por lo tanto, consideramos que la caracterización de istaroxime en este modelo es necesaria.

Finalmente, teniendo en cuenta el rol de la mitocondria en la muerte celular, proponemos explorar en detalle los eventos subcelulares que suceden en esta organela durante el tratamiento con istaroxime, intentando describir en profundidad los mecanismos específicos que explican su menor inducción de apoptosis.

CONCLUSIONES Y POSIBLES IMPLICANCIAS CLÍNICAS

En este trabajo de tesis revelamos nuevos mecanismos subcelulares que subyacen al mejor perfil de seguridad de istaroxime:

• El tratamiento con dosis terapéuticas de istaroxime se asocia a menor cardiotoxicidad directa sobre cardiomiocitos al no inducir muerte celular.

• A diferencia de otros inhibidores de la NKA, el istaroxime no induce activación de CaMKII ni aumenta la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+}.

• La recaptación acelerada de Ca^{2+} por istaroxime impide la propagación de ondas arritmogénicas de Ca^{2+}.

Esta evidencia respalda firmemente la seguridad de este compuesto para mejorar la función cardíaca y para otros usos potenciales.

Además, concluimos que:

• La estabilización de los RyR2 permite reducir el aumento en la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} inducido por la administración de ouabaína, pudiendo prevenir el desarrollo de arritmias.

• Carvedilol y VK-II-86 previenen la muerte de los miocitos inducida por ouabaína.

Esta evidencia respalda que la utilización conjunta de GC más estabilizadores del RyR2 podría resultar una estrategia atractiva y prometedora para reducir la cardiotoxicidad de los GC.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis nos permiten concluir que la modulación farmacológica de proteínas del retículo sarcoplasmático es una estrategia válida para reducir la cardiotoxicidad de los inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa.

REFERENCIAS

1. Digitalis Investigation Group. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. N Engl J Med, 1997. 336(8): p.525-533.
2. Gonano, L.A., et al., Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011. 4(6): p.947-957.
3. Sapia, L., et al., Na+/K+-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 2010.49(3): p.459-468.
4. Eisner, D.A., Ups and downs of calcium in the heart. J Physiol, 2018. 596(1): p.19-30.
5. Bers, D.M., Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. Physiology (Bethesda), 2006. 21: p.380-387.
6. Clusin, W.T., et al., Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. Crit Rev Clin Lab Sci. 2003;40(3): p.337-375.
7. Sandow, A., et al., Excitation-contraction coupling in muscular response. Yale J Biol Med ,1952. 25(3): p.176-201.
8. Stern, M.D., Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. Biophys J. 1992;63(2): p.497-517.
9. Bers, D.M., Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, 2002. 415(6868): p.198-205.
10. Bers, D.M., et al., Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1047: p.86-98.
11. Endo, M., et al., Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. Nature, 1970. 228(5266): p.34-36.
12. Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol, 1983. 245(1): C1-C14.
13. Skou, J.C., The identification of the sodium pump. Biosci Rep, 2004. 24(4-5): p.436-451.
14. Blanco, G., et al., Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am J Physiol, 1998. 275(5): F633-F650.
15. McDonough, A.A., et al., The cardiac sodium pump: structure and function. Basic Res Cardiol, 2002.97 Suppl 1: I19-I24.
16. Liu, J., et al., Ouabain interaction with cardiac Na+/K+-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na+ and Ca2+ concentrations. J Biol Chem, 2000.275(36): p.27838-27844.
17. Xie, Z., et al., Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001.47(2): p.383-390.
18. Bers, D.M., Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. Annu Rev Physiol, 2014. 76: p.107-127.
19. Breham, P., et al., Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. Science, 1978. 202(4373): p.1203-1206.
20. Pitt, G.S., Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. Cardiovasc Res, 2007.73(4): p.641-647.

21. ang, Z., et al., Na+-Ca2+ exchange activity is localized in the T-tubules of rat ventricular myocytes. Circ Res, 2002. 91(4): p.315-322.
22. Palty, R., et al., The mitochondrial Na(+)/Ca(2+) exchanger. Cell Calcium, 2007.52(1): p.9-15.
23. Goldhaber, J.I., et al., Cardiac sodium-calcium exchange and efficient excitation-contraction coupling: implications for heart disease. Adv Exp Med Biol, 2013. 961: p.355-364.
24. Weber, C.R., et al., Na(+)-Ca(2+) exchange current and submembrane [Ca(2+)] during the cardiac action potential. Circ Res, 2002.90(2): p.182-189.
25. Satoh, H., et al., KB-R7943 block of Ca(2+) influx via Na(+)/Ca(2+) exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca(2+) overload in rat ventricular myocytes. Circulation, 2000.101(12): p.1441-1446.
26. Frank KF et al. Sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. Cardiovasc Res. 2003;57(1): p.20-27.
27. Brittsan, A.G., et al., Phospholamban and cardiac contractile function. J Mol Cell Cardiol, 2000. 32(12): p.2131-2139.
28. MacLennan, D.H., Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(7): p. 566-77.
29. Mundiña-Weilenmann, C., et al., Dissociation between contraction and relaxation: the possible role of phospholamban phosphorylation. Basic Res Cardiol, 1987.82(6): p.507-516.
30. Mattiazzi, A., et al., The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. Front Pharmacol, 2014. 5: p. 5.
31. Lindemann, J.P., et al., Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca2+-calmodulin-dependent mechanisms. J Biol Chem, 1985. 260: p.4516-4525.
32. Vittone, L, et al., cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts. Am J Physiol, 1990. 258(2 Pt 2): H318-H325.
33. Vafiadaki, E., et al., Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function. J Mol Biol, 2007. 367(1): p.65-79.
34. Bidwell, P.A., et al., The antiapoptotic protein HAX-1 mediates half of phospholamban's inhibitory activity on calcium cycling and contractility in the heart. J Biol Chem, 2018. 293(1): p.359-367.
35. Inui, M., et al., Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. J Biol Chem.,1987. 262(4): p.1740-1747.
36. Lai, F.A., et al., Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature.,1988;331(6154): p.315-319.
37. Peng, W., et al., Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. Science, 2016.354(6310):aah5324.
38. Lanner, J.T., et al., Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(11):a003996.
39. Sitsapesan, R., et al., Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by luminal Ca2+. J Membr Biol, 1994.137(3): p.215-226.

40. Gyorke, I., et al., Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca2+ involves luminal Ca2+ sensing sites. Biophys J, 1998. 75(6): p. 2801-10.
41. Gyorke, S., et al., Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. Cardiovasc Res, 2008. 77(2): p. 245-55.
42. Chen, W., et al., The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca2+ waves and Ca2+-triggered arrhythmias. Nat Med, 2014. 20(2): p.184-192.
43. Niggli, E, et al., Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca(2+) signaling and EC-coupling. Biochim Biophys Acta, 2013.1833(4): p.866-875.
44. Meissner, G., et al., Regulation of Ryanodine Receptor Ion Channels Through Posttranslational Modifications. Curr Top Membr, 2010. 66: p.91-113.
45. Marx, S.O., et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 2000. 101(4): p. 365-76.
46. Xiao, B., et al., Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. Biochem J, 2006. 396(1): p. 7-16.
47. Wehrens, X.H., et al., Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res, 2004. 94(6): e61-70.
48. Lokuta, A.J., et al., Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. J Physiol, 1995. 487 (Pt 3)(Pt 3): p.609-622.
49. Gonano, L.A., et al., Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect. Cardiovasc Res, 2014. 104(3): p.456-466.
50. Gonano, L.A., et al., Regulation of cardiac ryanodine receptor function by the cyclic-GMP dependent protein kinase G. Curr Res Physiol, 2022. 5: p.171-178.
51. Anzai, K., et al., Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. Antioxid Redox Signal, 2000. 2(1): p.35-40.
52. Maier, L.S., et al., Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca2+ handling: reduced SR Ca2+ load and activated SR Ca2+ release. Circ Res, 2003. 92(8): p.904-911.
53. Guo, T., et al., Ca2+/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. Circ Res, 2006. 99(4): p.398-406.
54. Gonano, L.A., et al., FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. Channels (Austin), 2017.11(5): p.415-425.
55. Barth, E., et al., Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. J Mol Cell Cardiol, 1992. 24(7): p.669-681.
56. Di Benedetto, G., et al., Mitochondrial Ca^{2+} uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. Cell Metab, 2013. 17(6): p.965-975.

57. Luongo, T.S., et al., The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. Cell Rep, 2015. 12(1): p.23-34.
58. Gunter, T.E., et al., Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am J Physiol. 1990;258(5 Pt 1): C755-C786.
59. De Stefani, D., et al., A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature, 2011. 476(7360): p.336-340.
60. Perocchi, F., et al., MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. Nature, 2010.467(7313): p.291-296.
61. Mallilankaraman, K., et al., MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca (2+) uptake that regulates cell survival. Cell, 2012.151(3): p.630-644.62.
62. Crow, M.T., et al., The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. Circ Res, 2004;95(10): p.957-970.
63. Orrenius S, et al. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. Biochem Biophys Res Commun, 2015.460(1): p.72-81.
64. De Koninck, P., et al., Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca2+ oscillations. Science, 1998. 279(5348): p.227-230.
65. Edman, C.F., et al., Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. Biochim Biophys Acta, 1994. 1221(1): p.89-101.
66. Mishra, S., et al., Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes. Circ Res, 2011. 109(12): p.1354-1362.
67. Braun, A.P., et al., The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. Annu Rev Physiol, 1995. 57: p.417-445.
68. Maier, L.S., et al., Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 2006.41(3): p.451-458.
69. Hudmon, A., et al., Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. Annu Rev Biochem, 2002. 71: p.473-510.
70. Erickson, J.R. et al., A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. Cell, 2008. 133(3): p.462-474.
71. Palomeque, J., et al., Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca2+ dependence of Ca2+-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. Circ Res, 2009.105(12):p.1204-1212.
72. Erickson, J.R., et al., Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. Nature, 2013. 502(7471): p.372-376.
73. Gutierrez, D.A, et al., NO-dependent CaMKII activation during β-adrenergic stimulation of cardiac muscle. Cardiovasc Res, 2013;100(3): p.392-401.
74. Zhang, T., et al., CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. Nat Med, 2016;22(2): p.175-182.
75. Tao, W., et al., Synaptic memory requires CaMKII. Elife, 2021;10: e60360.
76. Xiao, R.P., et al., Dual regulation of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(20):9659-9663.

77. Mundina-Weilenmann, C., et al., Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. J Biol Chem, 1996. 271(52): p. 33561-7.
78. Hidalgo, C.G., et al., The multifunctional Ca (2+) /calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKIIδ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. J Mol Cell Cardiol, 2013. 54: p.90-97.
79. Valdivia, H.H., Ryanodine receptor phosphorylation and heart failure: phasing out S2808 and "criminalizing" S2814. Circ Res, 2012.110(11): p.1398-1402.
80. Zhang T, Brown JH. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res. 2004;63(3):476-486.
81. Backs, J., et al., The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(7): p.2342-2347.
82. Anderson, M.E., et al., KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca++/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. J Pharmacol Exp Ther, 1998. 287(3): p.996-1006.
83. Zhang, M., et al., CaMKII-δ9 Induces Cardiomyocyte Death to Promote Cardiomyopathy and Heart Failure. Front Cardiovasc Med, 2022. 8: 820416.
84. Feng, N., et al., CaMKII is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart. J Mol Cell Cardiol, 2017. 103: p.102-109.
85. Zhang, T., et al., The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. Circ Res, 2003.92(8): p.912-919.
86. Vila-Petroff, M., et al., CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. Cardiovasc Res, 2007.73(4): p.689-698.
87. Chelu, M.G., et al., Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak promotes atrial fibrillation in mice. J Clin Invest, 2009. 119(7): p.1940-1951.
88. Murphy, S.P., et al., Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Review. JAMA. 2020;324(5): p.488-504.
89. Redfield, M.M., et al., Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. JAMA. 2023;329(10): p.827-838.
90. Savarese, G., et al., Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. Cardiovasc Res, 2023.118(17): p.3272-3287.
91. Tsao, C.W., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation, 2023.147(8): e93-e621.
92. Lauritsen, J., et al., Characteristics and long-term prognosis of patients with heart failure and mid-range ejection fraction compared with reduced and preserved ejection fraction: a systematic review and meta-analysis. ESC Heart Fail, 2018. 5(4): p.685-694.
93. Teerlink, J.R., et al., Agents with inotropic properties for the management of acute heart failure syndromes. Traditional agents and beyond. Heart Fail Rev, 2009.14(4): p.243-253.
94. Ponikowski, P., et al., ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Kardiol Pol, 2016.74(10): p.1037-1147.
95. 95.Ferrari, F.,et al., Digoxin in atrial fibrillation: an old topic revisited. Curr Cardiol Rev, 2020. 16: p.141–146.

96. Rathore, S.S., et al., Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure. JAMA, 2003.289(7): p.871-878.
97. Antman, E.M., et al., Treatment of 150 cases of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. Final report of a multicenter study. Circulation, 1990. 81(6): p.1744-1752.
98. Gheorghiade, M., et al., Digoxin in the management of cardiovascular disorders. Circulation, 2004. 109(24): p.2959-2964.
99. Ramirez-Ortega, M., et al., Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis?. Eur J Pharmacol, 2007.566(1-3): p.34-42.
100. Palade, P., et al., Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium. J Biol Chem,1983.258(13): p.8098-8107.
101. Cheng, H., et al., Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. Science, 1993. 262(5134): p.740-744.
102. Sobie, E.A., et al., The Ca 2+ leak paradox and rogue ryanodine receptors: SR Ca 2+ efflux theory and practice. Prog Biophys Mol Biol, 2006. 90(1-3): p. 172-85.
103. Cheng, H., et al., Calcium sparks and [Ca2+]i waves in cardiac myocytes. Am J Physiol, 1996. 270(1 Pt 1):C148-C159.
104. Homma, N., et al., Topics on the Na+/Ca2+ exchanger: involvement of Na+/Ca2+ exchange system in cardiac triggered activity. J Pharmacol Sci, 2006. 102(1): p.17-21.
105. Schlotthauer, K., et al., Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. Circ Res, 2000.87(9): p.774-780.
106. Keizer, J., et al., Saltatory propagation of Ca2+ waves by Ca2+ sparks. Biophys J, 1998. 75(2): p. 595-600.
107. Ferrier, G.R. Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials. Prog Cardiovasc Dis, 1977.19(6): p.459-474.
108. Kass, R.S., et al., Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. J Physiol, 1978. 281: p.209-226.
109. Lederer, W.J., et al. Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres. J Physiol, 1976. 263(2): p.73-100.
110. Ai, X., et al., Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in heart failure. Circ Res, 2005. 97(12): p.1314-1322.
111. Lindner, M., et al., Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure. Cell Calcium, 2002. 31(4): p.175-182.
112. Hirose, M., et al., Function of Ca (2+) release channels in Purkinje cells that survive in the infarcted canine heart: a mechanism for triggered Purkinje ectopy. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2008. 1(5): p.387-395.
113. Belevych, A.E., et al., Shortened Ca2+ signaling refractoriness underlies cellular arrhythmogenesis in a postinfarction model of sudden cardiac death. Circ Res, 2012. 110(4): p.569-577.
114. Mohamed, U., et al., Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. J Cardiovasc Electrophysiol, 2007.18(7): p.791-797.

115. Currie, S., et al., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. Biochem J, 2004. 377(Pt 2): p.357-366.
116. Curran, J., et al., Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca (2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. J Mol Cell Cardiol, 2010. 49(1): p.25-32.
117. Gonano, L.A., et al., Subcellular mechanisms underlying digitalis-induced arrhythmias: role of calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) in the transition from an inotropic to an arrhythmogenic effect. Heart Lung Circ, 2014. 23(12): p.1118-1124.
118. Ho, H.T, et al., Ryanodine receptor phosphorylation by oxidized CaMKII contributes to the cardiotoxic effects of cardiac glycosides. Cardiovasc Res, 2014. 101(1): p.165-174.
119. Garcia-Dorado, D., et al., Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. Cardiovasc Res, 2012. 94(2): p.168-180.
120. Sepúlveda, M., et al., Role of CaMKII and ROS in rapid pacing-induced apoptosis. J Mol Cell Cardiol, 2013. 63: p.135-145.
121. Koval, O.M., et al., CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010.107(11): p.4996-5000.
122. Di Carlo, M.N., et al., CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol, 2014. 74: p.274-283.
123. Chen, X., et al., Ca2+ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca2+ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. Circ Res, 2005. 97(10): p.1009-1017.
124. Ruiz-Meana, M., et al., The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. Cardiovasc Res, 2010. 88(1): p.30-39.
125. Lemasters, J.J., et al., Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta, 2009. 1787(11): p.1395-1401.
126. Bernardi, P., et al., The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. J Mol Cell Cardiol, 2015. 78: p.100-106.
127. Federico, M., et al., CaMKII activation in early diabetic hearts induces altered sarcoplasmic reticulum-mitochondria signaling. Sci Rep.,2021. 11(1): p.20025.
128. Micheletti, R., et al., Pharmacological profile of the novel inotropic agent (E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino)androstane-6,17-dione hydrochloride (PST2744). J Pharmacol Exp Ther, 2002. 303(2): p.592-600.
129. Shah, S.J., et al., Effects of istaroxime on diastolic stiffness in acute heart failure syndromes: results from the Hemodynamic, Echocardiographic, and Neurohormonal Effects of Istaroxime, a Novel Intravenous Inotropic and Lusitropic Agent: a Randomized Controlled Trial in Patients Hospitalized with Heart Failure (HORIZON-HF) trial. Am Heart J, 2009. 157(6): p.1035-1041.
130. Carubelli, V., et al., Treatment with 24 hour istaroxime infusion in patients hospitalised for acute heart failure: a randomised, placebo-controlled trial. Eur J Heart Fail, 2020. 22(9): p.1684-1693.
131. Forzano, I., et al., Efficacy of the New Inotropic Agent Istaroxime in Acute Heart Failure. J Clin Med, 2022. 11(24): p.7503.

132. Hasenfuss, G., et al., Cardiac inotropes: current agents and future directions. Eur Heart J, 2011. 32(15): p.1838-1845.
133. Rocchetti, M., et al., Modulation of sarcoplasmic reticulum function by PST2744 [istaroxime; (E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino) androstane-6,17-dione hydrochloride)] in a pressure-overload heart failure model. J Pharmacol Exp Ther, 2008.326(3): p.957-965.
134. Wallner, M., et al. Istaroxime, a potential anticancer drug in prostate cancer, exerts beneficial functional effects in healthy and diseased human myocardium. Oncotarget, 2017.8(30): p.49264-49274.
135. Ferrandi, M., et al., Istaroxime stimulates SERCA2a and accelerates calcium cycling in heart failure by relieving phospholamban inhibition. Br J Pharmacol, 2013. 169(8): p.1849-1861.
136. Alemanni, M., et al, Role and mechanism of subcellular Ca2+ distribution in the action of two inotropic agents with different toxicity. J Mol Cell Cardiol, 2011. 50(5): p.910-918.
137. Alevizopoulos, K., et al., Na+/K+ ATPase inhibitors in cancer. Curr Drug Targets, 2014. 15(10): p.988-1000.
138. Andersson, D.C., et al., Fixing ryanodine receptor Ca leak - a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. Drug Discov Today Dis Mech, 2010. 7(2): e151-e157.
139. Venetucci, L.A., et al., Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca2+ release and increase Ca2+ transient amplitude in adult ventricular myocytes. Circ Res, 2006. 98(10): p.1299-1305.
140. Connell, P., et al., Targeting pathological leak of ryanodine receptors: preclinical progress and the potential impact on treatments for cardiac arrhythmias and heart failure. Expert Opin Ther Targets, 2020. 24(1): p.25-36.
141. Szentandrássy, N., et al., Therapeutic Approaches of Ryanodine Receptor-Associated Heart Diseases. Int J Mol Sci, 2022. 23(8): p.4435.
142. Wehrens, X.H., et al., Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. Science, 2004.304(5668): p.292-296.
143. Fruen, B.R., et al., Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. J Biol Chem, 1997. 272(43): p.26965-26971.
144. Maxwell, J.T., et al., Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca2+ release in heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012. 302(4): H953-H963.
145. Hunt, S.A., et al., 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Am Coll Cardiol, 2009. 53(15): e1-e90.
146. Zhou, Q., et al., Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca2+ release. Nat Med, 2011;17(8): p.1003-1009.
147. Liao, R., et al., The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 303(2):H156-H167.

148. Shioya T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. J Physiol Sci. 2007;57(6):327-335.
149. Picht, E., et al., SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. Am J Physiol Cell Physiol, 2007.293(3):C1073-C1081.
150. Morell, M., et al., AMPK-dependent nitric oxide release provides contractile support during hyperosmotic stress. Basic Res Cardiol, 2017.113(1):7.
151. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science. 1997;278(5336):294-298.
152. Bai, Y., et al., Phospholamban knockout breaks arrhythmogenic Ca^{2+} waves and suppresses catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice. Circ Res, 2013. 113(5): p. 517-526.
153. Valverde, C.A., et al., Ablation of phospholamban rescues reperfusion arrhythmias but exacerbates myocardium infarction in hearts with Ca2+/calmodulin kinase II constitutive phosphorylation of ryanodine receptors. Cardiovasc Res, 2019.115(3): p.556-569.
154. Santana, L.F., et al., Calcium sparks and excitation-contraction coupling in phospholamban-deficient mouse ventricular myocytes. J Physiol, 1997.503 (Pt 1): p.21-29.
155. Lotan, C.S., et al., Amiloride in ouabain-induced acidification, inotropy and arrhythmia: 23Na & 31P NMR in perfused hearts. J Mol Cell Cardiol, 1992. 24(3): p.243-257.
156. Zhu, W., et al., Activation of CaMKIIdeltaC is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis. J Biol Chem, 2007;282(14): p.10833-10839.
157. Salas, M.A., et al., The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol, 2010. 48(6): p.1298-1306.
158. Joiner, M.L., et al., CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. Nature, 2012. 491(7423): p.269-273.
159. Fieni, F., et al., Mitochondrial Ca2+ uniporter and CaMKII in heart. Nature, 2014. 513(7519): E1-E2.
160. Nickel, A.G., et al., CaMKII does not control mitochondrial Ca^{2+} uptake in cardiac myocytes. J Physiol, 2020. 598(7): p.1361-1376.
161. Galluzzi, L., et al., Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ, 2018. 25(3): p.486-541.
162. Kuramochi, Y., et al., Rapid electrical stimulation induces early activation of kinase signal transduction pathways and apoptosis in adult rat ventricular myocytes. Exp Physiol, 2006. 91(4): p.773-780.
163. Ling, H., et al. Requirement for Ca2+/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. J Clin Inves, 2009. 119(5), p.1230–1240.
164. Weinreuter, M., et al., CaM Kinase II mediates maladaptive post-infarct remodeling and pro-inflammatory chemoattractant signaling but not acute myocardial ischemia/reperfusion injury. EMBO Mol Med, 2014.6(10): p.1231-1245.

165. Suetomi, T., et al., Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca^{2+}/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling. Circulation, 2018.138(22): p.2530-2544.
166. Mazzocchi, G., et al., Phospholamban ablation rescues the enhanced propensity to arrhythmias of mice with CaMKII-constitutive phosphorylation of RyR2 at site S2814. J Physiol, 2016. 594(11): p.3005-3030.
167. Zhang, T., et al., Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKIIdelta(C) transgenic mice. Circ Res, 2010. 106(2): p. 354-62.
168. Alevizopoulos, K., et al., Functional characterization and anti-cancer action of the clinical phase II cardiac Na+/K+ ATPase inhibitor istaroxime: in vitro and in vivo properties and cross talk with the membrane androgen receptor. Oncotarget, 2016. 7(17): p.24415-24428.
169. Stagno, M.J., et al. Istaroxime Inhibits Motility and Down-Regulates Orai1 Expression, SOCE and FAK Phosphorylation in Prostate Cancer Cells. Cell Physiol Biochem. 2017;42(4): p.1366-1376.
170. Nanda, A. et al., Hormonal therapy use for prostate cancer and mortality in men with coronary artery disease-induced congestive heart failure or myocardial infarction. JAMA, 2009. 302(8): p.866-873.
171. Shannon, T.R., et al, Quantitative assessment of the SR Ca2+ leak load relationship. Circ Res, 2002. 91(7): p. 594-600.
172. Liu B, Lou Q, Smith H, et al. Conditional Up-Regulation of SERCA2a Exacerbates RyR2-Dependent Ventricular and Atrial Arrhythmias. Int J Mol Sci. 2020;21(7):2535.
173. Fernandez-Tenorio, M., et al., Stabilization of Ca^{2+} signaling in cardiac muscle by stimulation of SERCA. J Mol Cell Cardiol, 2018. 119: p.87-95.
174. Lyon, A.R., et al., SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011.4(3): p.362-372.
175. Singh, M.V., et al., MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMKII oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol, 2012;52(5): p.1135-1144.
176. Luo, M., et al., Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. J Clin Invest, 2013. 123(5):2333.
177. Del Monte, F., et al., Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. Circulation, 2001. 104(12): p.1424-1429.
178. Kawase, Y., et al., Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(11): p.1112-1119.
179. Jessup, M., et al., Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in patients with advanced heart failure. Circulation, 2011. 124(3): p.304-313.
180. Greenberg, B., et al., Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational,

double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. Lancet, 2016. 387(10024): p.1178-1186.

181. Torre, E., et al. SERCA2a stimulation by istaroxime improves intracellular Ca2+ handling and diastolic dysfunction in a model of diabetic cardiomyopathy. Cardiovasc Res, 2022.118(4): p.1020-1032.
182. Currie, S., et al., Two candidates at the heart of dysfunction: The ryanodine receptor and calcium/calmodulin protein kinase II as potential targets for therapeutic intervention-An in vivo perspective. Pharmacol Ther, 2011.131(2): p.204-220.
183. Sacherer, M., et al., JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium. Br J Pharmacol, 2012. 167(3): p. 493-504.
184. Yano, Y., et al., Stabilizing cardiac ryanodine receptor with dantrolene treatment prevents left ventricular remodeling in pressure-overloaded heart failure mice. Biochem Biophys Res Commun, 2023. 642: p.175-184.
185. Kajii, T., et al., Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure- overload induced failing hearts. Biochem Biophys Res Commun, 2020. 521(1): p.57-63.
186. Fujii, S., et al., RyR2-targeting therapy prevents left ventricular remodeling and ventricular tachycardia in post-infarction heart failure. J Mol Cell Cardiol, 2023. 178: p.36-50.
187. Kobayashi, S., et al., Stabilizing Tetrameric Structure of Ryanodine Receptor Cures Lethal Arrhythmia in Heart Failure. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2022.15(10): e011220.
188. Maruyama, M., et al., Carvedilol analogue inhibits triggered activities evoked by both early and delayed afterdepolarizations. Heart Rhythm, 2013.10(1): p.101-107.
189. Martinez-Hernandez E., et al., Effect of carvedilol on atrial excitation-contraction coupling, Ca^{2+} release, and arrhythmogenicity. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2020.318(5): H1245-H1255.
190. Priori, S.G., Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca2+ handling and arrhythmogenesis. Circ Res, 2011. 108(7): p. 871-83.
191. Respress, J.L., et al., Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. Circ Res. 2012;110(11): p.1474-1483.
192. Savarese, G., et al., Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. Cardiovasc Res, 2023.118(17): p.3272-3287.
193. Wu, L.L., et al., Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum is impaired during the hypodynamic phase of sepsis in the rat heart. Shock, 2001.15(1): p.49-55.
194. Hobai, I.A., et al., Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy. Shock, 2015. 43(1): p.3-15.
195. Sepúlveda, M., et al., Calcium/Calmodulin Protein Kinase II-Dependent Ryanodine Receptor Phosphorylation Mediates Cardiac Contractile Dysfunction Associated With Sepsis. Crit Care Med, 2017.45(4): e399-e408.