

**ROL DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS QUE
MANEJAN EL CALCIO INTRACELULAR EN EL
ATONTAMIENTO CARDÍACO Y EL TAMAÑO DEL INFARTO
MIOCÁRDICO**

Carlos A. Valverde

TESIS DOCTORAL

**Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata**



Director: Dra. Alicia R. Mattiazzi

Co-director: Dra. Cecilia B. Mundiña-Weilenmann

Asesor científico: Dr. Gustavo Rinaldi

Año 2008

Lugar de realización: Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Cs. Médicas, U.N.L.P., La Plata, Argentina y Department of Physiology, Health Sciences Center, Texas Tech University, Lubbock, Texas, EE.UU.

Índice

INTRODUCCION.....	4
I. Calcio como segundo mensajero.....	4
1. Calmodulina.....	5
2. Quinasas y fosfatasas dependientes de Ca^{+2} y CaM.....	6
II. Acoplamiento éxcito-contráctil.....	10
1. Historia... ..	10
2. Estructuras y Proteínas involucradas en el AEC.....	12
2.1. Principales estructuras que almacenan Ca^{2+}	12
2.1.1. Espacio extracelular.....	12
2.1.2. Sarcolema.....	13
2.1.3. Túbulos Transversales (Túbulos T).....	13
2.1.4. Retículo Sarcoplasmático.....	14
2.1.5. Mitocondrias.....	14
2.2. Canales de Ca^{2+} tipo L - DHPR.....	15
2.3. Receptor de Rianodina - RyR.....	17
2.4. Calsequestrina - CSQ.....	19
2.5. Bomba de Ca^{2+} del RS - SERCA.....	20
2.6. Fosfolamban - PLN.....	21
2.7. ATPasa del sarcolema.....	22
2.8. Intercambiador Sodio/Calcio - NCX.....	23
2.9. Bomba Sodio/Potasio ATPasa - Na^{+}/K^{+} ATPasa.....	25
3. Aparato contráctil - miofibrillas.....	26
4. Ciclo del Acoplamiento Excitación-Constracción - AEC.....	28
III. Rol de la CaMKII en el AEC.....	29
IV. Rol de la CaMKII en la apoptosis.....	30
V. Injuria reversible por isquemia y reperfusión.....	32
VI. Injuria irreversible por isquemia y reperfusión.....	36
OBJETIVOS.....	38
I. Injuria reversible por isquemia y reperfusión - atontamiento miocárdico.....	38
II. Injuria irreversible por isquemia y reperfusión - necrosis y apoptosis.....	38

MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
I. Animales.....	39
1. Perfusión de corazones aislados de ratón.....	39
1.1. Protocolo de isquemia y reperfusión.....	40
1.1.1. Evaluación simultánea de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la PDVI en el corazón entero.....	41
2. Perfusión de corazones aislados de rata.....	43
2.1. Protocolo de isquemia y reperfusión.....	43
II. Determinaciones Bioquímicas.....	44
1. Preparación de homogenatos.....	44
2. Electroforesis y análisis por Western blots.....	44
III. Tamaño del infarto.....	46
IV. Determinación de actividad de LDH.....	47
V. T.U.N.E.L.....	47
VI. Análisis estadístico.....	48
RESULTADOS.....	49
I. Injuria Reversible en Corazones Perfundidos de Ratones Transgénicos.....	49
1. Fosforilación de fosfolamban inducida por isquemia y reperfusión.....	49
2. Actividad Mecánica durante el protocolo de isquemia y reperfusión.....	50
3. Estimación del calcio intracelular durante el protocolo de isquemia y reperfusión.....	53
4. Respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos.....	55
II. Injuria Irreversible en Corazones Perfundidos de Ratas.....	60
1. Fosforilación de fosfolamban en la injuria irreversible por isquemia y reperfusión.....	60
2. Actividad mecánica durante el protocolo de isquemia-reperfusión en corazones de rata.....	61
3. Tamaño de infarto.....	62
4. Liberación de LDH.....	63
5. Apoptosis.....	63
DISCUSION.....	67
I. Injuria reversible en corazones de ratones sometidos a isquemias breves.....	67
1. Evaluación del Ca^{2+} intracelular.....	68

2. Respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos.....	70
3. Alteraciones mecánicas.....	71
II. Injuria irreversible en corazones de rata sometidos a isquemias prolongadas.....	73
1. Recuperación contráctil.....	73
2. Infarto y Necrosis.....	74
3. Apoptosis.....	75
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	77

Introducción

Este trabajo de Tesis aborda el rol de la isoforma II de una proteína quinasa, cuya actividad depende del ión calcio (Ca^{2+}) y de la proteína calmodulina (CaM), denominada CaMKII, en la injuria reversible e irreversible inducida por isquemia y reperfusión (IR) en el músculo cardíaco. Como se explicará más adelante, esta quinasa multifuncional regula numerosos procesos celulares entre los cuales se pueden mencionar el acoplamiento eléctrico-contráctil (AEC) y la muerte celular por apoptosis que ocurre en procesos crónicos como la insuficiencia cardíaca. A manera general de introducción a estos temas, se describirá el rol del Ca^{2+} como segundo mensajero, las características y funciones de la CaMKII, los diferentes pasos y procesos que intervienen en el AEC y en la apoptosis, y su vinculación con la CaMKII en el músculo cardíaco. Finalmente se detallarán las características principales de la injuria reversible (*atontamiento miocárdico*, AM) e irreversible (infarto) por IR.

I. Calcio como segundo mensajero

Entre los elementos que constituyen el cuerpo humano, el Ca^{2+} es el elemento más abundante luego del oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno. El contenido total de Ca^{2+} en el cuerpo es aproximadamente 1 Kg, comprendiendo casi un 1,5% del peso corporal. La mayor parte del Ca^{2+} (99%) se encuentra presente en los huesos y dientes; el restante se encuentra distribuido en todo el cuerpo y cumple un rol fisiológico muy importante (Endo, 2006).

Como un segundo mensajero intracelular, el Ca^{2+} regula funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la

contracción de los músculos liso, esquelético y cardíaco, así como la liberación de hormonas y neurotransmisores. El Ca^{2+} también es capaz de regular respuestas celulares, tales como la proliferación y la supervivencia celular. En consecuencia, la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} puede llevar no sólo a la pérdida de mecanismos de control fisiológicos sino que puede producir además cambios en el crecimiento celular y aún intervenir en la producción de muerte celular.

El incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es utilizado por

hormonas y neurotransmisores en la generación de respuestas fisiológicas. Así, por ejemplo, en músculo liso o glándulas secretorias, ciertos tipos de ligandos (tales como noradrenalina, acetilcolina y endotelina-1, entre otros) son capaces de estimular una cascada de señales que culmina en la movilización de Ca^{2+} del retículo endo/sarcoplasmático y el aumento transitorio de su concentración citoplasmática.

En las células cardíacas, la concentración de Ca^{2+} intracelular (citosólico) se regula de una manera muy precisa en un valor cercano a 100 nanomolar en condiciones basales (diástole). Estos valores se mantienen aún en presencia de concentraciones milimolares de Ca^{2+} en el espacio extracelular así como en algunas organelas, tales como el retículo sarcoplasmático (RS).

El papel desempeñado por el Ca^{2+} en la contractilidad cardíaca ha sido el centro de investigaciones por más de un siglo a partir de la observación realizada por Ringer en 1883 (Ringer, 1883) sobre el necesario rol del Ca^{2+} extracelular en la contracción del músculo cardíaco. Desde ese descubrimiento, muchos investigadores han intentado dilucidar el papel relativo de las dos grandes fuentes de Ca^{2+} para la contracción muscular: el espacio extracelular, capaz de proveer el Ca^{2+} que ingresa a la célula, y la fuente interna, el RS, que se encarga de liberar Ca^{2+} al citosol (Kranias, 2002). La importancia relativa entre estas dos fuentes de Ca^{2+} puede

variar en las diferentes especies, y será discutida más adelante.

A diferencia del músculo cardíaco, la contracción del músculo esquelético se inicia por la liberación de Ca^{2+} desde el RS inducida por cambios en el voltaje de la membrana plasmática (Ríos y Pizarro, 1991), y el Ca^{2+} extracelular no juega ningún papel.

1. Calmodulina

Las células poseen una gran variedad de proteínas que unen Ca^{2+} , y éstas contribuyen a las señales mediadas por este ión. Un grupo de proteínas pueden unir Ca^{2+} sin sufrir cambios estructurales importantes, actuando así como amortiguadoras o transportadoras del Ca^{2+} libre. En otro grupo de éstas, la unión al Ca^{2+} induce un cambio conformacional, operando así como sensores que median el papel del Ca^{2+} como mensajero intracelular. La calmodulina (del inglés *Calcium modulatory protein*, CaM), una proteína de 148 aminoácidos (16,6 kDa), es una de estas proteínas que actúan como sensor de Ca^{2+} . El Ca^{2+} unido a CaM provoca la activación de diferentes proteínas quinasas, proteínas fosfatasa, óxido nítrico sintasa, etc. La CaM pertenece a la familia de las proteínas mano-EF (del inglés *EF-hand*). Este dominio estructural describe a dos secuencias de conformación helicoidal orientadas perpendicularmente entre sí y conectadas por un lazo que contiene residuos aminoacídicos con alta afinidad por el Ca^{2+} . Los sitios de unión para Ca^{2+} están en gran parte

desocupados a concentraciones de Ca^{2+} de reposo, pero cuando el Ca^{2+} intracelular aumenta, son capaces de unir Ca^{2+} de modo cooperativo. Como consecuencia de su unión al Ca^{2+} , la CaM sufre un cambio conformacional de modo que se vuelve activa para reconocer y unirse a proteínas blanco con muy alta afinidad (K_d : 10^{-7} - 10^{-10} M) (Maier y Bers, 2002). La afinidad de unión (CaM-proteína blanco) varía con la proteína blanco, lo que resulta de importancia para la competencia relativa entre estas proteínas durante el ciclo cardíaco.

2. Quinasas y fosfatasas dependientes de Ca^{+2} y CaM

En el corazón existen al menos tres enzimas dependientes de Ca^{2+} y CaM que participan significativamente en la función cardíaca: la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y CaM (CaMK), la proteína fosfatasa tipo 2B (PP2B, también llamada calcineurina) y la quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK). La MLCK regula la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos y así colabora en el control de la contractilidad cardíaca (Morano y col., 1985). Esta quinasa sólo posee una proteína blanco específica, a diferencia de la calcineurina y la CaMK, que tienen especificidad por un amplio espectro de proteínas. La calcineurina es una fosfatasa que posee alta afinidad por CaM ($K_m \sim 0,1$ nM para calcineurina vs. 20-100 nM para

CaMKII) y puede ser activada por bajas, pero sostenidas, concentraciones de Ca^{2+} (Dolmetsch y col., 1997). Esta fosfatasa se encuentra implicada en la cascada de señales que activa los reguladores nucleares específicos que provocan hipertrofia cardíaca (Frey y col., 2000; Wilkins y col., 2004; Heineke y Molkentin, 2006).

Las CaMK constituyen una familia de proteína quinasas que median muchas de las respuestas celulares a señales de Ca^{2+} . Esta familia está compuesta por las CaMKI, CaMKII y CaMKIV, las cuales presentan una amplia distribución tisular. Varios estudios durante la última década han demostrado que estas quinasas establecen el nexo entre el segundo mensajero Ca^{2+} y las respuestas celulares correspondientes, a través del mecanismo de fosforilación, una modificación post-traduccional rápida que es altamente específica y reversible. Esta reacción involucra un dador de fosfato (adenosintrifosfato, ATP) y un aminoácido aceptor de fosfato (como por ejemplo tirosina, serina, etc.) en una proteína sustrato blanco. Las CaMK pertenecen a la familia de las proteína-quinasas de serina/treonina y tienen algunas características en común en relación a su estructura, regulación y activación (Soderling, 1999; Hook y Means, 2001; Soderling y Stull, 2001). Mientras que CaMKI y CaMKIV son monoméricas, y presentan niveles muy bajos de expresión en corazón (Picciotto y col., 1995; Goldberg y col., 1996; Soderling y Stull, 2001; Colomer y

col., 2003), la CaMKII actúa en forma de enzima multimérica y es la principal isoforma cardíaca (Maier y Bers, 2002). La CaMKII es capaz de fosforilar múltiples sustratos. Frente a diferentes estímulos (potenciales de acción, neurotransmisores, hormonas, etc.) la célula puede responder con cambios transitorios en los niveles de Ca^{2+} citosólico (Berridge y col., 2000; Bootman y col., 2001). Estas diferentes señales de Ca^{2+} pueden contener información que requiere de un decodificador para que se traduzcan en eventos corriente abajo (*downstream*). La CaMKII es uno de los principales mediadores de señales mediadas por Ca^{2+} y regula una gran variedad de funciones celulares como por ejemplo el metabolismo de carbohidratos, la expresión genética, el ciclo celular, la síntesis y liberación de neurotransmisores, la excitabilidad de membrana, mecanismos relacionados con el aprendizaje y la memoria y la contracción cardíaca (Braun y Schulman, 1995; Malenka y Nicoll, 1999; Soderling y col., 2001; Hudmon y Schulman, 2002; Maraldi y col., 2006; House y col., 2007).

La capacidad que posee la CaMKII de diferenciar oscilaciones localizadas de Ca^{2+} está dada principalmente por 1) la localización específica en diferentes compartimentos, tales como núcleo, filamentos de actina, densidades postsinápticas y membranas intracelulares (Ohta y col., 1986; Srinivasan y col., 1994; Brocke y col., 1995; Shen y col., 1998; Bayer

y Schulman, 2001; Dosemeci y col., 2001), y 2) su disposición estructural e interacción intraholoenzima que le permite traducir el número y frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} en diferentes niveles de actividad (De Koninck y Schulman, 1998), tal como se describe más adelante. Adicionalmente, los roles mencionados de la CaMKII son posibles debido a la actividad de diferentes isoformas que derivan de cuatro genes altamente relacionados pero diferentes entre sí [α , β , γ y δ , (Braun y Schulman, 1995)]. Cada uno de estos genes produce un ARNm que puede sufrir *splicing* alternativo en la región llamada de insertos variables, dando lugar al menos a 30 proteínas diferentes (Tombes y Krystal, 1997; Hudmon y Schulman, 2002).

Muchos estudios demostraron que la isoforma δ de la CaMKII es la que predomina en corazón, y ésta tiene dos variantes de *splicing*, δ_B y δ_C , que se expresan en diferentes compartimentos (Edman y Schulman, 1994; Srinivasan y col., 1994; Ramirez y col., 1997). La variante δ_B tiene un péptido señal de localización nuclear que ubica a esta variante preferentemente en el núcleo de los miocitos cardíacos, mientras que la variante δ_C , que carece de este péptido señal, se localiza en el citoplasma (Figura 1). Las diferentes localizaciones subcelulares podrían sugerir que estas variantes poseen diferente sensibilidad al complejo Ca/CaM, modos específicos de activación, y distintas funciones. La variante δ_C es la responsable de

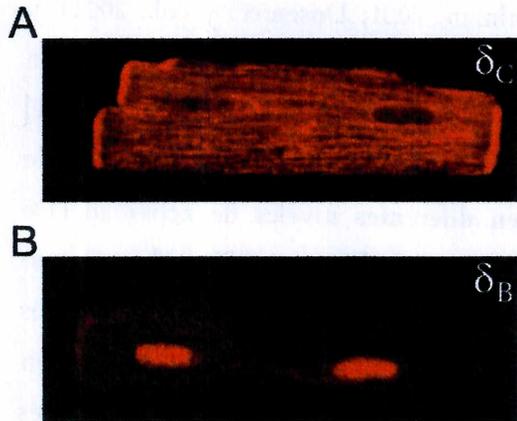


Figura 1. Inmunofluorescencia confocal de CaMKII en cardiomiocitos transfectados de ratones. La transfección con vectores virales de expresión de las isoformas δ_C o δ_B marcadas, demuestran la diferente localización celular de la CaMKII. δ_C citosólica (A) y δ_B nuclear (B). (Zhu y col., 2003).

la fosforilación de proteínas relacionadas con el manejo del Ca^{2+} intracelular. Además, la activación de CaMKII δ_C fue descrita como un intermediario común por el cual ciertos estímulos, como por ejemplo la estimulación beta adrenérgica, pueden producir muerte por apoptosis (Zhu y col., 2007). Estudios de sobreexpresión de la isoforma δ_B en células cardíacas aisladas de rata, muestran que esta isoforma se encuentra relacionada con la

regulación de la expresión genética (Ramirez y col., 1997). También se describió la activación simultánea de ambas variantes, δ_B y δ_C , en respuesta a una sobrecarga de volumen inducida por bandedo aórtico (Zhang y col., 2003).

En la Figura 2 se muestra un diagrama linealizado de la estructura de los dominios de la CaMKII. De manera general, cada subunidad de CaMKII posee un dominio catalítico, uno autorregulatorio (a este segmento se une el complejo Ca^{2+}/CaM y posee sitios de fosforilación) y uno de asociación. El segmento autorregulatorio es capaz de mantener la actividad basal de la quinasa entre unas 100 y 1000 veces por debajo del máximo valor estimulado por la unión de Ca^{2+}/CaM . En el estado autoinhibido de la CaMKII, el dominio de autorregulación actúa como un pseudosustrato, restringiendo o inhibiendo la actividad enzimática en ausencia del complejo Ca^{2+}/CaM . Todas las isoformas comparten sitios conservados de fosforilación

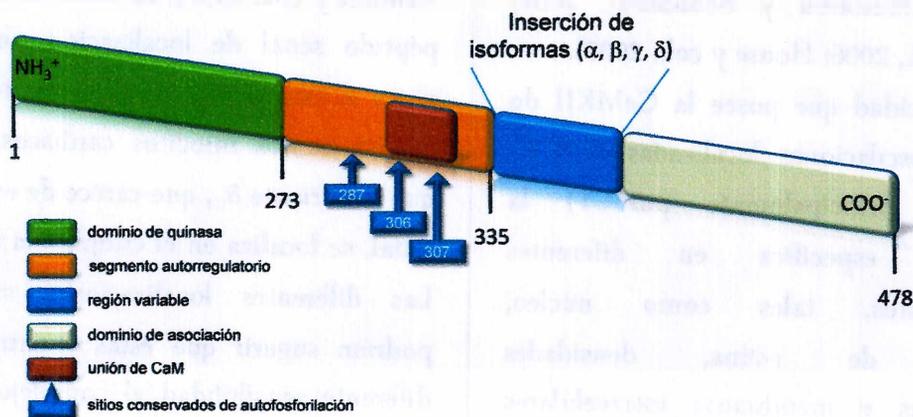


Figura 2. Diagrama lineal de la subunidad de CaMKII. En colores se indican los dominios de la quinasa y los sitios de fosforilación relevantes.

dentro de la región de autorregulación, Thr²⁸⁷ (Thr²⁸⁶ en la isoforma α) en el dominio regulatorio central, y Thr³⁰⁶/Thr³⁰⁷ (Thr^{305/306} en la isoforma α) en el dominio de unión de CaM. En el extremo carboxilo terminal, se encuentra el dominio de asociación que permite la unión de las formas nativas de la enzima para conformar una holoenzima multimérica compuesta por 12 subunidades (Figura 3).

Cuando el complejo Ca²⁺/CaM se une al dominio autorregulatorio induce un cambio en la conformación que libera el dominio catalítico volviéndolo activo. Las subunidades ahora activas de la CaMKII multimérica, pueden actuar como sustrato y quinasa en una reacción de autofosforilación intraholoenzima en el residuo Thr²⁸⁷. La

autofosforilación coloca a la CaMKII en un estado de actividad enzimática independiente de la unión al complejo Ca²⁺/CaM, conocido como actividad autónoma o independiente de Ca²⁺/CaM. La autofosforilación en el residuo Thr²⁸⁷ no sólo transforma a la CaMKII en autónoma luego de la disociación de Ca²⁺/CaM, sino que además aumenta su afinidad por el complejo Ca²⁺/CaM en aproximadamente 1000 veces, proceso llamado *CaM trapping* (atrapamiento). Por otra parte, luego de la autofosforilación de Thr²⁸⁷ y de la disociación de Ca²⁺/CaM, la CaMKII comienza una serie de autofosforilaciones que inhiben la posterior reactivación por unión de Ca²⁺/CaM, proceso llamado *CaM capping* (sellado). Este proceso se debe a la autofosforilación de los residuos

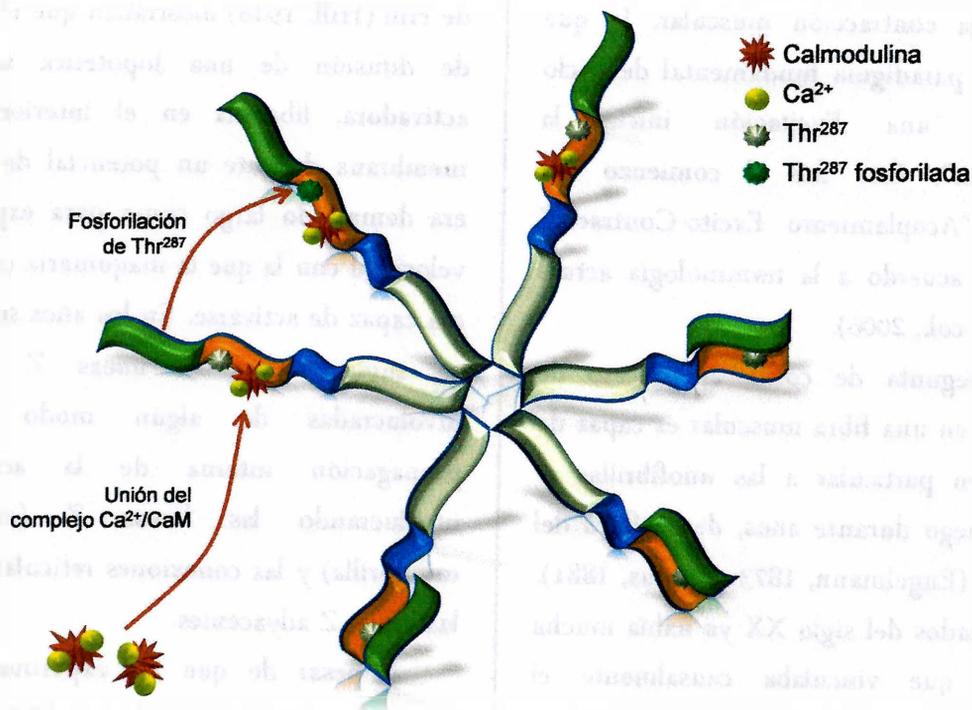


Figura 3. Esquema de la estructura de la holoenzima multimérica CaMKII. Se muestra el mecanismo de activación por Ca²⁺/CaM y autofosforilación del sitio Thr²⁸⁷.

Thr^{307/308} en el dominio de unión a CaM, que genera un cambio conformacional que impide la nueva unión de CaM. La fosforilación en estos sitios también puede ocurrir en forma muy lenta en el estado basal o inactivo de CaMKII, cuando la quinasa no está unida a Ca²⁺/CaM. La desfosforilación de los residuos mencionados (Thr^{287/306/307}) regresa a la enzima a su estado basal de

actividad. Entre las fosfatasas que actúan sobre CaMKII se han descrito la PP1, PP2A, PP2C y una nueva familia de fosfatasas específicas de CaMKII (Ishida y col., 2003). Así, los ciclos de fosforilación y desfosforilación en los diferentes sitios mencionados, permiten una regulación minuciosa de la actividad de esta enzima.

II. Acoplamiento excito-contráctil

1. Historia...

En 1868 Julius Bernstein registró con un galvanómetro una respuesta a la excitación de un nervio que fue, en realidad, el primer registro de un potencial de acción. Tres años más tarde, Bernstein descubrió que en los músculos se produce un potencial de acción previo a la contracción muscular, lo que sugirió un paradigma fundamental del ciclo muscular, "una Excitación inicia la Contracción". Éste fue el comienzo del concepto "Acoplamiento Excito-Contráctil" (AEC) de acuerdo a la terminología actual (Maltsev y col., 2006).

La pregunta de cómo el proceso de excitación en una fibra muscular es capaz de alcanzar en particular a las miofibrillas se discutió luego durante años, desde fines del siglo XIX (Engelmann, 1873; Retzius, 1881). Para mediados del siglo XX ya había mucha evidencia que vinculaba causalmente el proceso de contracción con una reducción (o reversión) del potencial de membrana, y se

creía que éste no podía afectar estructuras que estuvieran a una distancia de la membrana mayores al orden de los ångströms. Por lo tanto era necesario postular algún nexo por el cual se pudiesen activar las miofibrillas que se encontraban a varios micrones de la superficie. Los cálculos de Hill (Hill, 1948) mostraban que el tiempo de difusión de una hipotética sustancia activadora, liberada en el interior de la membrana durante un potencial de acción, era demasiado largo como para explicar la velocidad con la que la maquinaria contráctil era capaz de activarse. En los años siguientes se sugirió que las líneas Z estarían involucradas de algún modo en la propagación interna de la activación, involucrando las líneas Z (en cada miofibrilla) y las conexiones reticulares entre las líneas Z adyacentes.

A pesar de que los experimentos de Ringer, antes mencionados, hablaban de la necesidad del Ca²⁺ extracelular para la

contracción muscular, la aceptación del rol fundamental del Ca^{2+} en la contracción estaba todavía lejos. Heilbrunn demostró en 1940 que el Ca^{2+} actuaba sobre los elementos contráctiles intracelulares (Heilbrunn, 1940). Aunque otros autores como Kamada y Kinoshita (Kamada y Kinoshita, 1943) mostraron resultados similares, en esos años el concepto de que el Ca^{2+} inducía la contracción fisiológica no recibió apoyo. En 1949, Szent-Gyorgyi describió que el músculo se contraía con el agregado de ATP, pero a la vez se preguntaba por qué no se relajaba cuando el ATP era removido (Szent-Gyorgyi, 1949), otra evidencia de que no se pensaba en el Ca^{2+} como elemento necesario para la contracción. Más tarde, en 1954 se observó que el agregado de EDTA, un quelante de Ca^{2+} , era capaz de inducir la relajación (Bozler, 1954). Ebashi en 1960 confirmó estos resultados mostrando que la actividad quelante de estos agentes mantenía estrecha relación con la actividad relajante en condiciones iónicas fisiológicas (Ebashi, 1960; Ebashi, 1980). En la misma época, se sugirió que algún componente del RS era la estructura relacionada con la contracción-relajación, en lugar de las líneas Z (Porter y Palade, 1957; Huxley y Straub, 1958). Hasselbach, y paralelamente Ebashi, finalmente mostraron que el RS acumulaba Ca^{2+} y por lo tanto éste era el factor relajante de la contracción (Hasselbach y Makinose, 1961; Ebashi y Lipmann, 1962). El concepto completo de que el Ca^{2+} actúa como segundo

mensajero en el AEC fue descrito con detalle por primera vez en 1968 en la revisión "*Calcium ion and muscle contraction*" por Ebashi y Endo (Ebashi y Endo, 1968).

En la década de los '70 se estableció que el AEC era diferente en el corazón y en el músculo esquelético, y que el disparo para la contracción en el músculo cardíaco era simplemente la entrada de una pequeña cantidad de Ca^{2+} extracelular. El Ca^{2+} que ingresa a la célula miocárdica desde el exterior celular durante el *plateau* del potencial de acción, provoca una mayor liberación de Ca^{2+} desde el RS a través de canales específicos del mismo. Este mecanismo descubierto por Fabiato y Fabiato, recibió el nombre de "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ", o en inglés: *Calcium Induced Calcium Release* (CIRC) (Fabiato y Fabiato, 1975). El Ca^{2+} liberado por este mecanismo induce el deslizamiento de los miofilamentos que conlleva al acortamiento o contracción de los miocitos. Esta misma década fue también la que vio el descubrimiento en el músculo esquelético de un pequeño movimiento de carga, que reflejaba el movimiento de un dipolo en la membrana de los túbulos T, que estaba asociado a una posterior liberación de Ca^{2+} . A este movimiento de carga se lo comparó con una palanca que era capaz de quitar un tapón de la cisterna terminal del RS para vaciar el Ca^{2+} en el mioplasma. Más adelante se comprobó que esta molécula que generaba el movimiento de carga era el canal de Ca^{2+}

tipo L o receptor de dihidropiridina (DHPR), actuando como un sensor de voltaje (Schneider y Chandler, 1973; Ríos y Pizarro, 1991).

Un gran avance a principios de la década del '80 fue la identificación del canal liberador de Ca^{2+} del RS como una proteína de muy alto peso molecular con una alta afinidad por el alcaloide vegetal rianodina (RyR, ver más adelante) (Fleischer y col., 1985; Smith y col., 1985; Meissner, 1986; Inui y col., 1987). Y un paso fundamental en la historia del AEC fue entender la estrecha relación entre RyR y DHPR, de gran importancia para el proceso de liberación de Ca^{2+} .

A partir de los '90, una vez que las principales moléculas involucradas en el AEC fueron identificadas, los investigadores comenzaron a dirigir los experimentos para definir las interacciones moleculares entre estas proteínas. Se realizaron experimentos *in vitro* con proteínas aisladas que permitieron estudiar los eventos moleculares. El advenimiento de los animales transgénicos resultó una herramienta muy útil para explorar el proceso de AEC *in vivo*. Los conocimientos actuales son el resultado de una composición de ambos tipos de experimentos.

2. Estructuras y Proteínas involucradas en el AEC

2.1. Principales estructuras que almacenan Ca^{2+}

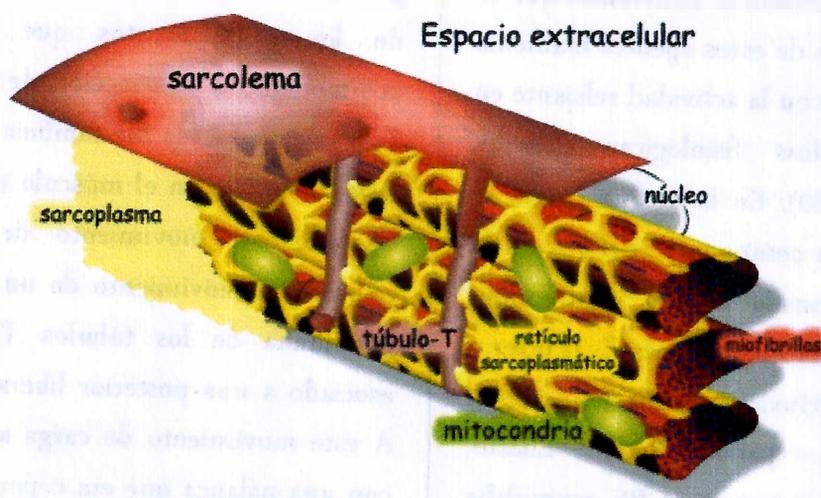


Figura 4. Esquema descriptivo de las estructuras relacionadas con el acoplamiento excitación-contracción.

2.1.1. Espacio extracelular

Según las preparaciones y los métodos utilizados para su determinación, se estima

que el espacio extracelular representa entre un 25 y 35% del volumen del tejido cardíaco (Frank y Langer, 1974; Lee y Fozzard, 1975; Bridge y col., 1982). Este espacio constituye una fuente que puede proveer Ca^{2+} en cantidad más que suficiente para promover la contracción. Se conoce que la concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular es de aproximadamente 2 mM. Sin embargo, la cantidad de Ca^{2+} puede ser aún mayor (casi el doble del valor mencionado), si incluimos el Ca^{2+} que se encuentra unido a sitios con baja afinidad por este ión, como por ejemplo fosfolípidos cargados negativamente.

2.1.2. Sarcolema

El sarcolema es el nombre que se utiliza para designar a la membrana externa que rodea cada célula muscular, y se encuentra constituida por la membrana plasmática y una capa de material polisacárido (hidratos de carbono complejos), así como de fibras delgadas de colágeno que le ofrecen resistencia al sarcoplasma. La superficie sarcolemal es un continuo con la membrana de los túbulos transversales (túbulos T, que se describen a continuación) y los dos como tales, forman una barrera de permeabilidad entre el interior de la célula y el medio extracelular. La organización ultraestructural del sarcolema es de mucha importancia dado que no sólo es el sitio por donde el Ca^{2+} entra y sale de la célula sino que en él se encuentran otros canales y transportadores cuya localización no puede quedar librada al

azar para poder conservar su funcionalidad. Es por ello que existe una distribución diferencial de los canales iónicos, bombas y otras especializaciones de la membrana.

La cara del sarcolema que enfrenta al sarcoplasma posee fosfolípidos cargados negativamente (fosfatidilserina y fosfatidilinositol), que serían sitios posibles de unión del Ca^{2+} (Post y col., 1988). Esta superficie es capaz de unir Ca^{2+} , y de almacenarlo hasta una concentración de 60 μM .

2.1.3. Túbulos Transversales (Túbulos T)

El sarcolema se invagina en el interior celular (sarcoplasma) lo que posibilita un estrecho contacto entre el espacio extracelular y las miofibrillas, formando una red de paredes gruesas que recibe el nombre de túbulos T. Estas invaginaciones corren perpendiculares a la longitud de la fibra muscular aunque poseen además muchos componentes longitudinales y oblicuos (Sommer y Waugh, 1976; Soeller y Cannell, 1999). Sirven de vía para la transmisión del impulso nervioso hacia las miofibrillas, es decir, permiten que la onda de despolarización pase con rapidez al interior de la fibra muscular, de manera que se puedan activar las miofibrillas que se encuentran localizadas profundamente. Además, los túbulos T representan el camino para el transporte de elementos extracelulares (glucosa, oxígeno, iones, entre otros). Cualquiera de las ramificaciones de los

túbulos T se situará en medio del extremo terminal de dos sarcómeros consecutivos, inmediatamente por encima de la línea "Z". Esta alineación: cisterna del RS/túbulo T/cisterna del RS se conoce como tríada. En el músculo cardíaco esta asociación entre las cisternas terminales del SR y los túbulos T, se da preferentemente como díadas, y aunque ocurre principalmente con la membrana de los túbulos T, también se produce en menor proporción con el sarcolema superficial. Dicha asociación resulta útil para el proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , y en último término para la producción de la contracción muscular. Efectivamente, en esta red de túbulos T, se encuentra una gran densidad de canales de Ca^{2+} (o receptores de dihidropiridinas, DHPR), encargados de ingresar Ca^{2+} durante la despolarización de la membrana plasmática de la célula cardíaca. Estos canales se encuentran próximos a los canales de rianodina del RS a nivel de las díadas (ver más adelante).

2.1.4. Retículo Sarcoplasmático

El RS es un extenso sistema de membranas intracelulares (discontinuo respecto de la membrana celular) constituido por cisternas y túbulos anastomosados entre sí que rodea a cada miofibrilla (ver Figura 4). Cada fragmento del RS se inicia y termina en una cisterna terminal o RS de unión (JSR, del inglés *junctional sarcoplasmic reticulum*), que junto con la estructura del túbulo T, conforman las tríadas o díadas mencionadas

en la sección anterior (Peachey, 1965; Franzini-Armstrong y Peachey, 1981). El JSR contiene los canales liberadores de Ca^{2+} del RS (RyR) que se proyectan a modo de pies hacia la superficie citoplasmática e interaccionan con los DHPR contenidos en los túbulos-T, tal como se mencionó anteriormente. Las regiones del RS que no se encuentran en la cercanía de los túbulos T se conocen como RS longitudinal, y están constituidos por membranas tubulares. Esta porción del RS contiene una alta densidad de bombas transportadoras de Ca^{2+} (SERCA, se verá con detalle más adelante).

La principal función del RS en el músculo es secuestrar Ca^{2+} como depósito, y liberarlo al sarcoplasma para la contracción del músculo. Esta organela es capaz de almacenar concentraciones de Ca^{2+} entre 50 y 250 μM , que superan ampliamente el Ca^{2+} necesario (en el orden de 1 μM) para un ciclo de contracción (Bers, 2001).

2.1.5. Mitocondrias

La función principal de estas organelas es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs, beta-oxidación de ácidos grasos) y la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, a través de una cadena transportadora de electrones con consumo de oxígeno. También es útil como depósito de sustancias como iones, agua, etc. Además, estas organelas pueden acumular cantidades masivas de Ca^{2+} , especialmente cuando hay suficiente fosfato inorgánico por ejemplo

durante la depleción de ATP que ocurre en situaciones patológicas tales como anoxia prolongada o IR. Esta acumulación de fosfato inorgánico en su interior permite formar un precipitado de fosfato de Ca^{2+} insoluble (Lehninger y col., 1967; Carafoli, 1987). Si bien la carga máxima de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas podría ser del orden de 10 mM, *in vivo* se observó que es del orden de los 100 μM . Esta organela cumple un rol menor en el movimiento de Ca^{2+} entre latidos. Sin embargo, ante pequeños incrementos en la concentración promedio de Ca^{2+} intracelular, el transporte de Ca^{2+} mitocondrial podría ser importante para aumentar el metabolismo de modo de cumplir con las demandas metabólicas. En sobrecargas más severas de Ca^{2+} , la mitocondria puede proveer un reservorio temporal de Ca^{2+} que protege al citoplasma de niveles elevados de este ion. Sin embargo, el ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria es un proceso electrogénico que provoca la despolarización de la membrana mitocondrial (Duchen, 2000). Así, si la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial es aún mayor, se producen cambios tales como la formación y apertura de poros inespecíficos que disparan la muerte por apoptosis (ver página 31).

2.2. Canales de Ca^{2+} tipo L - DHPR

Son canales que permiten el pasaje de Ca^{2+} desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Si bien en los miocitos

se encuentran dos tipos de canales de Ca^{2+} (tipo L y tipo T), la corriente de Ca^{2+} que generan los de tipo L (apertura de larga duración, gran conductancia y grandes despolarizaciones, del inglés *Long lasting opening*, *Large conductance*, y *Large depolarizations*) es la corriente de Ca^{2+} dominante en todos los miocitos. La corriente asociada a los canales de tipo T (pequeña conductancia y apertura transitoria, del inglés *Tiny conductance* y *Transient openings*) no se detecta en la mayoría de los miocitos, sólo está presente en células de la aurícula y en células de conducción eléctrica. Los canales de tipo L, a diferencia de los T, son característicamente sensibles a 1,4 dihidropiridinas (DHP), que bloquean al canal (antagonistas cálcicos como nifedipina, nisoldipina), o promueven su apertura [agonistas cálcicos como BayK8644(-)], por lo cual también se los conoce como receptores de DHP (DHPR). Ambos tipos de

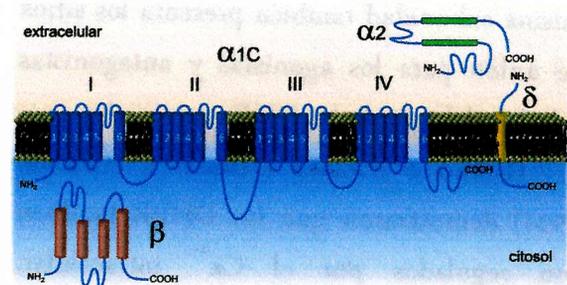


Figura 5. Diagrama esquemático de la estructura del canal de Ca^{2+} tipo L. La subunidad principal α_{1C} tiene 4 dominios: cada uno con 6 segmentos transmembranales y un bucle entre los dominios 5 y 6 que integra el poro del canal. Las subunidades α_2 , δ y β regulan las propiedades del canal.

canales son sensibles al voltaje u operados por voltaje, es decir se abren con la despolarización del sarcolema.

Los DHPR son complejos polipeptídicos (Figura 5) que comprenden las subunidades transmembrana α_1 , δ y, en algunos tejidos, γ ; una subunidad citosólica β , y una extracelular α_2 , codificadas por genes diferentes. La subunidad α_1 (α_{1c} cardíaca) conforma la estructura por la cual ingresa el Ca^{2+} . Esta subunidad es un poro ion-selectivo, formado por cuatro repeticiones de un dominio con seis segmentos transmembrana y es el sensor de voltaje, mientras que α_2/δ y β son subunidades accesorias encargadas de regular las propiedades biofísicas del canal. La subunidad α_1 tendría sitios fosforilables específicos para la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la CaMKII y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y de fosfolípidos (PKC), que regulan su actividad (Bodi y col., 2005; Yang y col., 2005). Esta misma subunidad también presenta los sitios de unión para los agonistas y antagonistas cálcicos del tipo de las DHP.

Hirano e Hiraoka (Hirano y Hiraoka, 1994) demostraron que los DHPR también son regulados por el Ca^{2+} intracelular. Cuando los incrementos en el Ca^{2+} intracelular son modestos, la actividad del canal se ve aumentada, proceso denominado *facilitación*, mientras que incrementos mayores en la concentración de Ca^{2+}

intracelular provocan la *inactivación* del canal.

Inicialmente la facilitación de la corriente de Ca^{2+} en el músculo cardíaco fue vinculada directamente al aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Marbán y Tsien, 1982; Fedida y col., 1988), pero más tarde en el músculo liso se la relacionó a la activación de la CaMKII (McCarron y col., 1992). Finalmente, trabajos de tres laboratorios diferentes encontraron que el tratamiento de cardiomiocitos con diferentes inhibidores de CaMKII prevenía la facilitación de la corriente de Ca^{2+} (Anderson y col., 1994; Xiao y col., 1994; Yuan y Bers, 1994), confirmando así el rol de CaMKII en esta modulación en músculo cardíaco.

La inactivación de los DHPR ocurre por un mecanismo dependiente del potencial de membrana y por uno dependiente de Ca^{2+} y CaM (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y col., 1985; Hadley y Hume, 1987). En condiciones fisiológicas, el decaimiento de la corriente de Ca^{2+} se describe con dos exponenciales, una inicial de inactivación rápida e ion-dependiente, y una segunda lenta y dependiente de voltaje (Adams y Tanabe, 1997; Ferreira y col., 1997; Sun y col., 1997). La inhibición dependiente de Ca^{2+} tiene un rol importante en el control de la entrada de Ca^{2+} y la traducción de señales corriente abajo, así como para asegurar la coordinación de los ciclos de contracción-relajación en el músculo cardíaco. Provee un control de retroalimentación negativa para evitar una

mayor entrada de Ca^{2+} . La CaM sería la proteína que actuaría como sensor de Ca^{2+} mediando el proceso de inactivación (Peterson y col., 1999; Zuhlke y col., 1999).

2.3. Receptor de Rianodina - RyR

El aislamiento e identificación molecular del canal liberador de Ca^{2+} del RS avanzó significativamente con el descubrimiento de que el alcaloide vegetal rianodina era un ligando específico y selectivo para este canal (de ahí su nombre, *Ryanodine Receptor*, RyR). A concentraciones bajas (1 a 1000 nM), la rianodina provoca una rápida liberación de Ca^{2+} del RS, mientras que a concentraciones muy elevadas ($>100 \mu M$) enlentece el eflujo de Ca^{2+} (Fabiato, 1985; Meissner, 1986). El RyR es un homotetrámero (2.260 kDa) con subunidades de aproximadamente 560 kDa (Nakai y col., 1990; Zorzato y col., 1990). Se identificaron tres genes mamíferos que codifican para el receptor de rianodina de músculo esquelético RyR1 (Takeshima y col., 1989), el receptor de rianodina cardíaco RyR2 (Nakai y col., 1990) y un RyR3, que inicialmente se describió en cerebro (Murayama y Ogawa, 1996), aunque luego se encontró que no es exclusivo de ese tejido (Dabertrand y col., 2006). RyR1 y RyR2 comparten un 66% de homología, mientras que RyR3 es aproximadamente un 70% idéntico a RyR1 y RyR2. Las tres isoformas se expresan en una gran variedad de tejidos, ya sea en forma

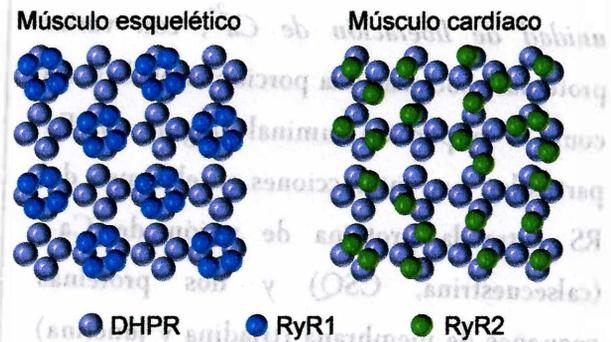


Figura 6. Diagrama de la relación entre los canales DHPR y RyR en músculo esquelético y cardíaco. Los círculos vacíos representan los RyR y los círculos llenos los DHPR. En músculo esquelético, los DHPR ocupan una posición específica relativa a cuatro subunidades de RyR. En músculo cardíaco están próximos pero sin un anclaje particular.

única o en diferentes combinaciones (Giannini y col., 1992; Furuichi y col., 1994; Hakamata y col., 1994; Giannini y col., 1995; Neylon y col., 1995). Por técnicas de criofractura se observó que en el músculo esquelético hay moléculas de RyR posicionadas en la membrana del RS cercana al túbulo T en forma de tetrámeros que se alinean de manera estricta con cuatro moléculas de DHPR en la membrana del túbulo-T opuesta (Block y col., 1988). En el músculo cardíaco no se cumple este estricto alineamiento entre DHPR y RyR (Figura 6). De hecho, la relación DHPR/RyR en el corazón es considerablemente más baja que la del músculo esquelético (0,1-0,25 versus 2, respectivamente) (Wibo y col., 1991; Bers y Stiffel, 1993).

Actualmente se sabe que este canal liberador de Ca^{2+} del RS es el eje de un gran complejo macromolecular, también llamado

unidad de liberación de Ca^{2+} , con varias proteínas asociadas a la porción citosólica, así como a la porción luminal (Figura 7). En particular, hay interacciones en el lumen del RS entre la proteína de unión de Ca^{2+} (calsequestrina, CSQ) y dos proteínas pequeñas de membrana (triadina y junctina) que se unen a CSQ y a RyR en un complejo cuaternario de CSQ-triadina-junctina-RyR. En la porción citosólica se han descrito muchas interacciones proteína-proteína asociadas a RyR. Entre las más importantes

se incluyen las proteínas de unión de FK506 (FKBP, del inglés *FK506 Binding Protein*, FKBP12 en músculo esquelético y FKBP12.6 en músculo cardíaco). Esta pequeña proteína es vital para la apertura coordinada de los canales RyR (Marx y col., 2001). También se pueden mencionar quinasas como la PKA, que se encuentra asociada al complejo a través de una proteína de anclaje denominada mAKAP (del inglés *A-kinase anchoring protein*), así como la CaMKII. Otras proteínas asociadas son las fosfatasa

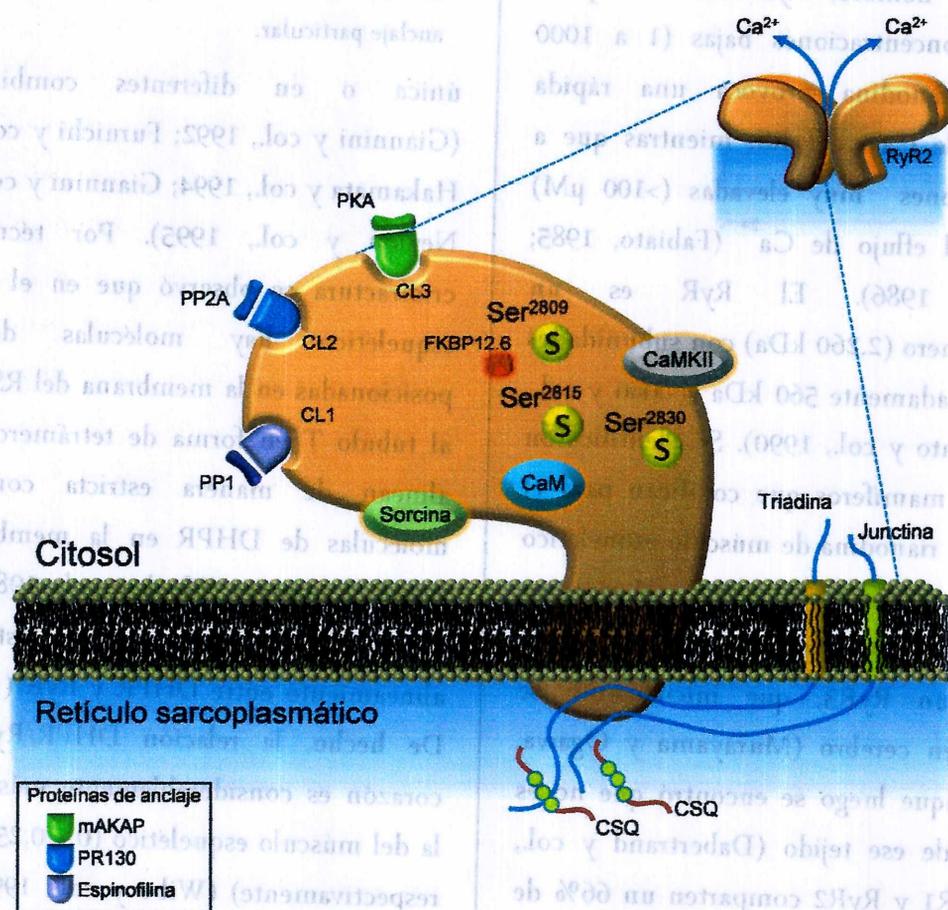


Figura 7. Diagrama esquemático del complejo macromolecular receptor de rianodina cardíaco (RyR2) y proteínas asociadas. El RyR2 es un complejo macromolecular que incluye cuatro subunidades de RyR2 idénticas, cada una es capaz de unir una FKBP12.6, así como también fosfatasas y quinasas (PP1, PP2A, CaMKII, PKA). Además, se encuentran formando parte del complejo proteínas tales como CSQ, CaM, sorcina, triadina, junctina, etc.

PP1 y PP2a, sorcina y proteínas de anclaje.

Los efectores más importantes en la regulación de la actividad de este canal son los iones Ca^{2+} . También se encuentra regulado por CaM y por modificaciones covalentes tales como fosforilación, oxidaciones de grupos tiol y nitrosilaciones (Aracena y col., 2003; Aracena-Parks y col., 2006; Ferrero y col., 2007).

Experimentos con RyR aislados en bicapas lipídicas mostraron que cuando los niveles de Ca^{2+} (cara citosólica) tienen valores cercanos a 100 nM (diástole), la probabilidad de apertura del canal RyR es cercana a cero. A concentraciones del orden micromolar, el canal es capaz de liberar una fracción del Ca^{2+} del RS hacia el citosol, volviéndose a inactivar cuando los niveles de Ca^{2+} alcanzan el orden milimolar. En experimentos del mismo tipo, se encontró que estos canales son regulados no sólo por el Ca^{2+} citosólico, sino también por el Ca^{2+} del interior del RS (Sitsapesan y Williams, 1997; Gyorke y Gyorke, 1998), potenciando la actividad del RyR2 y revirtiendo la inhibición que ocurre por concentraciones elevadas de Ca^{2+} citosólico. La regulación por fosforilación estaría dada por PKA que fosforila los residuos Ser^{2809} y Ser^{2030} , y por CaMKII que fosforila los sitios Ser^{2815} y Ser^{2809} , así como otros sitios potenciales (Rodríguez y col., 2003; Ferrero y col., 2007). La identificación de los efectos que produce la fosforilación de estos sitios sobre la actividad de RyR2 requieren de estudios

adicionales, dado que los resultados son aún controvertidos (Wehrens y col., 2004; Xiao y col., 2005; Chen-Izu y col., 2007; Ferrero y col., 2007; Xiao y col., 2007).

Algunos autores han demostrado que otra regulación de la actividad de los canales RyR2 estaría dada por el estado redox de grupos tioles (Meissner, 2004). El canal RyR2 tetramérico posee 89 residuos de cisteína por cada subunidad de 560 kDa y 2 por subunidad de FKBP12.6, o sea un total de 364 cisteínas. Los RyR2 aislados poseen un gran número de cisteínas libres (aproximadamente 84, es decir 21 por subunidad). Estos grupos tioles en el tejido cardíaco se mantienen en su gran mayoría en un estado reducido gracias al ambiente reductor mantenido por compuestos como glutatión y NADH.

Como se mencionó anteriormente, otro regulador de la actividad de estos canales es CaM. Esta proteína inhibe las tres isoformas de RyR cuando los niveles de Ca^{2+} libre son mayores a 1 μM . Sin embargo, a bajas concentraciones de Ca^{2+} (menores a 1 μM), CaM tiene efectos estimulatorios sobre RyR1 y RyR3, mientras que RyR2 no se vería afectado (Fruen y col., 2000) o se inhibiría (Balshaw y col., 2001).

2.4. Calsecustrina - CSQ

Esta proteína es la principal proteína de unión de Ca^{2+} en el RS de fibras musculares esqueléticas y cardíacas. Está constituida por monómeros de aproximadamente 40 kDa y a

concentraciones de Ca^{2+} de 1 mM, CSQ se condensa como un polímero lineal (Wang y col., 1998). Se localiza en la membrana luminal de la cisterna terminal del RS, cercana a la membrana superficial o hacia los túbulos-T. La CSQ no es una proteína embebida en la membrana sino que se encuentra anclada a ella por unión a otras proteínas, entre las que se incluyen triadina, junctina y RyR. En la década pasada se describió que además de actuar como un amortiguador de alta capacidad y baja afinidad por Ca^{2+} , CSQ es capaz de regular la actividad del canal RyR. Se cree que esta regulación consiste en modular la velocidad de liberación de Ca^{2+} desde el RS en relación a la carga del reservorio de Ca^{2+} . De esta

manera se optimizaría la liberación de Ca^{2+} (Gyorke y col., 2004; Beard y col., 2005; Wei y col., 2006). Un mol de CSQ es capaz de unir entre 35 y 40 moles de Ca^{2+} (MacLennan y Wong, 1971; Ikemoto y col., 1972; Cozens y Reithmeier, 1984). Ésto permite que se almacene no sólo el Ca^{2+} necesario para la contracción, sino hasta concentraciones que alcanzan 20 mM, mientras que la concentración de Ca^{2+} libre se mantiene próxima a 1 mM.

2.5. Bomba de Ca^{2+} del RS - SERCA

La SERCA (bomba de calcio sarcoplasmática, del inglés *Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase*) es un miembro de la familia de

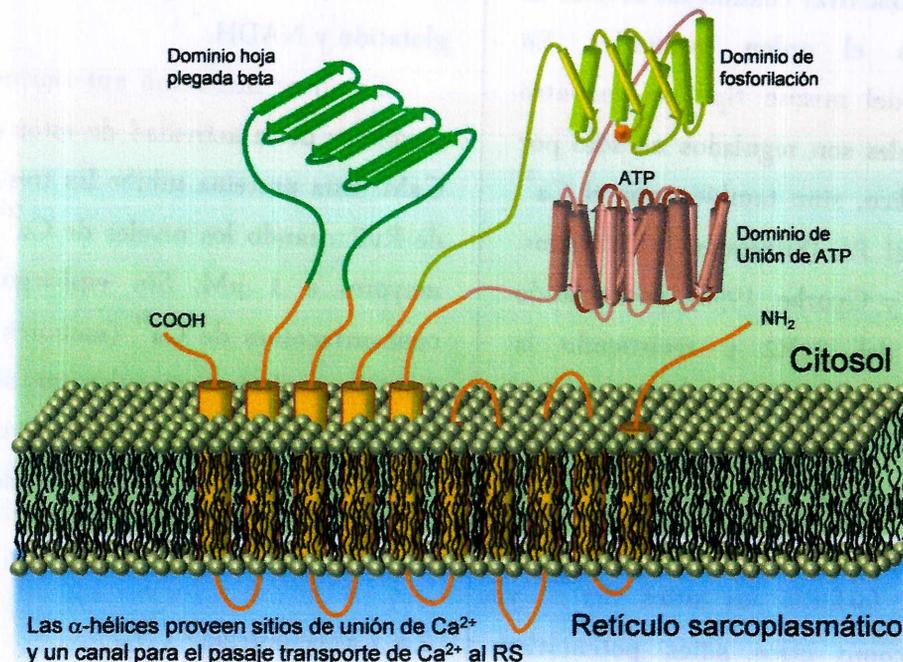


Figura 8. Diagrama de la estructura de la SERCA2a. Las 10 hélices transmembrana dan el anclaje de la molécula a la membrana del RS, y éstas se encuentran unidas por el dominio de tallo a la porción citosólica compuesta por una hoja plegada β , y los dominios de fosforilación y de unión de nucleótido (estos dos últimos forman el sitio catalítico para la hidrólisis de ATP). Los segmentos N- y C-terminal de la SERCA2a se encuentran en la cara citosólica. El dominio transmembrana que posee los sitios de unión de Ca^{2+} , forma el canal para el transporte del ion hacia el RS.

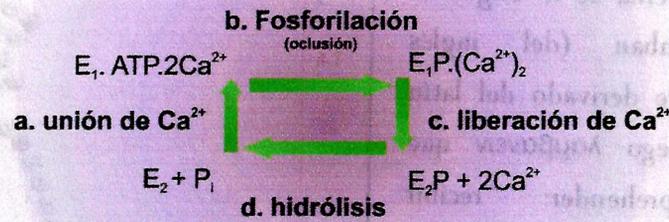


Figura 9. Ciclo catalítico de la SERCA2a. El proceso se inicia con la unión de 2 iones Ca^{2+} y una molécula de ATP a la SERCA2a (a). El fosfato (P) terminal del ATP se transfiere al residuo Asp^{351} generando un cambio estructural del estado conformacional E_1 de la SERCA2a, que provoca la oclusión citoplasmática de los iones Ca^{2+} en la bomba (b), $\text{E}_1\text{P}(\text{Ca}^{2+})_2$. Luego el cambio conformacional al estado E_2P , implica una menor afinidad de la SERCA2a por el Ca^{2+} , liberándolo al lumen del RS (c). Para cerrar el ciclo, se transportan protones desde el lumen hacia el citosol con la consecuente desfosforilación de la bomba, retornando del estado E_2P al E_2 .

enzimas ATPasas tipo P, transportadoras de iones (P, del inglés *Phosphorylated*, porque forman un intermediario fosforilado durante el ciclo de transporte). Esta familia está constituida por el producto de tres genes homólogos (SERCA1, 2 y 3). El gen SERCA1 da origen a dos isoformas que derivan del *splicing* alternativo del producto primario del gen. SERCA1a es la isoforma que predomina en músculo esquelético de contracción rápida en adultos, mientras que la isoforma 1b se encuentra presente durante los estadios fetal y neonatal. El gen de SERCA2 también produce dos isoformas que son tejido específicas. SERCA2a se expresa en el músculo esquelético de contracción lenta y en músculo cardíaco, mientras que SERCA2b lo hace principalmente en células no musculares y en músculo liso. SERCA3 se expresa en músculo esquelético, corazón, útero y en una gran variedad de células no musculares (Martonosi y Pikula, 2003).

La estructura de la SERCA2a consta de tres regiones principales, designadas como la

cabeza citoplasmática, el tallo y el dominio transmembrana (Figura 8).

La SERCA2a cumple un rol fundamental en el ciclo de contracción-relajación del músculo cardíaco ya que esta bomba es la encargada de transportar iones Ca^{2+} desde el espacio citosólico hacia el interior del RS, oponiéndose al gradiente químico entre citosol y RS. Para cumplir esta función, es necesario que se hidrolice una molécula de ATP a fin de proveer la energía necesaria para transportar 2 iones Ca^{2+} , formando el intermediario fosforilado de la enzima en un ciclo reversible (Figura 9).

2.6. Fosfolamban - PLN

Identificada por primera vez en microsomas cardíacos, fosfolamban (PLN) es una proteína multimérica de 25 kDa, un pentámero compuesto por monómeros indistinguibles por separación electroforética. Michihiko Tada fue quién describió que esta pequeña proteína en preparaciones de RS, era capaz de ser fosforilada por PKA (Tada y

col., 1974). A esta proteína se le asignó el nombre de fosfolamban (del inglés *phospholamban*, nombre derivado del latín *phosphorus* y del griego λαμβανειν que significa recibir, aprehender: “recibir fosfato”). Posteriormente se describió que cada uno de los monómeros, con un peso molecular aparente de 6,1 kDa, contiene tres sitios posibles de ser fosforilados, Ser¹⁰, Ser¹⁶ y Thr¹⁷. El residuo Ser¹⁰ puede ser fosforilado por PKC, el sitio Ser¹⁶ es sustrato de PKA y de la proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (PKG), mientras que Thr¹⁷ es fosforilado por CaMKII. De estos tres sitios fosforilables, los que poseen importancia funcional son Ser¹⁶ y Thr¹⁷ (Suzuki y Wang, 1986; Tada y Toyofuku, 1998; Frank y Kranias, 2000).

PLN es una proteína de tan sólo 52 aminoácidos que actúa como inhibidor endógeno de la SERCA2a. Principalmente se expresa en músculo cardíaco, y en menor medida en músculo esquelético lento, en músculo liso y en células endoteliales. Estructuralmente se la divide en 3 dominios, el dominio amino-terminal IA (citósólico, aminoácidos 1-20), dominio IB (citósólico, aminoácidos 21-31) y el dominio carboxi-terminal II (transmembrana, aminoácidos 32-52) (Figura 10). El dominio IA posee estructura de α -hélice y es el que contiene los residuos fosforilables Ser¹⁰, Ser¹⁶ y Thr¹⁷. El dominio II posee estructura de cierre leucina-isoleucina, importante para la estabilización intermonómero (Simmerman y col., 1996).

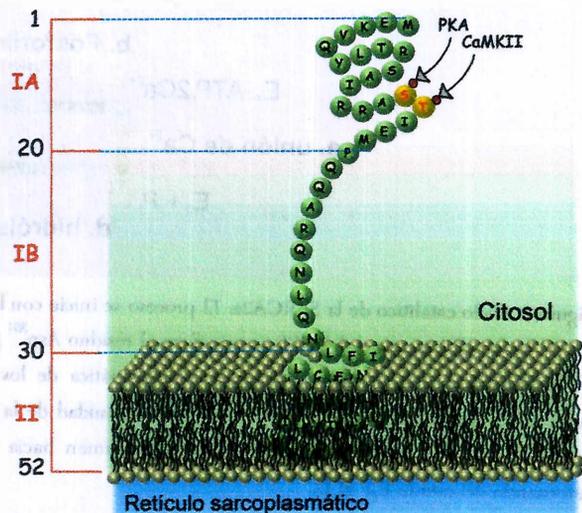


Figura 10. Estructura de fosfolamban. Representación de un monómero de PLN insertado en la membrana del RS. Los dominios IA y IB son de localización citosólica, mientras que el dominio II es transmembrana. En el dominio IA se indican los residuos fosforilables Ser¹⁶ (por PKA) y Thr¹⁷ (por CaMKII).

La interacción entre PLN y SERCA2a regula la actividad de la bomba de Ca²⁺ del RS. La inhibición es de tipo reversible, e involucra dos equilibrios, uno entre PLN monomérica/pentamérica, y el otro entre PLN asociada/disociada a SERCA2a (Figura 11). PLN se asocia a SERCA2a en tres sitios, uno en cada dominio de PLN. Con estas interacciones, PLN limita los cambios conformacionales de la SERCA2a. Esto se traduce en una disminución de la afinidad de la SERCA2a por el Ca²⁺, así como en un enlentecimiento del ciclo de hidrólisis de ATP de la bomba y del transporte de Ca²⁺. La fosforilación en uno o los dos sitios de PLN funcionalmente importantes (Ser¹⁶ y Thr¹⁷), así como el aumento de la concentración de Ca²⁺, revierten la inhibición

que ejerce PLN sobre la SERCA2a (Asahi y col., 2000).

2.7. ATPasa del sarcolema

La bomba Ca^{2+} -ATPasa del sarcolema dependiente de CaM (PMCA, del inglés *Plasma Membrane Calmodulin ATPase*) también es una ATPasa del tipo P (como la bomba Na^+/K^+ ATPasa, y la SERCA). Al igual que la SERCA, ya descrita, es capaz de transferir la energía del ATP a un intermediario fosforilado de alta energía, que la utiliza para transportar un ion Ca^{2+} , en contra de su gradiente de concentración, por cada molécula de ATP hidrolizada. Existen cuatro isogénes humanos (PMCA1-4) para esta proteína de 138 kDa, y también numerosas variantes de *splicing* (Carafoli y

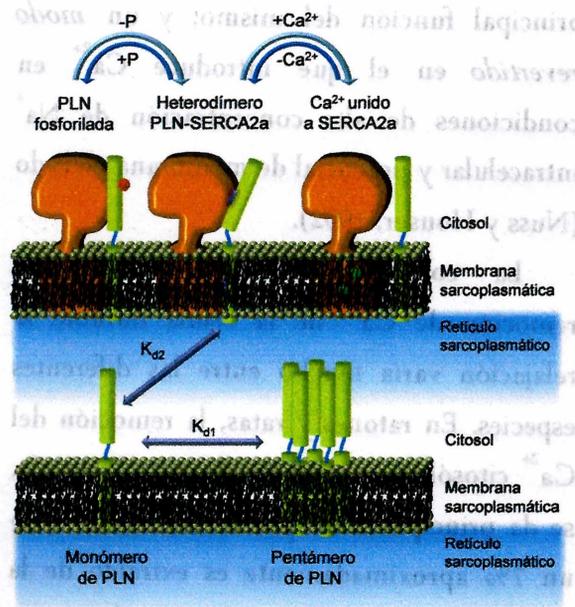


Figura 11. Modelo de interacción de PLN-SERCA2a. PLN se encuentra en un equilibrio entre monómero-SERCA2a, monómero y pentámero. Tanto la fosforilación de PLN, así como el aumento de Ca^{2+} , disminuyen la inhibición de PLN sobre la SERCA2a.

Stauffer, 1994). El sitio de unión de CaM, así como otros sitios regulatorios, se encuentra en la cola citoplásmica a continuación del último dominio transmembrana (Piihola y col., 2001; Guerini y col., 2002). Experimentos realizados en miocitos aislados de conejo demuestran que la participación de PMCA en la extrusión de Ca^{2+} fuera de la célula durante la relajación cardíaca, es inferior al 1% (Bassani y col., 1994). En otros tipos celulares (como por ejemplo neuronas), PMCA es el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} (Wanaverbecq y col., 2003).

2.8. Intercambiador Sodio/Calcio - NCX

La familia de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, del inglés *Na⁺/Ca²⁺ exchanger*) incluye transportadores de membrana distribuidos en varios tejidos y células, y constituyen uno de los principales mecanismos de extrusión de Ca^{2+} de la célula. La estructura del NCX (938 aminoácidos) consta de nueve segmentos

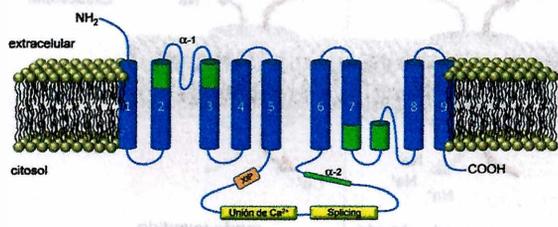


Figura 12. Modelo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El modelo actual del NCX tiene 9 dominios transmembrana. El bucle intracelular largo no está graficado a escala, pero incluye 550 aminoácidos. En éste se ubican la región XIP endógena, el sitio de unión para la regulación por Ca^{2+} , y la región en donde ocurre el *splicing* alternativo. (Philipson y Nicoll, 2000).

transmembrana, con el extremo amino terminal glicosilado (péptido señal) orientado hacia la región extracelular. Posee un segmento como un gran bucle intracelular (aprox. 550 aminoácidos) que conecta los dominios transmembrana 5 y 6, y un segmento de naturaleza hidrofóbica que conecta los dominios 7 y 8 (Figura 12). El bucle intracelular contiene la región XIP (péptido inhibidor de intercambio), la región de regulación de la actividad del intercambiador por Ca^{2+} (regulación alostérica) y una región en donde se produce el *splicing* alternativo que genera hasta 12 variantes que difieren en la regulación por Ca^{2+} , la inactivación por Na^+ y la modulación por ATP. Próximos a los extremos amino y carboxilo terminal se describen dos secuencias repetidas de 40 aminoácidos llamadas repeticiones α -1 y α -2, conservadas en todos los NCX de la familia, que

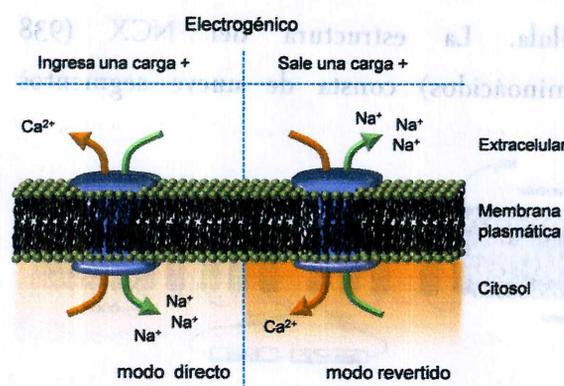


Figura 13. Esquema de los modos de funcionamiento del NCX. A la izquierda se representa el modo directo de funcionamiento del intercambiador, y a la derecha el modo revertido en el cual extruye iones Na^+ a la vez que ingresa Ca^{2+} . El intercambio es de tres iones Na^+ por cada Ca^{2+} movilizado.

cumplirían un importante rol en el transporte de iones (DiPolo y Beauge, 2006). Se han descrito tres subtipos, NCX1-3, codificados por diferentes genes. El primer subtipo clonado fue el NCX1 cardíaco canino (Nicoll y col., 1990; Aceto y col., 1992), y luego se hallaron el NCX2 y 3 en tejido cerebral.

El NCX tiene la particularidad de ser electrogénico (genera una diferencia de carga a través de la membrana), dado que contrarresta un ion Ca^{2+} por cada tres Na^+ . Para ello, utiliza el gradiente de Na^+ que genera la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Este intercambiador posee dos modos de funcionamiento (Figura 13), un *modo directo* en el que extruye Ca^{2+} de la célula durante la relajación miocárdica lo cual constituye la principal función del mismo; y un *modo revertido* en el que introduce Ca^{2+} en condiciones de alta concentración de Na^+ intracelular y potencial de membrana elevado (Nuss y Houser, 1992).

La contribución del NCX en la remoción de Ca^{2+} de la célula durante la relajación varía mucho entre las diferentes especies. En ratones y ratas, la remoción del Ca^{2+} citosólico aumentado durante la sístole, se da principalmente por la SERCA2a. Sólo un 7% aproximadamente es extraído de la célula por el NCX. En cambio, en humanos o conejos, la contribución del NCX a la remoción de Ca^{2+} es mayor, alcanzando un 30% (Bers y col., 1996; Satoh y col., 2000; Ranu y col., 2002). Tal como se mencionó

anteriormente, cuando el NCX funciona en su modo revertido, extrae Na^+ de la célula e introduce Ca^{2+} . Se ha demostrado que el Ca^{2+} que entra por el NCX funcionando en su modo revertido, puede contribuir a la liberación de Ca^{2+} desde el RS, y al incremento sistólico de la concentración de Ca^{2+} . En ciertas condiciones experimentales, tal como la reducción brusca de la concentración de Na^+ extracelular en cardiomiocitos aislados, la entrada de Ca^{2+} a través del NCX es capaz de provocar la contracción de las células (Chapman y Tunstall, 1980). Sin embargo, en condiciones fisiológicas la contribución del NCX a la entrada de Ca^{2+} durante el AEC es mínima (Bers y col., 1988). Es importante mencionar, sin embargo, que en condiciones patológicas en las que aumenta la concentración de Na^+ intracelular, este incremento no sólo puede enlentecer el modo directo del NCX, sino eventualmente invertir su funcionamiento y resultar importante como mecanismo de entrada de Ca^{2+} a la célula (ver página 34).

2.9. Bomba Sodio/Potasio ATPasa - Na^+/K^+ ATPasa

La bomba sodio-potasio ATPasa (Na^+/K^+ ATPasa) es crítica para mantener gradientes iónicos a través de la membrana plasmática, lo que permite que funcionen los canales iónicos. Este complejo enzimático extruye Na^+ de la célula y acumula K^+ con el uso de energía a partir de la hidrólisis de ATP (transporte activo). Como ya se mencionó, es

miembro de la familia de las bombas ATPasas tipo P. La relación de intercambio entre Na^+ y K^+ es 3 a 2, es decir que se genera el movimiento neto de una carga positiva hacia fuera con cada ciclo. Los principales reguladores de esta bomba son la concentración intracelular de Na^+ y extracelular de K^+ .

La Na^+/K^+ ATPasa está constituida por una subunidad α y una subunidad β . En el corazón de rata y humano se han descrito, de acuerdo a la isoforma de su subunidad α , tres isoformas de la Na^+/K^+ ATPasa [α_{1-3} , cada una de aproximadamente 110 kDa (Lucchesi y Sweadner, 1991; Wang y col., 1996). Estas subunidades α , de ocho segmentos transmembrana, son las que presentan la actividad transportadora de iones, sitio de unión de ATP y sitio fosforilable. En los miocitos de rata la isoforma α_1 se expresa preferencialmente en los túbulos T (colocalizada con los canales de Na^+ y el NCX), mientras que la α_2 se distribuye en la membrana de manera más homogénea. Las subunidades β (β_1 y β_2 , de aproximadamente 35 kDa), con una sola región helicoidal transmembrana, son las encargadas de asegurar el adecuado procesamiento e inserción de la bomba en la membrana, sin estar implicada directamente ni en el transporte de iones ni en la actividad ATPásica de la bomba. Sólo la isoforma β_1 se expresa de manera apreciable en el corazón de humanos (McDonough y col., 1990; Wang y col., 1996).

3. Aparato contráctil – miofibrillas

Cada célula muscular (fibra muscular) está constituida por varios cientos o miles de miofibrillas, y cada miofibrilla está constituida por miofilamentos (actina y miosina). La fibra posee unidades repetitivas ubicadas en serie llamadas sarcómeros, que representan la unidad morfofuncional del músculo. Un sarcómero es aquella parte de la miofibrilla que se extiende entre dos discos o líneas Z y su largo varía entre 1,5 a 3,6 micrones, dependiendo del grado de acortamiento o estiramiento muscular. Las estriaciones transversales, típicas del músculo

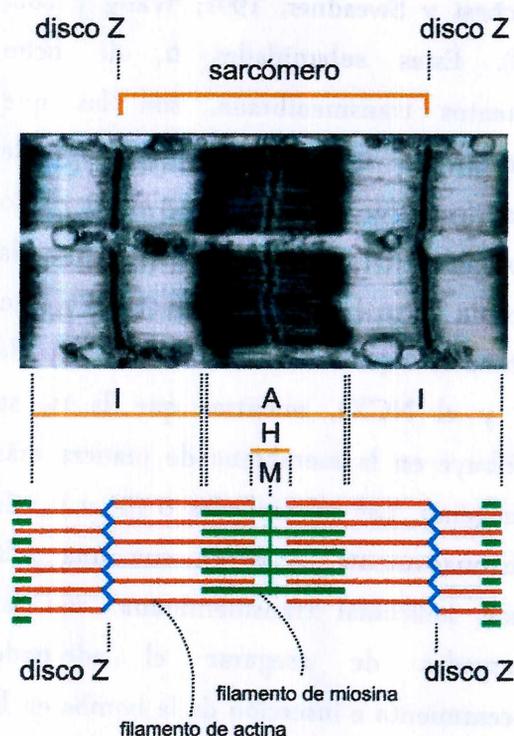


Figura 14. Esquema de una unidad sarcomérica. El sarcómero está comprendido entre dos líneas Z. Las bandas I están formadas por filamentos de actina. La superposición de filamentos de actina y miosina generan las bandas A, y la región integrada sólo por miosina es la banda H, con una línea M central que es la región de la miosina sin puentes.

esquelético, son productos de la sucesión de bandas transversales oscuras (A, de anisotrópicas) y claras (I, de isotrópicas) a lo largo de las miofibrillas, lo cual se debe a la disposición espacial de los miofilamentos (Figura 14). Los filamentos delgados de actina se fijan en las líneas Z y se proyectan en ambas direcciones. Los filamentos delgados están formados por dos cadenas de monómeros de actina (actina G, de globular) polymerizados como actina F (de fibrilar), enroscadas entre sí. Los miofilamentos gruesos se interdigitan con los extremos libres de los miofilamentos delgados y forman la banda A del sarcómero. En la mitad de esta banda se aprecia la zona H, constituida únicamente por filamentos gruesos. El filamento grueso está formado por miosina, una proteína que posee una cola α -helicoidal orientada hacia el centro del filamento y una cabeza globular con actividad de hidrólisis de ATP (ATPásica). La interacción entre esta porción del filamento grueso y la actina produce el desplazamiento

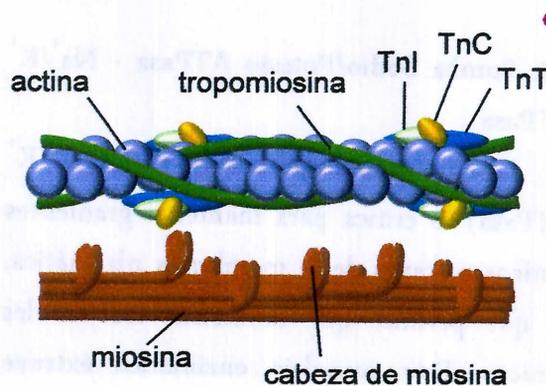


Figura 15. Diagrama esquemático de la disposición de los filamentos de actina y miosina, y sus proteínas

de la miosina sobre el filamento fino y en consecuencia el acortamiento del sarcómero.

Los filamentos finos de actina poseen proteínas reguladoras asociadas entre las que encuentran la tropomiosina (Tm) y troponina (Tn). Las moléculas de Tm son doble hélices extendidas sobre los surcos que dejan las dos hélices enroscadas de actina F. La Tn forma un complejo de tres subunidades, Tn T, C e I, espaciado de forma regular sobre el filamento delgado,

(Figura 15). TnT es la subunidad de unión a Tm. TnC es el sitio de unión de Ca^{2+} , y TnI es la subunidad inhibitoria que se une a la actina y regula la unión de actina a miosina. Otras proteínas asociadas a la maquinaria contráctil son titina, proteína C, miomesina, proteína M y α -actinina, cuya función, motivo de estudio en la actualidad, escapa a los límites de este trabajo de Tesis.

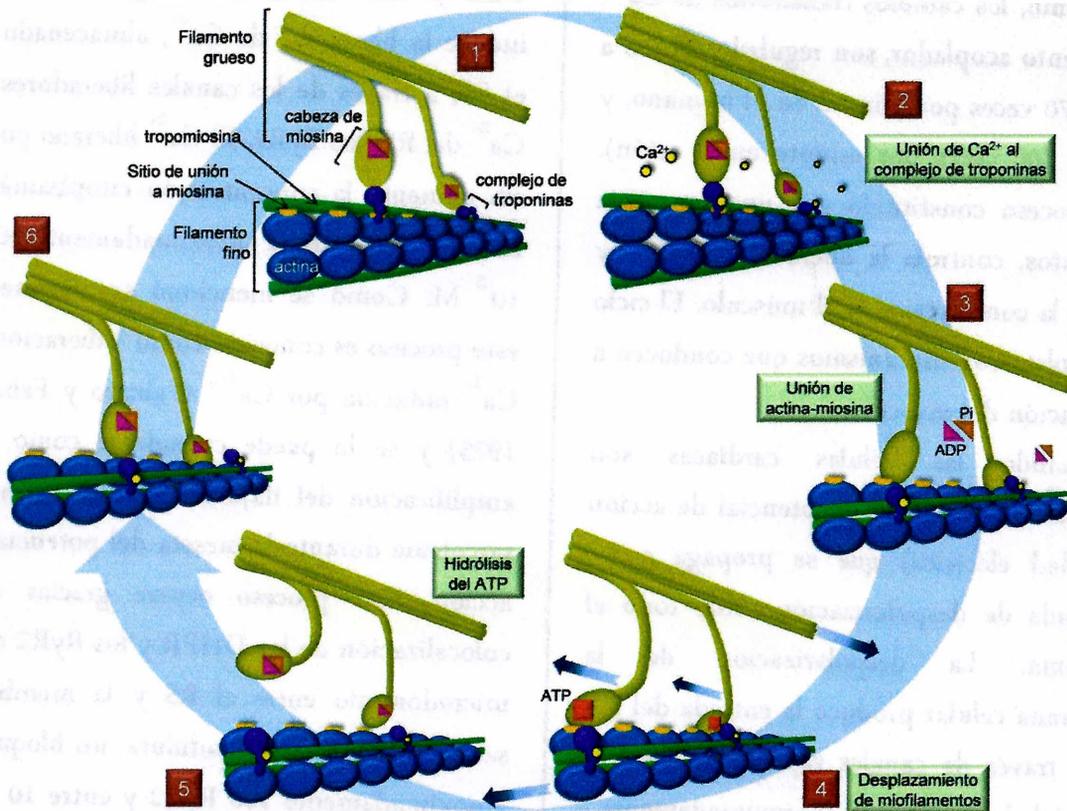


Figura 16. Modelo de deslizamiento de miofilamentos según la teoría de contracción muscular. En (1) se muestra el complejo intermediario miosina-ADP- P_i . Cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta (2), éste se une a la TnC reorientando el complejo de Tn-Tm dejando libre el sitio de actina de unión a miosina. Cuando la actina se une a la miosina, se libera el ADP y el P_i generando ahora un complejo de fuerte unión entre miosina y actina (3), que genera un desplazamiento relativo entre filamentos (4). La unión de una nueva molécula de ATP inhibe la interacción entre miosina y actina (5). La actividad ATPásica de la miosina desdobra el ATP en ADP y P_i , volviendo a formar el complejo miosina-ADP- P_i (6). Este ciclo continúa mientras exista suficiente ATP, y la concentración de Ca^{2+} no disminuya. Cuando el Ca^{2+} disminuye, se detiene la interacción entre miofilamentos.

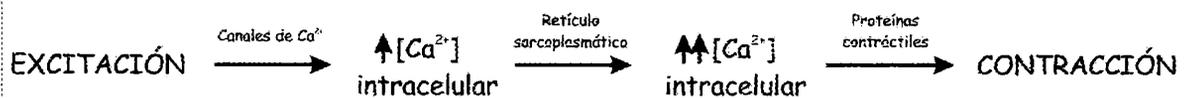
4. Ciclo del Acoplamiento Excitación-Contracción - AEC

Habiendo descrito los componentes celulares necesarios para entender el proceso de contracción muscular, a continuación se describirán los pasos involucrados en acoplamiento entre la excitación y la contracción del músculo cardíaco.

Como AEC se entiende al proceso por el cual la actividad eléctrica (potencial de acción) se conecta o “acopla” con la actividad mecánica (contracción muscular). En este mecanismo, los cambios transitorios de Ca^{2+} , el elemento acoplador, son regulados latido a latido (70 veces por minuto en el humano, y más de 400 veces por minuto en el ratón). Este proceso constituido por una secuencia de eventos, controla la liberación de Ca^{2+} y dispara la contracción en el músculo. El ciclo se completa con mecanismos que conducen a la relajación del músculo.

Cuando las células cardíacas son excitadas, se produce un potencial de acción (actividad eléctrica) que se propaga como una onda de despolarización sobre todo el sarcolema. La despolarización de la membrana celular produce la entrada del ión Na^+ a través de canales rápidos de Na^+ . El potencial de membrana (aproximadamente -80 mV en células musculares de aurículas y ventrículos en reposo) puede elevarse hasta

valores cercanos a +30-50 mV. A partir de -40 mV, se abren canales de Ca^{2+} tipo L localizados en el sarcolema, generando una corriente de Ca^{2+} . Esta corriente es la que contribuye a formar la meseta del potencial de acción o fase 2, que tiene una duración de varios milisegundos. Estudios realizados en corazón de mamífero indicaron que la cantidad de Ca^{2+} que ingresa a través de la corriente de tipo L no es suficiente para explicar la totalidad de la contracción del músculo cardíaco (Solaro y Briggs, 1974; Yuan y col., 1996). Este ingreso de Ca^{2+} induce la liberación de Ca^{2+} , almacenado en el RS, a través de los canales liberadores de Ca^{2+} del RS, los RyR2. El Ca^{2+} liberado por el RS aumenta la concentración citoplasmática casi 100 veces desde aproximadamente 10^{-7} a 10^{-5} M. Como se mencionó anteriormente, este proceso es conocido como “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (Fabiato y Fabiato, 1975) y se lo puede considerar como una amplificación del flujo de Ca^{2+} a través del sarcolema durante la meseta del potencial de acción. Este proceso ocurre gracias a la colocación de los DHPR y los RyR2 en el microdominio entre el RS y la membrana sarcolemal. En cada hendidura, un bloque de aproximadamente 100 RyR2 y entre 10 y 25 DHPR individuales constituyen una unidad funcional llamada *Couplon* (Franzini-



Armstrong y col., 1999).

El Ca^{2+} elevado en el citosol alcanza los miofilamentos y provoca su desplazamiento. En la Figura 16 se esquematiza un ciclo de deslizamiento de los miofilamentos. En el estado relajado (baja concentración de Ca^{2+} y alta concentración de ATP), la Tm se encuentra bloqueando físicamente la unión entre las moléculas de actina y miosina a la vez que el ATP unido a la cabeza globular de miosina impide su interacción con la actina. La actividad ATPásica de la miosina hidroliza el ATP unido, generando un complejo P_i -ADP-miosina, de baja afinidad por la actina. Cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta, éste se une a la TnC provocando un cambio conformacional en el complejo regulatorio Tn-Tm de modo que se exponen sitios de unión a la cabeza de miosina en la actina. Cuando se establece esta unión, se libera el P_i del complejo P_i -ADP-miosina, formando una unión muy fuerte entre el filamento delgado y el grueso. El resultado de estos cambios es el movimiento relativo (progreso) entre la cabeza de miosina y la actina, de manera que los filamentos de actina y miosina se desplazan uno sobre el otro y por lo tanto acortan la longitud del sarcómero. Los ciclos de avance ocurren siempre que la concentración de Ca^{2+} citosólico se mantenga elevada. Al final de la fase 2 del potencial de acción, el ingreso de Ca^{2+} hacia el interior celular disminuye y el Ca^{2+} es secuestrado hacia el RS por la bomba de Ca^{2+} SERCA2a, o extruido de la célula por

el NCX, disminuyendo de este modo la concentración de Ca^{2+} citosólica y removiendo el Ca^{2+} de las moléculas de TnC. La reducción del Ca^{2+} intracelular induce un cambio conformacional en el complejo de Tn-Tm que provoca, una vez más, la inhibición del sitio de unión de la actina a la miosina. Al final del ciclo de AEC una nueva molécula de ATP se une a la cabeza de miosina, desplazando al ADP, y se recupera la longitud inicial del sarcómero.

III. Rol de la CaMKII en el AEC

La CaMKII es capaz de fosforilar, y así regular la actividad de la mayoría de los componentes relacionados con el AEC cardíaco. Entre ellos, la CaMKII fosforila los DHPR, lo que resulta en una facilitación de la corriente de Ca^{2+} , que se manifiesta como un incremento en la amplitud de dicha corriente en latidos subsiguientes (Yuan y Bers, 1994; Wu y col., 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN por CaMKII libera a la SERCA2a de la influencia inhibitoria de PLN, y de este modo potencia la recaptura del Ca^{2+} citosólico por parte del RS (Mattiuzzi y col., 1994) y como consecuencia la velocidad de relajación. Es través de este mecanismo, que la CaMKII contribuye al efecto relajante de los agonistas beta adrenérgicos. Si bien se ha sugerido la participación de CaMKII en el efecto relajante del incremento de la frecuencia de estimulación a través de este mecanismo, los

resultados son todavía contradictorios (Bassani y col., 1995; Hagemann y col., 2000; DeSantiago y col., 2002; Valverde y col., 2005).

Algunos estudios muestran que la actividad de SERCA2 (a y b) puede ser modulada por fosforilación directa por CaMKII asociada al RS, fosforilando el residuo Ser³⁸ (Xu y col., 1993; Toyofuku y col., 1994). Se ha descrito que la fosforilación *in situ* de este aminoácido produce un incremento entre el 50 y 70 % de la velocidad máxima de la recaptura de Ca²⁺ (Xu y Narayanan, 1999). Sin embargo, otros trabajos no han podido ratificar estos hallazgos y cuestionan seriamente la fosforilación y consecuentemente el posible significado funcional de la misma (Odermatt y col., 1996; Reddy y col., 1996; Valverde y col., 2005).

Otra proteína blanco de la CaMKII es el RyR2. Se ha demostrado que CaMKII coprecipita con RyR2 (Zhang y col., 2003) lo que indica una colocalización o asociación física entre estas dos proteínas. Se han descrito hasta seis sitios consenso para la fosforilación de RyR2 por CaMKII. Inicialmente, Witcher sugirió que el único sitio fosforilable por esta quinasa era Ser²⁸⁰⁹ (Witcher y col., 1991), y que esta fosforilación regulaba la actividad del canal. Más tarde, Rodríguez y col. sugirieron que RyR2 podría ser fosforilado en cuatro sitios adicionales (Rodríguez y col., 2003), en tanto que Wehrens describió el sitio Ser²⁸¹⁵ como

único blanco para CaMKII (Wehrens y col., 2004). Trabajos de nuestro laboratorio indican que tanto Ser²⁸¹⁵ como Ser²⁸⁰⁹ se fosforilan por CaMKII (Ferrero y col., 2007). Si bien los sitios blanco de RyR2 de CaMKII se encuentran en la actualidad definidos, la implicancia funcional que posee esta fosforilación aún no es clara. Hay autores que describen que la fosforilación de RyR2 por CaMKII incrementa la actividad del canal (Wehrens y col., 2004; Ferrero y col., 2007), mientras que otros muestran una disminución (Lokuta y col., 1995; Wu y col., 2001).

IV. Rol de la CaMKII en la apoptosis

La morfogénesis por apoptosis es un proceso por el cual las células envejecidas, o que pueden resultar perjudiciales para un tejido u organismo, son eliminadas de una manera limpia y ordenada, de modo de no producir una respuesta inflamatoria. La apoptosis es un tipo de muerte celular que difiere de la necrosis, y que se caracteriza por una serie de eventos morfológicos típicos, tales como encogimiento celular, condensación de cromatina, degradación del ADN en fragmentos regulares, fragmentación celular con formación de cuerpos apoptóticos, con rápida fagocitosis sin inducción de inflamación.

La iniciación de la apoptosis ocurre principalmente por señales procedentes de dos vías diferentes pero convergentes (Figura 17). La vía extrínseca se inicia por la unión

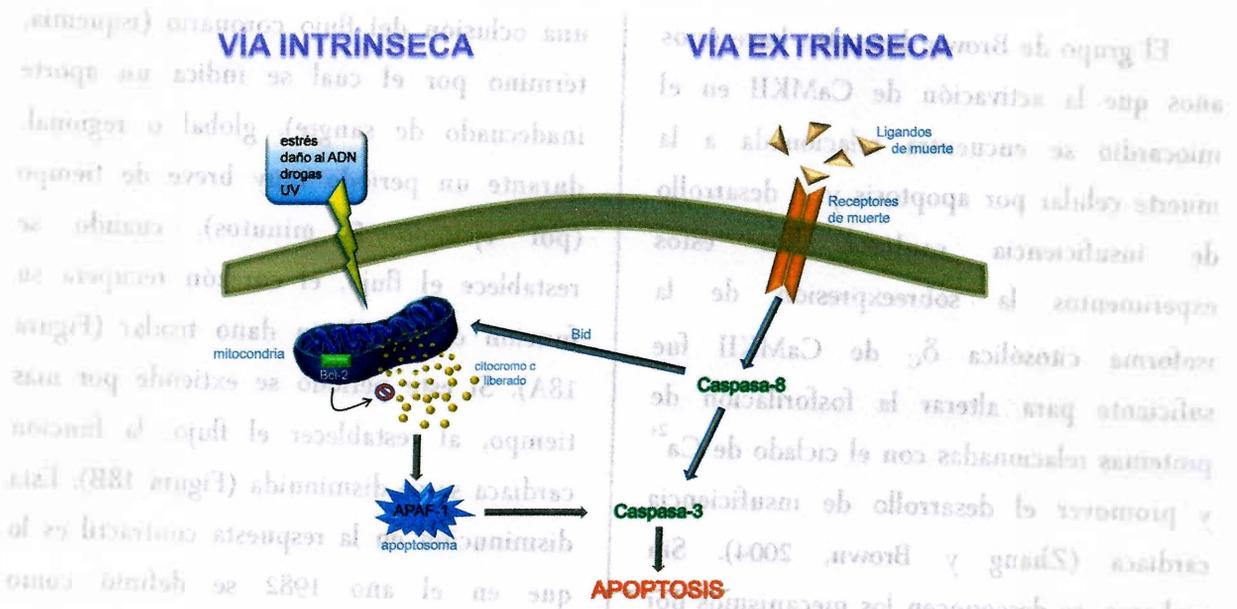


Figura 17. Vías de apoptosis. La vía intrínseca involucra una agresión o daño mitocondrial como factor principal para el desencadenamiento de la apoptosis. La vía extrínseca se inicia por unión de ligandos específicos a los receptores de muerte.

de ligandos a los llamados receptores de la muerte. A esta familia pertenecen miembros que unen el factor de necrosis tumoral (TNF-R1 y TNF-R2), y también Fas (Fas-R: CD95). La unión del ligando provoca la agregación de los receptores y el reclutamiento de otras proteínas, entre ellas las caspasas (subclase de cisteína proteasas) tales como caspasa-8 y caspasa-2. En este complejo multiprotéico, caspasa-8 se vuelve activa y desencadena la activación de las caspasas efectoras terminales (caspasa-3, 6 y 7), responsables del clivado de sustratos intracelulares necesarios para la estructura, función metabólica y supervivencia celular.

La segunda vía de apoptosis (intrínseca) es la mediada por las mitocondrias. Se inicia con la formación de poros inespecíficos en respuesta a un estímulo apoptótico (como por ejemplo radicales libres o IR) que provoca la liberación de citocromo c desde la

mitocondria. El citocromo c liberado, en presencia de desoxi-ATP o ATP, forma un complejo de activación con la caspasa-9 que activa otras caspasas corriente abajo para ejecutar las alteraciones morfológicas y bioquímicas finales (Li y col., 1997; Bossy-Wetzel y col., 1998). Esta vía se encuentra altamente regulada por un grupo de proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2 y Bcl-X_L, y proteínas pro-apoptóticas tales como Bax, Bid, Bik, Bak (Adams y Cory, 1998; Green y Reed, 1998). La relación o balance entre las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas (Bcl-2/Bax) es indicativa de la velocidad de desarrollo de la apoptosis en los miocitos.

La apoptosis de cardiomiocitos ha sido sugerida como factor contribuyente a la transición de la disfunción miocárdica por IR desde un estado reversible a uno irreversible (Buja y Entman, 1998).

El grupo de Brown demostró hace unos años que la activación de CaMKII en el miocardio se encuentra relacionada a la muerte celular por apoptosis y el desarrollo de insuficiencia cardíaca. En estos experimentos la sobreexpresión de la isoforma citosólica δ_C de CaMKII fue suficiente para alterar la fosforilación de proteínas relacionadas con el ciclado de Ca^{2+} y promover el desarrollo de insuficiencia cardíaca (Zhang y Brown, 2004). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales la CaMKII interviene en el proceso apoptótico.

V. Injuria reversible por isquemia y reperfusión

En el año 1975 el grupo de Vatner describió por primera vez la alteración cardíaca que ocurre durante la reperfusión luego de oclusiones coronarias relativamente cortas (Heyndrickx y col., 1975). Si se realiza

una oclusión del flujo coronario (isquemia, término por el cual se indica un aporte inadecuado de sangre), global o regional, durante un período muy breve de tiempo (por ejemplo 5 minutos), cuando se restablece el flujo, el corazón recupera su función contráctil sin daño tisular (Figura 18A). Si este período se extiende por más tiempo, al restablecer el flujo, la función cardíaca se ve disminuida (Figura 18B). Esta disminución en la respuesta contráctil es lo que en el año 1982 se definió como atontamiento cardíaco (AM, del inglés *cardiac stunning*) (Braunwald y Kloner, 1982). Si la isquemia se prolonga aún más (por ejemplo más de 20 minutos en la rata), la reperfusión luego del insulto isquémico genera consecuencias irreversibles y se produce el infarto de miocardio (Figura 18C). La transición del daño reversible al irreversible depende de la intensidad, extensión y duración de la isquemia variando de acuerdo a la especie, así como de la



Figura 18. Representación de los protocolos de isquemia y reperfusión. En rojo se representa el período isquémico. Si éste es lo suficientemente breve, el corazón no sufre alteraciones bioquímicas ni estructurales. Si el período de isquemia se prolonga, aparece un daño reversible (atontamiento miocárdico). Si la isquemia es muy prolongada, sobreviene un daño irreparable del tejido.

condición del miocardio al inicio del episodio isquémico y de la temperatura durante la isquemia (Triana y col., 1991; Bolli, 1995)

La disfunción cardíaca en el miocardio atontado se manifiesta mecánicamente como una menor contractilidad que se recupera en un período que va desde horas o días, hasta semanas. En el corazón infartado, la disfunción mecánica ocasionada por un insulto isquémico de mayor duración, resulta en una alteración permanente.

El corazón atontado recibió poca atención en un comienzo, interesando su estudio sólo a investigadores dado que parecía no tener relevancia clínica. Con el tiempo, comenzó a tomar más importancia al advertirse que esta condición se podía encontrar en ciertas circunstancias clínicas tales como la reperfusión espontánea luego de espasmos coronarios, paro cardiopléjico para la cirugía cardíaca, angina/isquemia post ejercicio/estrés, reperfusión coronaria por terapia trombolítica, angioplastia percutánea transluminal coronaria, "by-pass" de arterias coronarias, etc. (Nixon y col., 1982; Homans y col., 1986; Jeroudi y col., 1994)

El AM, tal como se lo definió anteriormente, no es una entidad única sino más bien un síndrome que se ha observado en muchos modelos experimentales, preparaciones unicelulares, multicelulares, órganos aislados y animales conscientes o anestesiados (Bolli y Marbán, 1999). A pesar de que este fenómeno fue descrito hace más

de treinta años, los mecanismos del mismo no han podido ser dilucidados por completo todavía. Muchos de los mecanismos propuestos, tales como una producción de energía insuficiente por las mitocondrias, utilización deficiente de energía por las miofibrillas, daño de la matriz de colágeno extracelular (Bolli, 1990), han sido descartados. Actualmente, la patogénesis del AM diverge en dos hipótesis (Bolli, 1990; Kloner y col., 1998). La *hipótesis de los radicales libres* postula que el AM es causado por especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^\cdot). Mientras que la *hipótesis del Ca^{2+}* (sobrecarga de Ca^{2+}) postula que esta condición es el resultado de una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} (Gao y col., 1997; Van Eyk y col., 1998). Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes, y pueden representar diferentes aspectos del mismo proceso fisiopatológico (Bolli y Marbán, 1999).

El rol de los ROS en el AM se estudió desde los años '80. Myers demostró que la administración de superóxido dismutasa (SOD) (que cataliza la reacción de dismutación del radical O_2^- a O_2 y H_2O_2) y catalasa (que transforma el H_2O_2 en O_2 y H_2O) a perros sometidos a oclusión de la arteria descendente anterior durante 15 minutos (injurias reversibles), mejora significativamente la recuperación de la

función cardíaca luego de la reperfusión (Myers y col., 1985). Más tarde, muchos otros estudios describieron resultados similares (Gross y col., 1986; Przyklenk y Kloner, 1986). Otros investigadores hallaron que compuestos atrapadores del radical OH^- (tales como dimetiltiourea y mercaptopropionil glicina), desferrioxamina (quelante de iones hierro que evitarían la formación de radical OH^- por las reacciones de Haber-Weiss o Fenton), y antioxidantes, tienen la capacidad de mejorar la recuperación postisquémica (Bolli y col., 1987; Bolli y col., 1989). Por diferentes metodologías se comprobó la generación de ROS inmediatamente después de la reperfusión (Bolli y col., 1988). También se ha demostrado la participación de los ROS en la injuria reversible e irreversible causada por isquemia global (Serrano y col., 1996). El mecanismo por el cual los ROS alterarían la función del miocardio atontado, sería por efecto directo sobre proteínas y lípidos, provocando desnaturalización de enzimas con pérdida de función y peroxidación de lípidos, alterando así la integridad de las membranas. Estas alteraciones también podrían conducir a una sobrecarga de Ca^{2+} por alteraciones del RS, mitocondrias, etc.

La hipótesis del Ca^{2+} plantea que el AM ocurre como consecuencia de una sobrecarga de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión, que provoca una disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles que lleva a la menor contractilidad del corazón atontado.

Estudios en roedores han demostrado que el transitorio de Ca^{2+} no se encuentra disminuido en el corazón luego de la IR (Gao y col., 1995; Meissner y Morgan, 1995), lo que indicaría una disminución en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, es decir que el miocardio genera menor aumento de fuerza para un dado incremento en la concentración de Ca^{2+} (Figura 19). Este mecanismo se sigue considerando, y en este trabajo se demuestra, como predominante en la disminución de la contractilidad en el AM, fundamentalmente en pequeños animales.

La disminución en la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos sería una consecuencia de una sobrecarga de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión. Se ha postulado que dicha sobrecarga ocurriría de la siguiente manera:

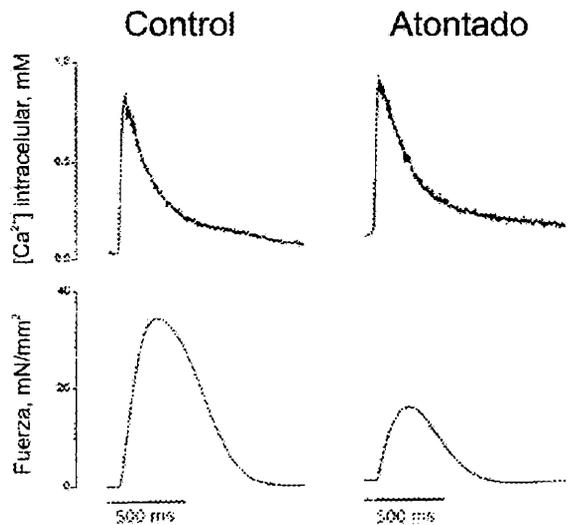


Figura 19. Transitorios de Ca^{2+} y de fuerza desarrollada en trabéculas control (izquierda) y de un corazón atontado (derecha). A pesar de que ambos poseen transitorios similares de Ca^{2+} , la fuerza desarrollada por la trabécula del corazón atontado es de menor amplitud que la control (Gao y col., 1995).

con la falta de aporte adecuado de oxígeno que ocurre durante la isquemia, las células se ven forzadas a realizar un metabolismo anaeróbico para continuar produciendo energía, esto resulta en una excesiva producción de iones H^+ que conduce a un progresivo descenso del pH intracelular (pH_i). Este descenso del pH_i activa al intercambiador sodio hidrógeno (NHE-1, isoforma cardíaca) de membrana, que extruye H^+ a la vez que ingresa iones Na^+ desde el espacio extracelular. Este intercambiador es el mecanismo más importante en la regulación del pH_i miocárdico en las acidosis más severas (Karmazyn, 1999; Leem y col., 1999; Vaughan-Jones y col., 2006). Además de la acidosis intracelular, se genera una acumulación de iones H^+ en el espacio extracelular. Esta acidosis podría inhibir parcialmente al NHE-1 y como consecuencia disminuir aún más el pH_i (Lazdunski y col., 1985; Park y col., 1999). Durante la reperfusión se libera la inhibición del NHE-1, el cual a expensas del ingreso de Na^+ al interior celular, es capaz de extruir los H^+ acumulados en el interior durante la isquemia. Otro proceso que ocurre durante la isquemia es la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa por disminución de los niveles de ATP, que impide que el Na^+ egrese de la célula (Anderson y col., 1990; Nawada y col., 1997; Van Emous y col., 1998). Tanto la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa durante la isquemia como la activación del

NHE-1 en la reperfusión, provocan un aumento de la concentración de Na^+ intracelular. Esta sobrecarga de Na^+ induce el enlentecimiento del modo directo del NCX o su funcionamiento en su modo revertido, ingresando Ca^{2+} a la célula y conduciendo a una sobrecarga de este ión (Grinwald y Brosnahan, 1987), la cual sería el disparador del AM de acuerdo a esta teoría (Xiao y Allen, 1999). Esta sobrecarga de Ca^{2+} podría conducir a la activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} . Estas proteasas (calpaínas) son enzimas capaces de clivar proteínas como por ejemplo calspectina, TnI, TnT, fodrina, anquirina, etc. En corazones atontados de ratones, cerdos y humanos, se ha podido asociar causalmente la degradación de la TnI con la aumentada actividad de calpaínas y la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles (Gao y col., 1996; Bolli y Marbán, 1999; McDonough y col., 1999; McDonough y col., 2001). Sin embargo, estos experimentos no pudieron ser reproducidos por otros autores (Thomas y col., 1999; Feng y col., 2001; Kim y col., 2001).

Un hecho llamativo del AM es que el transitorio de Ca^{2+} se encuentra conservado luego de la IR a pesar de que se ha descrito una disminución en la actividad de la SERCA2a y de los RyR2 (Krause y col., 1989; Limbruno y col., 1989; Zucchi y col., 1996; Valdivia y col., 1997). Esto sugeriría la existencia de mecanismos compensatorios, que permitirían conservar el ciclado del Ca^{2+}

en niveles normales a pesar de la menor actividad de algunas de las proteínas fundamentales en el manejo del mismo. Experimentos de nuestro laboratorio en corazones de rata, revelaron que la fosforilación del sitio Thr¹⁷ de PLN es de suma importancia para la recuperación parcial de la contractilidad durante el AM. Esta fosforilación sería por lo menos uno de los mecanismos que compensaría la inhibición de la SERCA2a. Se desconoce sin embargo, si esa fosforilación dependiente de CaMKII, es también la responsable de la recuperación virtualmente completa del transitorio de Ca²⁺ que ocurre en el AM.

La primera parte de este trabajo de Tesis está dirigida a responder este interrogante

VI. Injuria irreversible por isquemia y reperfusión

Como se mencionó previamente, si se somete al corazón a una isquemia prolongada sobreviene un daño irreversible, conocido como infarto. La injuria por reperfusión es un fenómeno complejo que puede ser provocado por diferentes etiologías independientes. Durante la etapa más temprana (minutos) de la reperfusión, el desarrollo de hipercontractura (rigidez y acortamiento sostenido) de los miocitos pareciera ser la principal causa de injuria. Más tarde (minutos a horas), varias causas adicionales pueden llevar a una mayor muerte celular por mecanismos tales como

necrosis y apoptosis (Gottlieb y col., 1994; Kajstura y col., 1996; Freude y col., 2000). Durante la isquemia el miocito desarrolla una contractura por disminución de los niveles de ATP (rigor). Esta contractura es generalmente producto de la isquemia moderada, y se resuelve rápidamente cuando se restauran los niveles de ATP durante la reperfusión sin causar un daño estructural importante (Allshire y col., 1987; Ladilov y col., 1997). En cambio, la contractura que se desarrolla con la reperfusión luego de una isquemia prolongada, está caracterizada por un mayor acortamiento de las miofibrillas del que ocurre en la isquemia, con daño del citoesqueleto. Se ha descrito que esta contractura tiene dos causas a) la sobrecarga de Ca²⁺ y b) la disminución en los niveles de ATP (rigor) (Ladilov y col., 1997). La sobrecarga de Ca²⁺ que ocurriría por el mismo mecanismo descrito anteriormente para el AM, sería la consecuencia de la restauración del pH durante la reperfusión. Esta elevada concentración de Ca²⁺ intracelular llevaría a la continua activación de la maquinaria contráctil a medida que se restauran los niveles energéticos (Ladilov y col., 2003). Es decir, la contractura inducida por la reperfusión del miocardio isquémico tendría dos componentes, que prevalecerían en mayor o menor medida de acuerdo a la velocidad de recuperación de energía.

Otro mecanismo implicado en la injuria irreversible por IR es la muerte celular programada (apoptosis). Algunos trabajos

realizados en conejo y perro describen que la reperfusión del tejido isquémico es quien induce la apoptosis (Gottlieb y col., 1994; Zhao y col., 2000). Mientras que otro grupo demuestra que la isquemia misma es un inductor de apoptosis en corazones de rata, y que si bien la reperfusión disminuye el número de miocitos apoptóticos en relación a un corazón continuamente isquémico, esta disminución se ve acompañada por una aceleración de la apoptosis residual en el tejido reperfundido (Fliss y Gattinger, 1996).

Las alteraciones en la regulación del Ca^{2+} por parte del RS podrían tener un importante rol en la apoptosis. Se ha demostrado que la sobrecarga de Ca^{2+} , así como el vaciamiento del RS (o también del retículo endoplasmático), activan calpaínas que inducen apoptosis a través del clivado de Bid que provee un mecanismo adicional para

liberación de citocromo c. El aumento del Ca^{2+} produciría también la activación de la caspasa-12 por clivado de la forma inactiva de esta enzima, procaspasa-12 (Gill y col., 2002; Crow y col., 2004). En trabajos con sobreexpresión de CaMKII δ_C , o con aumento crónico del Ca^{2+} , o en estimulación adrenérgica con inhibición crónica de CaMKII, han relacionado la activación de CaMKII con la señalización apoptótica por un mecanismo aún no dilucidado (Zhu y col., 2003; Chen y col., 2005; Yang y col., 2006). Hasta el momento, lo que sugieren estos estudios es un fuerte nexo entre el manejo anormal del Ca^{2+} en los miocitos, la disfunción mitocondrial y la apoptosis.

En la segunda parte de este trabajo de Tesis, se aborda el rol de la CaMKII en la injuria irreversible por IR.

Objetivos

A fin de responder los interrogantes que surgen de lo expuesto en la Introducción de este trabajo de Tesis Doctoral, se plantean los siguientes objetivos:

I. Injuria reversible por IR - atontamiento miocárdico

- Confirmar que el protocolo de isquemia y reperfusión induce la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN en corazones de ratones perfundidos, y verificar que esta fosforilación es mediada por la activación de CaMKII.

- Comprobar si esta fosforilación dependiente de CaMKII es la responsable de la recuperación del transitorio de Ca²⁺ que ocurre en el AM, utilizando ratones transgénicos para PLN con ambos sitios de fosforilación mutados a Ala (PLN-DM), o con PLN nativa (PLN-WT).

- Estimar la alteración en la respuesta al Ca²⁺ de las proteínas contráctiles, y observar si hay diferencias entre las dos cepas de ratones utilizadas. Estudiar la proteólisis de troponina I, una de las posibles proteínas que sufren proteólisis inducida por IR, como posible mecanismo de una disminución en la respuesta al Ca²⁺ de las proteínas contráctiles y observar si hay diferencias entre las dos cepas de ratones utilizadas.

II. Injuria irreversible por IR - necrosis y apoptosis

- Estudiar el curso en el tiempo de la fosforilación de PLN para analizar la activación de CaMKII durante la reperfusión luego de isquemias prolongadas en corazones de rata sometidos a IR.

- Evaluar si la activación de CaMKII juega algún papel en la injuria irreversible inducida por IR. Determinar si esta enzima afecta el grado de necrosis y apoptosis inducido por esta intervención.

Materiales y Métodos

I. Animales

Un primer grupo de experimentos se realizó en ratones transgénicos macho (entre 20 y 30 gr de peso) que expresaban PLN nativa (PLN-WT) o PLN mutante (PLN-DM) en la cual ambos sitios de fosforilación (Ser¹⁶ y Thr¹⁷) se encontraban reemplazados por el residuo no fosforilable alanina sobre una línea de ratones PLN "null" (SVJ129/CF1), que no expresaban PLN (Luo y col., 1994; Li y col., 2002). Los animales transgénicos se obtuvieron del laboratorio del Departamento de Farmacología y Biofísica Celular de la Dra. Kranias en la Universidad de Cincinnati. Para los estudios de degradación de TnI se utilizaron como control un grupo de ratones de la cepa Swiss-Webster de igual peso y edad.

Un segundo grupo de experimentos se realizó en ratas Wistar macho (entre 200 y 300 gr de peso) obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

1. Perfusión de corazones aislados de ratón

Los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con heparina (2,5 unidades/gr) para evitar la coagulación de la sangre en los capilares durante la maniobra de canulación de la arteria aorta. Luego de 20 minutos se realizó una dislocación cervical, sosteniendo al animal por el cuello y

ejerciendo tracción por la cola hacia atrás. Rápidamente, se abrió el tórax para extraer el corazón y canular la aorta en un equipo de perfusión retrógrada (técnica de Langerdorff). El corazón aislado (entre 0,2 y 0,3 gr de peso húmedo) se perfundió con solución salina Tyrode modificada (en mM: 140 NaCl, 5,4 KCl, 2 CaCl₂, 0,33 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 10 glucosa, y 10 HEPES; pH 7,4; equilibrado con O₂ 100%), a temperatura y presión constantes (37°C y 80 mmHg respectivamente). Luego de un breve período de estabilización para asegurar la viabilidad del corazón, se continuó con el bloqueo de la frecuencia espontánea de los mismos controlada por el nódulo sinusal. El bloqueo se realizó por pinzamiento del tabique interauricular. La estimulación eléctrica se realizó a través de dos placas de electrodos de platino colocadas a los lados del corazón, inmersas en el líquido de perfusión, a una frecuencia de 300 pulsos/min. Para el registro y almacenamiento de la señal de fluorescencia, los electrodos se conectaron a un estimulador sincronizado en forma digital con la computadora. Para evaluar la actividad mecánica de los corazones, se retiró por disección la aurícula izquierda y se colocó un balón de polietileno dentro del ventrículo izquierdo (VI), a través del orificio aurículo-ventricular. El balón se conectó a un

transductor de presión (MPX5050 Motorola, USA) a través de una delgada cánula. El balón y la cánula se llenaron con agua bidestilada desgaseada (para evitar la formación de burbujas que atenuarían la señal) de modo de fijar la presión de fin de diástole del VI (PFD). La contractilidad del VI se evaluó por medio de la presión desarrollada del VI (PDVI) y la máxima velocidad de desarrollo de presión ($+dP/dt_{\max}$), y la relajación del ventrículo se estudió a través de la medida del tiempo hasta la mitad de la relajación (t_{50}) (Figura 20).

1.1.1. Protocolo de isquemia y reperfusión

De acuerdo a ensayos controles previos, los corazones se dejaron estabilizar entre 20 y 30 minutos luego de finalizada la carga del indicador fluorescente. En la Figura 21 se esquematiza el protocolo experimental de perfusión. Luego de la estabilización (preisquemia), se interrumpió el flujo coronario (isquemia) por cese de la perfusión de solución Tyrode. La estimulación eléctrica se suspendió al minuto de establecida la

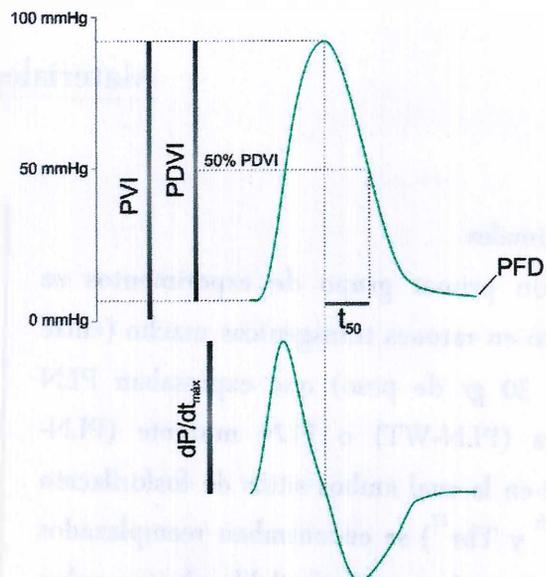


Figura 20. Esquema del registro de la presión intraventricular. La figura muestra los parámetros medidos: PVI (presión del ventrículo izquierdo), PDVI (presión desarrollada por el ventrículo izquierdo), PFD (presión de fin de diástola), t_{50} (tiempo hasta la mitad de la relajación), dP/dt_{\max} (velocidad máxima de desarrollo de PDVI).

isquemia, y se reinició en los primeros segundos de la reperfusión. La isquemia fue de tipo global y normotérmica. Luego de 12 minutos de cese de flujo coronario, se restableció la perfusión (reperfusión). La reperfusión se continuó por un período de 30 minutos, durante los cuales se adquirió la señal del indicador fluorescente entre 5 y 10 segundos, a diferentes tiempos. Finalizado

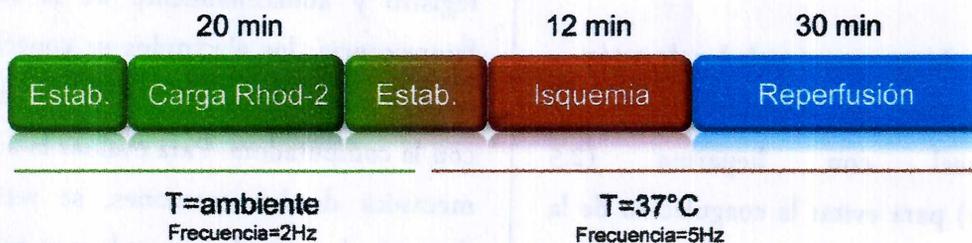


Figura 21. Esquema del protocolo de perfusión de corazones. Luego de un período de estabilización (Estab.), los corazones se perfundieron a temperatura ambiente con el indicador de Ca^{2+} fluorescente, Rhod-2. Luego de la carga, se estabilizaron a $37^{\circ}C$ y la frecuencia de estimulación se elevó de 2 a 5 Hz. Una vez estabilizados se sometieron a un período de isquemia global normotérmica de 12 minutos, con posterior reperfusión durante 30 minutos.

cada experimento, los corazones se congelaron con una pinza tipo Wollenberger preenfriada por inmersión en aire líquido. El tejido ventricular congelado se pesó, se pulverizó y se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar las determinaciones bioquímicas.

1.1.1. Evaluación simultánea de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la PDVI en el corazón entero

Luego de estabilizados, los corazones se perfundieron durante 15 a 20 minutos con la forma acetometiléster (permeable a través de la membrana plasmática) del indicador de

Ca^{2+} fluorescente Rhod-2 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en solución Tyrode modificada. Brevemente, se disolvieron 100 μg del indicador en 44 μl de solución 4% de plurónico F-127 en DMSO. La solución se sonicó y se diluyó en 3 ml de solución Tyrode hasta una concentración final del indicador de 30 μM . La solución del indicador, oxigenada en forma continua, se perfundió a través de la aorta. La carga se realizó a temperatura ambiente para facilitar la localización del indicador en el citosol, y a una frecuencia de estimulación de 120 pulsos/min debido a la temperatura a la que se realiza la carga de la solución del

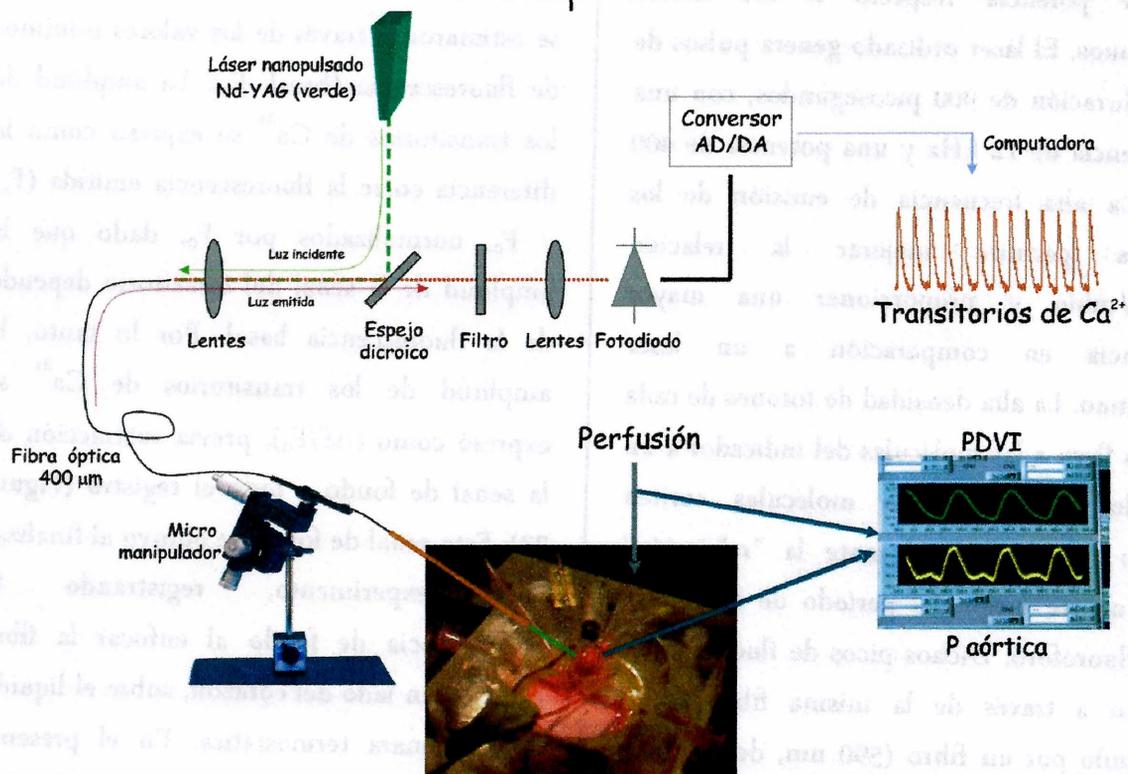


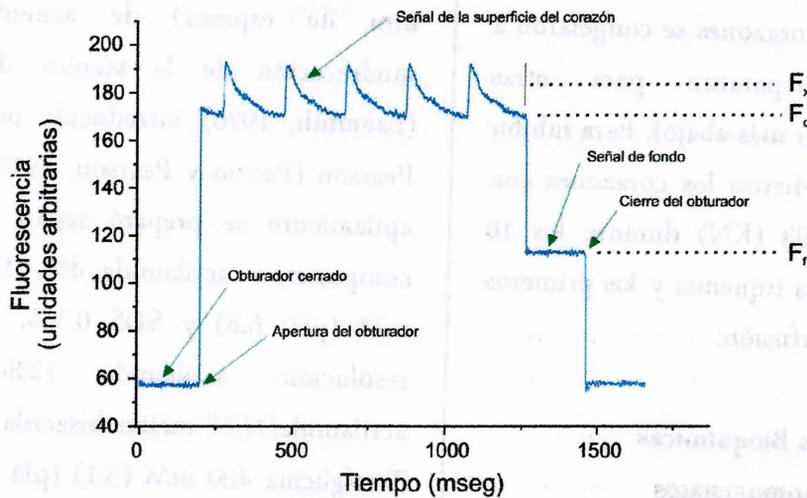
Figura 22. Esquema del equipo para la adquisición de la señal fluorescente del indicador Rhod-2. La luz pulsada de un láser verde se enfoca con la ayuda de un micromanipulador sobre la superficie de un corazón a través de una fibra óptica de 400 μm (vía verde). La señal de fluorescencia (vía roja) se recoge con la misma fibra, se filtra y se enfoca sobre un fotomultiplicador para luego ser registrada y archivada en una computadora.

indicador (Mejía-Alvarez y col., 2003). Luego de la carga del Rhod-2, la temperatura se elevó a 37°C, y la frecuencia de estimulación se fijó por igual en todos los experimentos, en 300 pulsos/min.

Para transmitir la luz de excitación hacia la superficie del corazón, se inyectó, con la ayuda de un objetivo de 40x de aumento y 0,45 de apertura numérica, la luz de un láser pulsado Nd-YAG de 532 nm de longitud de onda de emisión (compuesto por Neodimio y granate de Itrio y Aluminio, de allí su nombre) a través de una fibra óptica multimodal de 400 μm de espesor (3M Corp.). El láser pulsado permite entregar una mayor potencia respecto a los láseres continuos. El láser utilizado genera pulsos de una duración de 900 picosegundos, con una frecuencia de 12 kHz y una potencia de 400 W. La alta frecuencia de emisión de los pulsos permite mejorar la relación señal/ruido y proporcionar una mayor potencia en comparación a un láser continuo. La alta densidad de fotones de cada pulso lleva a las moléculas del indicador a un estado excitado. Estas moléculas emiten luego fluorescencia durante la “relajación” que ocurre luego del período de excitación del fluoróforo. Dichos picos de fluorescencia viajan a través de la misma fibra óptica pasando por un filtro (590 nm, de Edmund Scientific USA) para eliminar el componente de excitación, y se enfocan sobre un fotodiodo de avalancha (EG & G, Canadá)

conectado a un convertidor de integración corriente-voltaje, controlado por medio de un microcontrolador PIC (del inglés, Controlador de Interfaz Periférico). La llegada de luz incidente sobre el corazón se controló por el accionar de un obturador electrónico, para evitar la iluminación continua sobre la superficie del corazón e impedir la degradación del indicador (*bleach*). El equipo descrito para la estimación del Ca^{2+} intracelular se esquematiza en la Figura 22.

La fluorescencia de Rhod-2 permite estimar los cambios en el tiempo de la concentración de Ca^{2+} intracelular libre. Las variaciones en los niveles del Ca^{2+} diastólico se estimaron a través de los valores mínimos de fluorescencia (basal, F_0). La amplitud de los transitorios de Ca^{2+} se expresó como la diferencia entre la fluorescencia emitida (F_x) y F_0 , normalizados por F_0 , dado que la amplitud de la señal del transitorio depende de la fluorescencia basal. Por lo tanto, la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} se expresó como $(\Delta F/F_0)$, previa sustracción de la señal de fondo a todo el registro (Figura 23). Esta señal de fondo se obtuvo al finalizar cada experimento, registrando la fluorescencia de fondo al enfocar la fibra óptica a un lado del corazón, sobre el líquido de la cámara termostática. En el presente trabajo, los resultados de los niveles de Ca^{2+} se refieren como porcentaje del valor en la preisquemia.



$$\text{Amplitud del transitorio de Ca}^{2+} = \frac{(F_x - F_f) - (F_o - F_f)}{(F_o - F_f)} = \frac{(F_x - F_o)}{(F_o - F_f)}$$

Figura 23. Ejemplo del registro de la fluorescencia de Rhod-2. Las flechas indican los momentos de apertura del obturador, registro de la señal, y cierre del obturador. F_f indica la señal de fondo inespecífica de cada experimento, que luego se sustrajo a todo el registro de ese experimento. F_x es la fluorescencia registrada al tiempo x . F_o es la fluorescencia diastólica.

2. Perfusión de corazones aislados de rata

Se aislaron y perfundieron corazones de ratas Wistar de acuerdo a la técnica de Langendorff. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (4 mg/100 g de peso corporal) y los corazones se extrajeron de igual manera que lo descrito anteriormente para los corazones de ratones. La perfusión se realizó a temperatura y flujo constantes con solución salina (en mM: NaCl 128,3; KCl 4,7; CaCl₂ 1,35; NaHCO₃ 20,2; NaH₂PO₄ 0,4; MgCl₂ 1,1; glucosa 11,1 y Na₂EDTA 0,04; equilibrada con 95% de O₂ y 5% de CO₂, a pH=7,4). La presión de perfusión, monitoreada en forma continua a través de un transductor de presión, fue de aproximadamente 80 mmHg durante el período de estabilización. Los corazones se

estimularon a una frecuencia de 240 pulsos/min a través de un par de electrodos suturados a la pared ventricular derecha, conectados a un estimulador eléctrico. Para la evaluación de los parámetros mecánicos, se colocó un balón de látex del mismo modo que para los corazones de ratones, conectado a un transductor de presión (Motorola MPX5050, Co., USA). El globo se llenó con agua bidestilada desgaseada de modo de fijar la presión diastólica final (PFD).

2.1 Protocolo de isquemia y reperfusión

Luego de 10 minutos de actividad contráctil estable, se interrumpió el flujo coronario provocando una isquemia global normotérmica. Luego de 45 minutos de isquemia se restableció la perfusión coronaria

durante 120 minutos. Finalizado el período de reperfusión, los corazones se congelaron a -80°C o se prepararon para otras determinaciones (ver más abajo). Para inhibir CaMKII, se perfundieron los corazones con $1\text{-}2,5\ \mu\text{M}$ de KN-93 (KN) durante los 10 minutos previos a la isquemia y los primeros 10 minutos de reperfusión.

II. Determinaciones Bioquímicas

1. Preparación de homogenatos

El tejido ventricular pulverizado se homogeneizó en 5 volúmenes de medio de homogeneización preenfriado (en mM: $30\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $5\ \text{Na}_2\text{EDTA}$, $25\ \text{NaF}$, 300 sacarosa, y los inhibidores de proteasas $1\ \text{PMSF}$, 1 benzamidina, $4\ \mu\text{g/ml}$ de leupeptina, $0,4\ \mu\text{g/ml}$ de pepstatina, pH $7,0$ a 4°C) con un homogeneizador manual (P1200E Kinematica Polytron, USA). Luego, el homogenato se centrifugó a $11500\times g$ durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante obtenido se separó en alícuotas para ser congelado a -80°C . La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) con seroalbúmina bovina como proteína estándar para la curva de calibración. El rendimiento aproximado fue de $30\ \text{mg}$ de proteína por gramo de corazón.

2. Electroforesis y análisis por Western blots

Para el estudio de la fosforilación de PLN, la degradación de TnI, activación de caspasa-3 y relación Bcl-2/Bax, se realizó la separación electroforética de las proteínas en

geles de poliacrilamida-SDS (minigeles de $1\ \text{mm}$ de espesor) de acuerdo a una modificación de la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970) introducida por Porzio y Pearson (Porzio y Pearson, 1977). El gel de apilamiento se preparó según la siguiente composición: acrilamida 4% , Tris-HCl $125\ \text{mM}$ (pH: $6,8$) y SDS $0,1\%$, y el gel de resolución: acrilamida 12% , (relación acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida $30:0,8$) Tris/glicina $400\ \text{mM}$ ($3:1$) (pH $8,8$), glicerol 5% , SDS $0,1\%$ y EDTA $0,2\ \text{mM}$. La polimerización fue catalizada por el agregado de tetrametilendiamina $0,08\%$, y se inició por el agregado de trazas de persulfato de amonio. Para la separación electroforética de Bax y Bcl-2, se utilizó un gel de resolución con 15% de acrilamida (menor tamaño de poro que permite la correcta separación de estas dos proteínas). Las muestras se disolvieron en solución solubilizante (SDS 2% , Tris/HCl $62,5\ \text{mM}$ a pH $6,8$, glicerol 10% , β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol $0,001\%$ como indicador del frente de corrida). Se sembraron $25\ \mu\text{g}$ (PLN), $15\ \mu\text{g}$ (TnI), $80\ \mu\text{g}$ (caspasa-3) y $30\ \mu\text{g}$ (Bcl-2 y Bax) de proteínas en cada surco del gel. La electroforesis se realizó a potencial constante, comenzando a 100 voltios durante el apilamiento de las muestras, y luego a 120 voltios durante la resolución de las proteínas. La corrida electroforética se continuó hasta que el frente de corrida, indicado por la línea azul del colorante, llegase al límite inferior del gel. Finalizada la electroforesis, los geles

se estabilizaron en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 15%) e inmediatamente las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de polivinilideno difluoruro (Immobilon-P, Millipore, USA) en condiciones semisecas durante una hora a 12 voltios. La correcta transferencia de las proteínas a la membrana se confirmó por tinción con el colorante reversible rojo Ponceau S. Para eliminar el colorante se lavaron las membranas 2 ó 3 veces con solución salina amortiguadora de Tris (TBS, del inglés *Tris Buffered Saline*, Tris 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7,4), o TBS adicionado con 0,1% de detergente Tween20 (TBS-T) de acuerdo al anticuerpo utilizado. Una vez libres de colorante, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con solución de 5% de leche descremada en TBS con el objeto de bloquear los sitios libres de proteínas en la membrana, y así evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la membrana, debido a que éstos también son proteínas. Una vez bloqueadas las membranas, se incubaron durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios.

a) anticuerpos policlonales, dirigidos contra péptidos de fosfolamban (residuos 9-19) fosforilados en Ser¹⁶ o Thr¹⁷ (anti-PSer¹⁶ y anti-PThr¹⁷) generados en conejo. Estos anticuerpos se prepararon en solución 5% de leche descremada en TBS (dilución 1:5000, Badrilla, UK).

b) anticuerpo monoclonal dirigido contra TnI (anti-TnI, mAb 8I-7, Spectral Diagnostics, Canadá) generado en ratón, diluido 1:5000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.

c) anticuerpo policlonal dirigido contra la forma activa (fragmento de 17 kDa) de caspasa-3 (anti-caspasa-3, AB3623, Chemicon International, USA) generado en conejo, diluido 1:300 en solución 1% de albúmina sérica bovina en TBS-T.

d) anticuerpo policlonal dirigido contra Bax (anti-Bax, sc-493, Santa Cruz Biotechnology, USA), generado en conejo, diluido 1:1000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.

e) anticuerpo policlonal dirigido contra Bcl-2 (anti-Bcl-2, sc-492, Santa Cruz Biotechnology, USA) generado en conejo, diluido 1:1000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.

Posteriormente, para la detección de los anticuerpos primarios, se lavaron las membranas 5 veces (un lavado de 15 minutos y cuatro de 5 minutos) con TBS o TBS-T, y luego se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa. Para los anticuerpos anti-PSer¹⁶, anti-PThr¹⁷, anti-caspasa-3, anti-Bax y anti-Bcl-2, se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo (1:20.000, Santa Cruz, California, USA) y para el anti-TnI se usó un anticuerpo anti-inmunoglobulina de

ratón (1:20.000, Santa Cruz, California, USA). Nuevamente se realizaron 5 lavados para quitar el exceso de anticuerpo. El revelado se realizó sobre placas radiográficas por reacción quimioluminiscente con el uso de un kit comercial (ECL Plus, Amersham Biosc., USA), obteniendo bandas de diferente intensidad y tamaño de acuerdo a la cantidad de antígeno detectado.

La cuantificación de las bandas se realizó con un programa de computación (ImageJ 1.37v NIH, USA), con el cual se mide la intensidad de las señales digitalizadas por escaneo de las placas radiográficas. Los niveles de fosforilación de PLN se expresan como porcentaje de la fosforilación inducida por un agonista β -adrenérgico, isoproterenol (Iso) a una dosis de 30 nM. Esta dosis provoca efectos máximos en la actividad mecánica y en la fosforilación de PLN (Mundña-Weilenmann y col., 1996). La degradación de TnI se expresó como porcentaje de la inmunoreactividad total, es decir: intensidad de las bandas de los productos de degradación/ Σ (intensidad de la banda de TnI intacta + intensidad de las bandas de los productos de degradación) $\times 100$.

III. Tamaño del infarto

Luego del período de reperfusión, los corazones se perfundieron durante 7 minutos con 1% de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) en solución amortiguadora fosfato (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*. Tabletas para

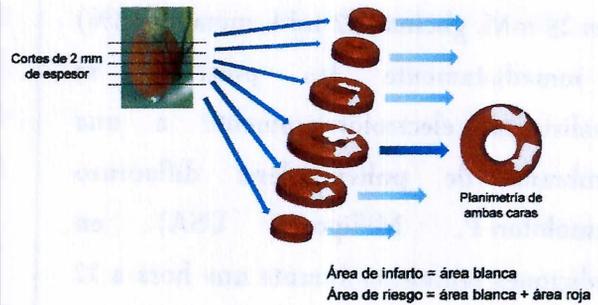


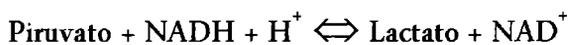
Figura 24. Diagrama de corte del corazón para la determinación del área de infarto por tinción con TTC. Luego del protocolo correspondiente, el corazón se perfunde en una primera etapa con solución 1% de TTC, y en una segunda etapa se sumerge en la misma solución. Posteriormente se coloca a -20°C y luego de congelado se corta en rodajas de 2 mm de espesor. Se digitaliza la imagen por medio de un escáner y se realiza la planimetría de ambas caras con el uso del programa de computación ImageJ.

disolver que generan una solución 10 mM de fosfato, 137 mM de NaCl 137 mM con pH 7,4. Sigma, USA), y luego se sumergieron en esta solución durante otros 7 minutos. Este colorante ingresa a las células y al ser reducido queda atrapado dentro de su interior tiñéndolas de rojo. Sólo las células que conservan actividad deshidrogenasa, pueden retener este colorante en su interior luego de deshidrogenarlo, por lo cual las células que se encuentran vivas, quedarán teñidas de color rojo, mientras que las células no viables permanecerán blancas. Luego de la perfusión y tinción con el colorante, los corazones se congelaron durante una hora a -20°C para facilitar el posterior corte en rodajas de 2 mm de espesor, transversales al eje mayor. Antes de la medición, las rodajas se fijaron en formalina al 10% amortiguada, a fin de resaltar el contraste entre las áreas

blancas y rojas. El área de infarto se calculó por planimetría de ambas caras de todas las rodajas con el uso del programa ImageJ, y se expresó como porcentaje del área total del corazón, que se corresponde con el área de riesgo cuando la isquemia realizada es del tipo global como en este trabajo.

IV. Determinación de actividad de LDH

La actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH) es un índice de daño tisular en el miocardio. El daño irreversible por isquemia y reperfusión se determinó midiendo los niveles de LDH liberada en el efluente de los 10 primeros minutos de reperfusión. La actividad de LDH en la solución colectada se determinó por medio de un método cinético enzimático (Roche, Alemania), de acuerdo a la siguiente reacción:



La LDH cataliza esta reacción, y su velocidad es directamente proporcional a la actividad de la enzima. La velocidad de disminución de NADH medida espectrofotométricamente indica la actividad de la LDH en la muestra.

V. T.U.N.E.L. (del inglés, *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling*)

Para la identificación de células apoptóticas se utilizó la técnica de TUNEL en secciones de tejidos incluidos en parafina. La valoración de la apoptosis por medio de

esta técnica tiene su fundamento en la capacidad de detectar la fragmentación internucleosomal del ADN característica del proceso apoptótico. Para ello, luego del protocolo de perfusión, los corazones se fijaron en formalina amortiguada y se procesaron con técnicas convencionales de microscopía óptica hasta su inclusión en parafina. Se desparafinaron cortes transversales de 5 μm de espesor con 2 pasajes en xilol de 5 minutos cada uno y luego se rehidrataron por pasajes a través de una serie de gradación decreciente de etanol: absoluto (2 x 5 min), 96% (1 x 3 min), 70% (1 x 3 min). Finalmente se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno en PBS (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 3 mM, pH 7,4).

El fundamento de esta técnica consiste en marcar enzimáticamente con nucleótidos modificados, los extremos 3'OH libres del ADN fragmentado generados durante el desarrollo de la apoptosis. La enzima desoxynucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora nucleótidos trifosfato (dUTP), marcados con digoxigenina, en los extremos 3'OH libres. Los preparados son luego incubados con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa. La posterior incubación con el sustrato, diaminobencidina, produce un precipitado marrón en aquellos núcleos con fragmentación del ADN. Como controles negativos se incubaron secciones con todos los componentes, excepto la enzima

transferasa terminal. El control positivo es provisto por el kit (glándula mamaria de hembras de roedores en etapa de amamantamiento).

La técnica descrita se realizó de acuerdo al protocolo y recomendaciones del kit comercial utilizado (ApopTag kit, de Chemicon Internacional). Finalmente las secciones se contracoloraron con hematoxilina. Se analizaron 20 campos de cada sección con un microscopio (Olympus BX-50) utilizando un objetivo de 40x. Las imágenes de cada campo fueron fotografiadas con una cámara digital (Evolution VF, Qimaging) acoplada al mismo. Se evaluaron aproximadamente 500 miocitos por sección identificados por la apariencia morfológica (forma elíptica y citoplasma estriado) y parámetros morfométricos. Las imágenes se analizaron con un programa de análisis y procesamiento digital de imágenes (Image-Pro Plus V6.0). La relación entre el número de núcleos TUNEL-positivos y el número total de núcleos se expresó como porcentaje de núcleos TUNEL-positivos en cada grupo.

VI. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. Para el estudio de significación se utilizó el test de t-Student para muestras apareadas o independientes. Para la comparación entre diferentes grupos se utilizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA). Las diferencias estadísticas observadas con ANOVA se examinaron con

el test de Dunnet. En todos los casos se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

I. Injuria Reversible en Corazones Perfundidos de Ratones Transgénicos

Experimentos en ratones transgénicos para PLN con el sitio Ser¹⁶ o el sitio Thr¹⁷ mutados a Ala demostraron que la fosforilación de Thr¹⁷ dependiente de CaMKII, era la principal responsable de la recuperación parcial de la contractilidad en el AM, al menos en los primeros 30 minutos de reperfusión que siguen a la isquemia (Said y col., 2003).

A fin de determinar si la CaMKII y la fosforilación de Thr¹⁷ participan en la recuperación contráctil a través de la mejora en el manejo del Ca²⁺ intracelular, se realizaron experimentos en ratones transgénicos con ambos sitios de fosforilación mutados a Ala en donde se determinó simultáneamente el Ca²⁺ intracelular y la actividad mecánica

1. Fosforilación de PLN inducida por isquemia y reperfusión

Se realizó una primera serie de experimentos con el fin de verificar en los corazones de ratones la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN al comienzo de la

reperfusión, tal como se había demostrado en corazones aislados de rata (Vittone y col., 2002). Para ello, se congelaron corazones de ratones perfundidos de acuerdo a la técnica de Langendorff, a diferentes tiempos luego de restaurado el flujo coronario (reperfusión), y se estudió el curso en el

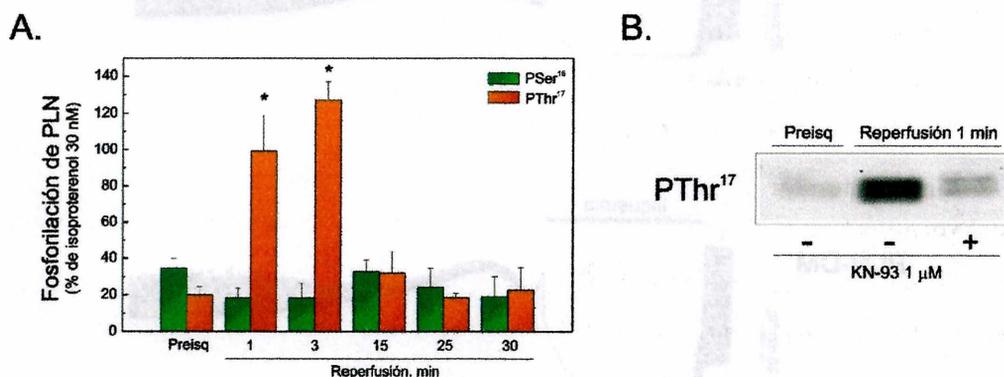


Figura 25. Curso en el tiempo de la fosforilación de los residuos de PLN de corazones de ratón sometidos a isquemia y reperfusión. (A) Resultados promedio de la fosforilación de Ser¹⁶ y Thr¹⁷ de PLN de corazones congelados durante el período de estabilización (Preisq.) y a 1, 3, 15, 25 y 30 minutos de reperfusión. Los resultados representan la media \pm ES, expresados como porcentaje de la máxima fosforilación inducida por isoproterenol 30 nM en corazones no isquémicos (n=11-20, para Preisq, 1 y 3 min de reperfusión, y n=3-6 para 15, 25 y 30 min de reperfusión). *p<0,05 respecto a Preisq. (B) Blot representativo que muestra que el incremento en la fosforilación de Thr¹⁷ en la reperfusión (Reperfusion 1 min, -), fue abolido por la inhibición de CaMKII con KN-93 (Reperfusion 1 min, +).

tiempo de los niveles de fosforilación de PLN. En la Figura 25A se muestra la fosforilación de los sitios fosforilables de PLN: Thr¹⁷ (sitio sustrato de CaMKII) y Ser¹⁶ (sitio sustrato de PKA), durante la reperfusión de estos corazones. La fosforilación del residuo Ser¹⁶ de PLN no sufrió cambios significativos durante los 30 minutos de reperfusión respecto a los valores preisquémicos. En cambio el residuo Thr¹⁷ incrementó significativamente el nivel de fosforilación durante los primeros minutos de la reperfusión (1 y 3 min). La Figura 25B muestra un blot representativo que indica que el aumento de la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN ocurrido al minuto de reperfusión resultó inhibido cuando la IR se realizó en presencia del inhibidor de la

CaMKII, KN-93 (1 μM). Resultados similares se obtuvieron en otros tres experimentos de este tipo. En su conjunto, estos resultados indican un aumento de la actividad de CaMKII capaz de fosforilar al residuo Thr¹⁷ de PLN y sugerirían un incremento en el Ca²⁺ intracelular que activaría a la CaMKII. Los resultados confirmaron además que el corazón de ratón se comporta en forma similar al de la rata en cuanto al curso en el tiempo de la fosforilación de los sitios de PLN luego de una isquemia breve (Vittone y col., 2002).

2. Actividad Mecánica durante el protocolo de isquemia y reperfusión

Para estudiar la relevancia de la

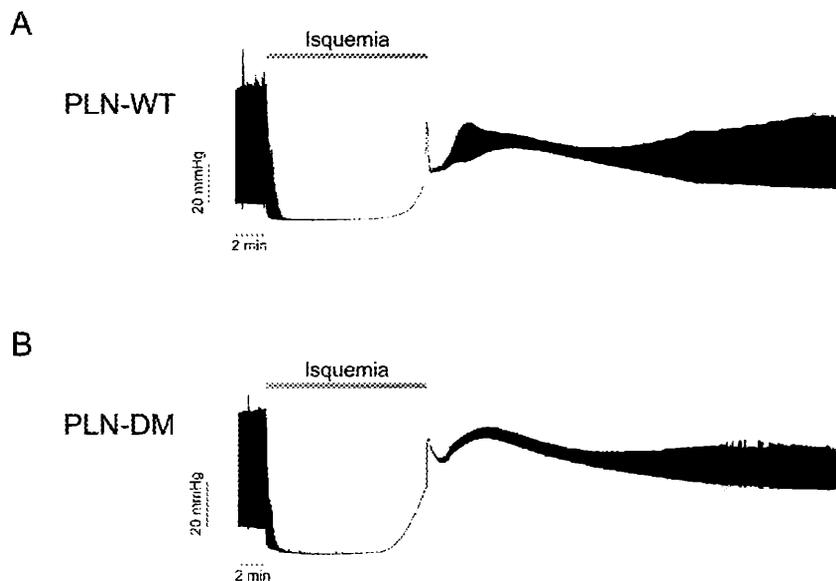


Figura 26. Registros típicos de la presión ventricular izquierda (PVI) en corazones aislados perfundidos de ratones transgénicos durante el protocolo de isquemia-reperfusión. En los registros continuos de corazones PLN-WT (A) y PLN-DM (B) se observa que la isquemia reduce la contractilidad hasta valores no detectables en ambos grupos. Hacia el final de la isquemia se observó un aumento de la PFD, que se acentuó aún más al comienzo de la reperfusión y luego se recuperó parcialmente. La contractilidad se recuperó también durante la reperfusión. Tanto la recuperación contráctil como la PFD, fue menor en los corazones PLN-DM que en los corazones PLN-WT.

fosforilación de los sitios de PLN en la recuperación contráctil y el manejo del Ca^{2+} intracelular, se realizó una segunda serie de experimentos en la que se utilizaron ratones con PLN nativa (PLN-WT) y ratones con ambos sitios de fosforilación de PLN mutados a alanina (PLN-DM). Los corazones aislados se perfundieron de acuerdo a la técnica de Langendorff y se sometieron a un protocolo de 12 minutos de isquemia seguidos de 30 minutos de reperfusión. La Figura 26 muestra el registro típico de la PVI medida con un balón intraventricular durante la IR.

La isquemia por interrupción del flujo coronario en los corazones de ratones PLN-WT, disminuyó la contractilidad hasta valores no detectables. La PFD comenzó a aumentar hacia el final de la isquemia y continuó subiendo durante los primeros minutos de reperfusión. Tanto la contractilidad como la PFD se recuperaron sólo parcialmente hacia el fin del período de

reperfusión estudiado. Durante la isquemia, los corazones PLN-DM se comportaron de manera similar a los PLN-WT, aunque en los primeros las alteraciones mecánicas fueron mayores: la PFD comenzó a incrementar antes y alcanzó un mayor aumento que en los PLN-WT. Durante los primeros minutos de la reperfusión la PFD continuó en aumento, y luego tanto ésta como la contractilidad se recuperaron parcialmente, aunque en menor medida que en los corazones PLN-WT. Las Figuras 27 y 28 muestran los resultados promedio de estos experimentos. En ambos grupos, la PFD aumentó significativamente durante la isquemia siendo los valores alcanzados al final de la isquemia $14,1 \pm 3,2$ mmHg y $30,7 \pm 6,8$ mmHg en corazones PLN-WT y PLN-DM, respectivamente. Al comienzo de la reperfusión la PFD se elevó aún más, y en forma abrupta, manteniéndose elevada durante el resto de la reperfusión (Figura 27A). Al final de la reperfusión, estos valores

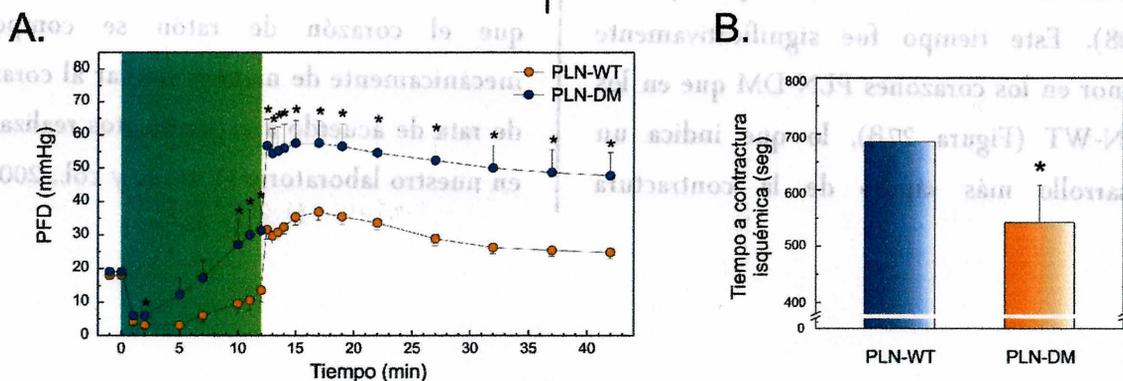


Figura 27. Resultados promedio del curso en el tiempo de la PFD de corazones de ratones PLN-WT y PLN-DM sometidos a isquemia-reperfusión. La PFD se expresó en mmHg (A) y el tiempo hasta la contractura isquémica se expresó en segundos (B). Los resultados representan el valor de la media \pm ES de corazones sometidos a IR de ratones PLN-WT (n=13-16) y PLN-DM (n=11). * indica $p < 0,05$ PLN-DM vs PLN-WT.

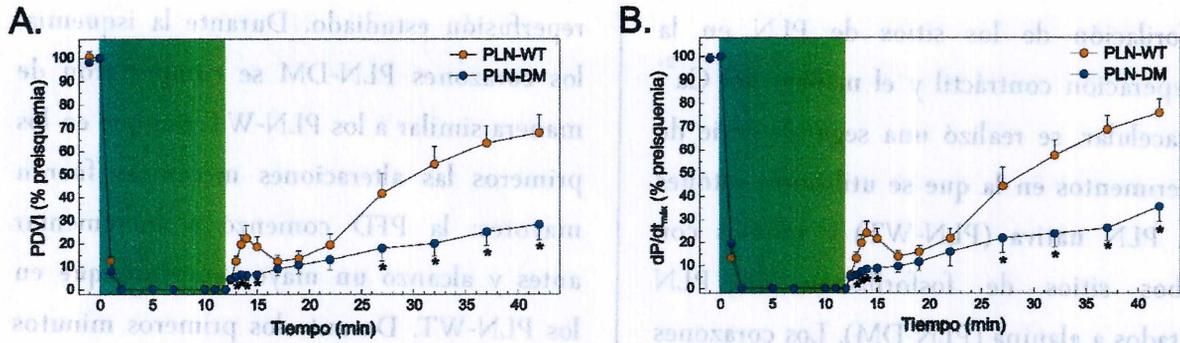


Figura 28. Resultados promedio del curso en el tiempo de la contractilidad de corazones de ratones PLN-WT y PLN-DM sometidos a isquemia-reperusión. La PDVI (A) y la $dP/dt_{m\acute{a}x}$ (B) disminuyeron significativamente durante la isquemia, y se recuperaron durante la reperusión. Los corazones de ratones PLN-DM se recuperaron en menor medida que los PLN-WT. Los resultados representan el valor de la media \pm ES de corazones sometidos a IR de ratones PLN-WT (n=13-16) y PLN-DM (n=11), expresados como porcentaje de los valores preisquémicos. * indica $p < 0,05$ PLN-DM vs PLN-WT.

fueron $26,9 \pm 2,5$ mmHg y $45,8 \pm 6,8$ mmHg para PLN-WT y PLN-DM respectivamente. Los aumentos en la PFD, tanto en la isquemia como en la reperusión, fueron significativamente mayores en el grupo de PLN-DM con respecto a los PLN-WT.

Adicionalmente se midió el tiempo hasta la contractura isquémica que se define como el tiempo desde la interrupción del flujo coronario hasta el momento en que la PFD, - producto de la contractura que ocurre durante la isquemia-, aumenta 4 mmHg por encima del valor mínimo (Hampton y col., 1998). Este tiempo fue significativamente menor en los corazones PLN-DM que en los PLN-WT (Figura 27B), lo que indica un desarrollo más rápido de la contractura

debida a la isquemia en los PLN-DM ($542,7 \pm 66,3$ vs. $686,6 \pm 21,0$ seg respectivamente).

La PDVI y la $+dP/dt_{m\acute{a}x}$ (Figuras 28A y 28B) disminuyeron al comienzo de la isquemia hasta valores no detectables. Durante la reperusión la contractilidad se recuperó en forma parcial hasta alcanzar, a los 30 minutos, un valor de $67,9 \pm 7,6\%$ en PLN-WT vs. $28,3 \pm 6,7\%$ en PLN-DM (PDVI) y $75,9 \pm 5,9\%$ en PLN-WT vs. $35,5 \pm 6,5\%$ en PLN-DM ($+dP/dt_{m\acute{a}x}$) respecto de los valores preisquémicos.

Estos experimentos nuevamente indican que el corazón de ratón se comporta mecánicamente de manera similar al corazón de rata de acuerdo a experimentos realizados en nuestro laboratorio (Vittone y col., 2002).

3. Estimación del calcio intracelular durante el protocolo de isquemia y reperfusión

Simultáneamente con la medida de la presión ventricular izquierda (PVI), se evaluó el Ca^{2+} diastólico, sistólico y la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en los corazones sometidos a IR.

En la Figura 29 se muestran registros típicos de los transitorios de Ca^{2+} en corazones de ratones PLN-WT y DM. No se observaron diferencias significativas en el Ca^{2+} diastólico, Ca^{2+} sistólico ni en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} durante el período de estabilización en ambos grupos. Luego de 12 minutos de isquemia global y 30 minutos de reperfusión, el transitorio de Ca^{2+}

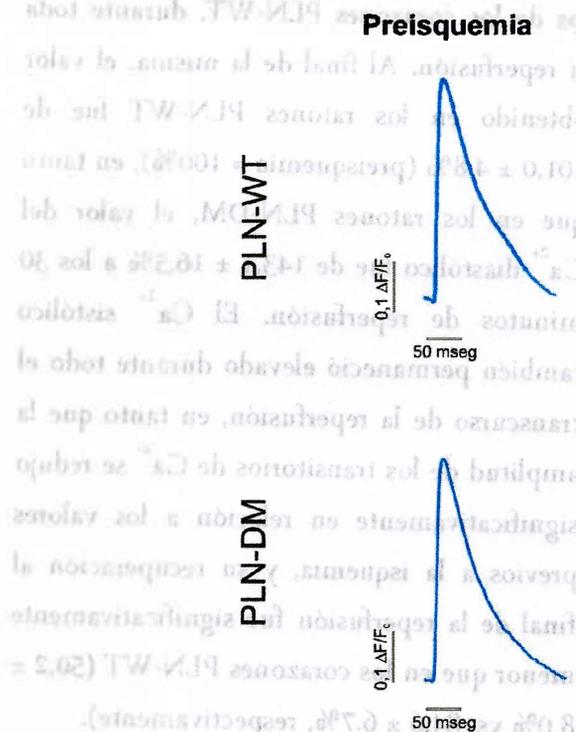
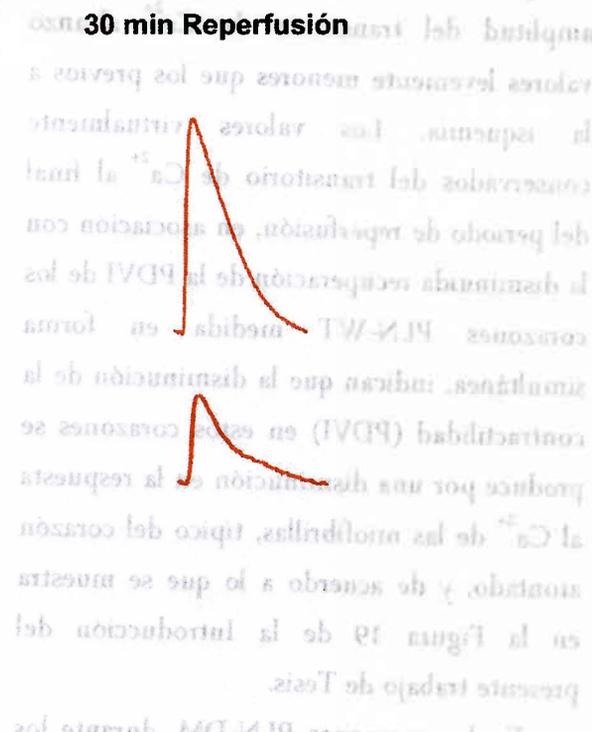


Figura 29. Registros típicos de la fluorescencia de Rhod-2 en corazones aislados perfundidos durante el protocolo de isquemia-reperfusión. Luego de 30 minutos de reperfusión, los corazones de ratones PLN-DM sufrieron una disminución en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y un aumento en el Ca^{2+} diastólico respecto a los valores de la preischemia, y también respecto a los correspondientes valores de los corazones PLN-WT.

en los corazones PLN-WT se recuperó virtualmente a los valores preisquémicos en concordancia con lo descrito para el AM (ver Introducción, sección *Injuria reversible por isquemia y reperfusión*, página 32), en tanto que en los corazones PLN-DM permaneció significativamente disminuido.

En la Figura 30 se muestra el curso en el tiempo del promedio de los registros de Ca^{2+} de los corazones sometidos a IR. En la Figura 30A, se puede observar que durante los primeros minutos de reperfusión luego del período de isquemia, los corazones de ratones PLN-WT sufrieron un incremento en el Ca^{2+} intracelular, tanto diastólico como sistólico, en tanto que el transitorio de Ca^{2+} disminuyó (Figura 30B). Durante el resto de



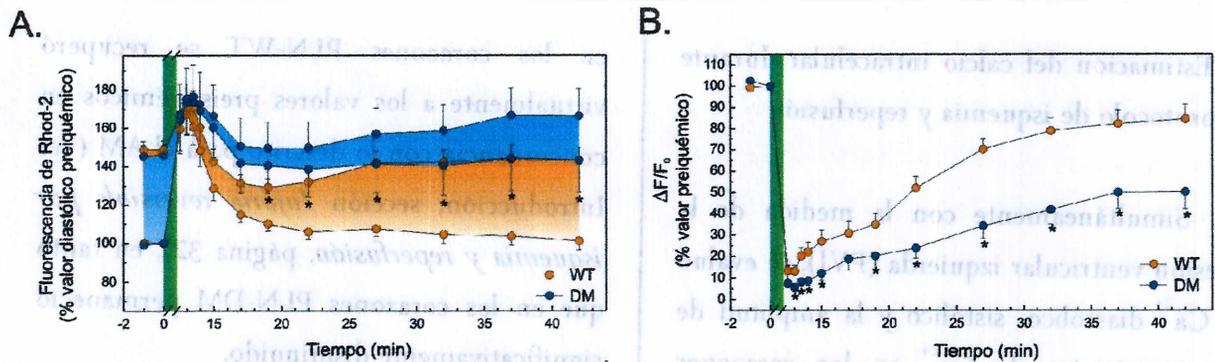


Figura 30. Curso en el tiempo de la fluorescencia de Rhod-2. (A) El Ca^{2+} sistólico aumentó durante la reperfusion y se mantuvo por encima de los niveles preisquémicos en los PLN-DM y levemente por debajo en los corazones de ratones PLN-WT. El Ca^{2+} diastólico aumentó al inicio de la reperfusion en ambas cepas. Sin embargo, en los PLN-WT retornó a los valores preisquémicos mientras que en los PLN-DM permaneció elevado. (B) La amplitud del transitorio de Ca^{2+} se recuperó en menor medida en los PLN-DM respecto de los PLN-WT. Los resultados representan el valor de la media \pm ES de corazones sometidos a IR de ratones PLN-WT ($n=13-16$) y PLN-DM ($n=17-18$), expresados como porcentaje de los valores preisquémicos. * indica $p<0,05$ PLN-DM vs PLN-WT.

la reperfusion, el Ca^{2+} diastólico, así como el sistólico y por lo tanto la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , retornaron a niveles similares al período de estabilización. Al final del período de reperfusion estudiado, la amplitud del transitorio de Ca^{2+} alcanzó valores levemente menores que los previos a la isquemia. Los valores virtualmente conservados del transitorio de Ca^{2+} al final del período de reperfusion, en asociación con la disminuida recuperacion de la PDVI de los corazones PLN-WT medida en forma simultánea, indican que la disminucion de la contractilidad (PDVI) en estos corazones se produce por una disminucion en la respuesta al Ca^{2+} de las miofibrillas, típico del corazón atontado, y de acuerdo a lo que se muestra en la Figura 19 de la Introducción del presente trabajo de Tesis.

En los corazones PLN-DM, durante los primeros minutos de la reperfusion luego de

la isquemia, se produjo un incremento en el Ca^{2+} diastólico de magnitud similar a los PLN-WT, que se recuperó sólo parcialmente y permaneció significativamente elevado respecto a los valores de la preisquemia y a los de los corazones PLN-WT, durante toda la reperfusion. Al final de la misma, el valor obtenido en los ratones PLN-WT fue de $101,0 \pm 4,8\%$ (preisquemia = 100%), en tanto que en los ratones PLN-DM, el valor del Ca^{2+} diastólico fue de $143,1 \pm 16,5\%$ a los 30 minutos de reperfusion. El Ca^{2+} sistólico también permaneció elevado durante todo el transcurso de la reperfusion, en tanto que la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} se redujo significativamente en relación a los valores previos a la isquemia, y su recuperacion al final de la reperfusion fue significativamente menor que en los corazones PLN-WT ($50,2 \pm 8,0\%$ vs. $84,6 \pm 6,7\%$, respectivamente).

Debido a que en los corazones de los ratones PLN-DM, el Ca^{2+} intracelular permanece más elevado que en los PLN-WT, y que el incremento en el Ca^{2+} intracelular, a través de la activación de calpaínas, podría ser el responsable de la degradación parcial de proteínas contráctiles que produciría la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos en el corazón atontado (Gao y col., 1997), podría esperarse que los PLN-DM, además de tener un manejo alterado del Ca^{2+} , tuvieran una disminución en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles mayor que la de los PLN-WT. Además, el mayor y prolongado aumento del Ca^{2+} intracelular en los corazones PLN-DM podría llevar a una mayor aparición de alteraciones mecánicas y arritmias que normalmente exhiben los corazones atontados, producto de la sobrecarga de Ca^{2+} (Nwasokwa, 1995; Qian y col., 2001). Para evaluar la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles se estudió:

- 1) la relación entre la PDVI y la amplitud del transitorio de Ca^{2+}
- 2) la relación entre la caída del transitorio de Ca^{2+} y de la PDVI, y
- 3) la integridad de una proteína del aparato contráctil, TnI, cuya degradación por calpaínas dependientes de Ca^{2+} , ha sido propuesta como mecanismo molecular de la menor respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles y por lo tanto del atontamiento miocárdico en roedores (Bolli y Marbán, 1999).

Además, con el objeto de estudiar los trastornos mecánicos y del ritmo provocados por la sobrecarga de Ca^{2+} luego de la isquemia, se analizó la incidencia y duración de las alteraciones mecánicas y del ritmo que ocurren durante la reperfusión postisquémica.

4. Respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos

En la Figura 31 se representa la relación entre la PDVI y la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} normalizados a los valores preisquémicos. Una mayor pendiente en esta relación, es decir, un mayor incremento en la PDVI para un dado cambio en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , indica una mayor recuperación en la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} . Debido a que en

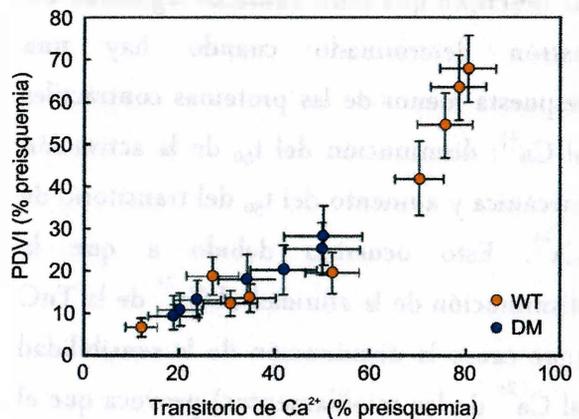


Figura 31. Estimación de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. La relación entre la PDVI y la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} , siguió un comportamiento similar en los corazones PLN-WT y PLN-DM, lo que indicaría una misma respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles entre ambos grupos. Los resultados representan el valor de la media \pm ES de corazones sometidos a IR de ratones PLN-WT (n=12-14) y PLN-DM (n=10-11), expresados como porcentaje de los valores preisquémicos.

los primeros minutos de la reperfusión, la PDVI y el Ca^{2+} intracelular sufrieron un cambio muy brusco, se estudió la relación entre estos dos parámetros a partir de los cinco minutos de la reperfusión, punto en el cual ambos comenzaron a recuperarse en forma continua. En el rango de Ca^{2+} comparable en las dos cepas de ratones, esta relación entre la recuperación contráctil y del transitorio de Ca^{2+} , siguió un comportamiento similar. Esto nos permite concluir que entre las dos cepas de ratones no hay diferencias en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles al menos, como se mencionó anteriormente, en el rango de Ca^{2+} comparable entre ambas cepas.

Adicionalmente, se analizaron los tiempos a la mitad de la relajación (t_{50}) de la PDVI y de los transitorios de Ca^{2+} , ya que se ha descrito que éstos cambian siguiendo un patrón determinado cuando hay una respuesta menor de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} : disminución del t_{50} de la activación mecánica y aumento del t_{50} del transitorio de Ca^{2+} . Esto ocurriría debido a que la disminución de la afinidad al Ca^{2+} de la TnC (que causa la disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos) provoca que el Ca^{2+} se separe más rápidamente de la TnC, lo cual determina una caída más rápida de la PDVI. El Ca^{2+} liberado no podría ser secuestrado tan rápidamente por el RS, prolongando así la caída de la concentración del mismo (Blinks y Endoh, 1986). Los valores preisquémicos de t_{50} de PDVI y Ca^{2+}

t_{50} (mseg)	WT	DM
PDVI	37,4 ± 2,1	37,7 ± 2,5
Ca^{2+}	44,8 ± 1,8	41,3 ± 1,4

no fueron significativamente distintos entre los corazones PLN-WT y PLN-DM (ver Tabla). A los 30 minutos de reperfusión, los corazones PLN-WT mostraron una disminución significativa del t_{50} en la PDVI ($-5,7 \pm 1,2$ mseg vs. preisquemia), con un concomitante aumento del t_{50} de los transitorios de Ca^{2+} ($+4,7 \pm 1,3$ mseg vs. preisquemia). Estos cambios opuestos en los tiempos de caída de la PDVI y el transitorio de Ca^{2+} son compatibles, tal como se mencionó anteriormente, con una situación de menor respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos tal como ocurre en el AM. En los corazones PLN-DM se observó un comportamiento similar, con un aumento del t_{50} de los transitorios de Ca^{2+} ($+5,7 \pm 2,1$ mseg vs. preisquemia) y una disminución del t_{50} de la PDVI ($-2,2 \pm 1,9$ mseg vs. preisquemia) aunque ésta última no alcanzó valores significativos. La falta de significación en esta diferencia podría deberse a que la misma esté enmascarada por las anomalías en el manejo del Ca^{2+} , tal como por ejemplo el Ca^{2+} diastólico aumentado a lo largo de toda la reperfusión.

Estos resultados en su conjunto apoyan la conclusión de que en ambas cepas de ratones se produciría una disminución similar en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles.

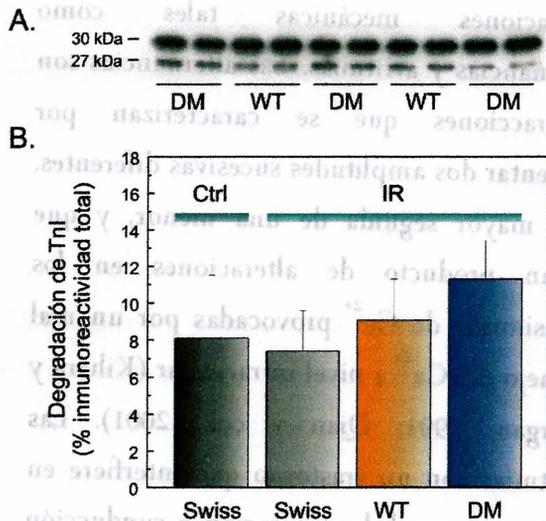


Figura 32. Degradación de Troponina I. (A) Se muestra un blot representativo de la inmunodetección de TnI intacta (banda superior) y su producto de degradación (banda inferior). (B) Los resultados promedio indican que no hubo diferencias significativas entre los grupos sometidos o no a IR, independientemente de la cepa estudiada. Los resultados representan el valor de la media \pm ES de corazones de ratones Swiss (n=6 Ctrl y 6 IR), PLN-WT (n=9) y PLN-DM (n=9), expresados como porcentaje de TnI degradada (banda de 27 kDa) respecto de la inmunoreactividad total (banda de 27 kDa + 30 kDa).

Como ya se mencionara en la Introducción y anteriormente en la sección de Resultados del presente trabajo de Tesis, la disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles que ocurre durante el AM, puede ser debida a la degradación parcial de algunas de las proteínas que conforman el aparato contráctil. El incremento en el Ca^{2+} intracelular podría activar proteasas dependientes de Ca^{2+} que clivan a otras proteínas. Entre estas proteínas sustrato se encuentra la TnI. Marbán y colaboradores demostraron, en ratones sometidos a 20 minutos de isquemia seguida

de 20 minutos de reperfusión, la degradación de TnI por calpaínas (Gao y col., 1997) y atribuyeron a esta degradación la disminución de la respuesta al Ca^{2+} típica del AM, aunque este resultado es controvertido.

En el presente trabajo de Tesis se estudió la integridad de esta proteína contráctil en los corazones de ratones PLN-WT y PLN-DM sometidos a IR. En la Figura 32A se presenta un blot representativo de la inmunoreactividad de TnI de corazones PLN-WT y PLN-DM. La banda de inmunoreactividad de 30 kDa corresponde a la TnI intacta, mientras que la de 27 kDa es la correspondiente a la TnI degradada. En el panel B de la Figura 32 se muestran en un gráfico de barras los resultados promedio de la degradación de TnI, como porcentaje de la inmunoreactividad total de TnI. Las dos primeras barras pertenecen a los resultados obtenidos con una cepa de ratones control (Swiss-Webster), sometidos al mismo protocolo de IR que los ratones PLN-WT y los PLN-DM, o perfundidos durante un tiempo igual de IR, pero sin interrupción del flujo (Ctrl). Se observa que la IR no produjo mayor degradación de la TnI que la que ocurre espontáneamente con el tiempo de perfusión. Tampoco se observó una mayor degradación en los corazones de ratones PLN-DM a pesar de la sobrecarga de Ca^{2+} sostenida a lo largo de la reperfusión.

Aunque escapa al objetivo de este trabajo, estos resultados permiten concluir que al menos en nuestras condiciones

experimentales, la degradación de TnI no puede explicar la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos en los corazones atontados, aún en los casos como el de los corazones PLN-DM con sobrecarga sostenida de Ca^{2+} . Por lo tanto la disminución de la respuesta al Ca^{2+} en estos animales podría deberse a la degradación por aumento de Ca^{2+} de proteínas diferentes de TnI, y no podrían descartarse la participación de otros mecanismos tales como el aumento de especies reactivas del oxígeno, elevación persistente de magnesio, o incluso edema intracelular, tal como lo han sugerido otros autores (Murphy y col., 1989; Bolli y Marbán, 1999; Bragadeesh y col., 2008).

En consecuencia, los datos presentados aquí sugieren que la menor contractilidad de los corazones de los ratones PLN-DM con respecto a los PLN-WT, se debería principalmente a la alteración en el manejo del Ca^{2+} que se observa en estos corazones.

Como se mencionó anteriormente, un gran número de trabajos muestran que la reperfusión postisquémica produce

alteraciones mecánicas tales como alternancias y arritmias. Las alternancias son contracciones que se caracterizan por presentar dos amplitudes sucesivas diferentes, una mayor seguida de una menor, y que serían producto de alteraciones en los transitorios de Ca^{2+} provocadas por un mal manejo del Ca^{2+} a nivel intracelular (Kihara y Morgan, 1991; Qian y col., 2001). Las arritmias son un trastorno que interfiere en el ritmo normal de generación o conducción de los impulsos eléctricos (Cranefield y col., 1973; Berlin y col., 1989).

Tanto en los corazones de los ratones PLN-WT como en los de los PLN-DM, se produjeron períodos de arritmias y alternancias mecánicas, seguidos de períodos con contracciones regulares y normales.

En la Figura 33A se muestra un ejemplo de arritmias registradas en los corazones PLN-DM, tanto en la señal de fluorescencia de Rhod-2 (Ca^{2+} intracelular), como en la presión intraventricular. En la Figura 33B se muestra una secuencia de alternancias registradas durante la reperfusión temprana

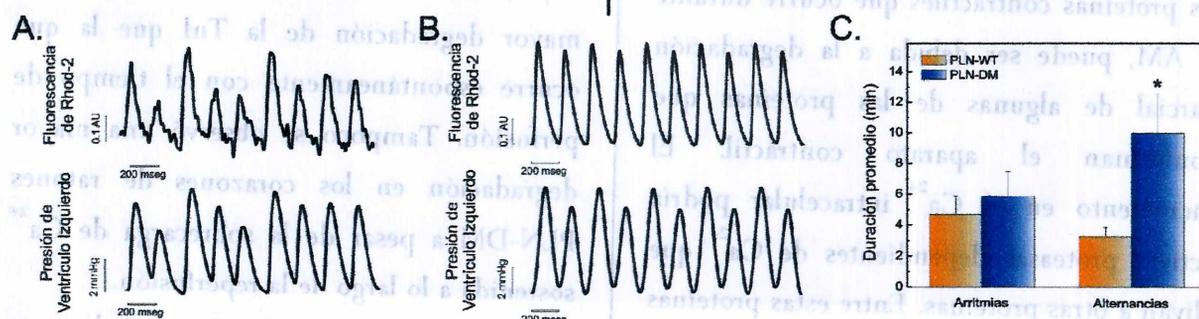


Figura 33. Registros típicos de alteraciones en la fluorescencia de Rhod-2 y presión ventricular izquierda durante la reperfusión. Registros de arritmias (A) y alternancias (B) en corazones PLN-DM. La duración promedio de las alteraciones (C) sólo fue significativamente mayor en las alternancias de los corazones PLN-DM (n=13-15) respecto a los de PLN-WT (n=11-13). Los resultados representan el valor de la media \pm ES. * indica $p < 0,05$ PLN-DM vs PLN-WT.

en corazones PLN-DM. En este registro se observa que cada transitorio de Ca^{2+} es seguido de otro de menor amplitud, y cada uno de éstos concuerda con un patrón similar registrado en la presión intraventricular. Para comparar el grado o extensión de los períodos de alternancias y arritmias entre los dos grupos estudiados, se analizó la incidencia de aparición así como la duración de estos fenómenos durante la reperfusión. La incidencia en la aparición de arritmias no fue significativamente diferente entre los dos grupos (73% vs 72%, en PLN-WT y PLN-DM respectivamente), así como tampoco lo fue la extensión de las mismas, es decir el período de tiempo que duraron los períodos de arritmias durante la reperfusión ($4,7 \pm 1,2$ vs. $5,9 \pm 1,2$ minutos, en PLN-WT y PLN-DM, respectivamente). Del mismo

modo que las arritmias, los períodos de alternancias tuvieron una incidencia similar en ambos grupos, sin embargo en el caso de esta alteración, la duración se extendió durante un período significativamente más prolongado en los corazones PLN-DM respecto de los PLN-WT ($10,0 \pm 2,6$ vs $3,2 \pm 0,6$ min, respectivamente). En la Figura 33C se muestran los resultados promedio de la duración de los períodos de arritmias y alternancias en ambas cepas.

Estos resultados indican que los corazones de ratones PLN-DM son igualmente propensos que los PLN-WT a sufrir alternancias mecánicas y arritmias. Sin embargo, en el caso de las alternancias mecánicas, una vez iniciadas, éstas persisten por más tiempo en los corazones PLN-DM respecto a los PLN-WT.

En resumen, los resultados obtenidos en los estudios realizados con los corazones de los ratones transgénicos indican que:

1) la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN por CaMKII es fundamental para la recuperación del transitorio de Ca^{2+} durante la reperfusión y por ende de la contractilidad.

2) la menor contractilidad que presentaron los corazones PLN-DM con respecto a los PLN-WT se debería fundamentalmente a la alteración en el manejo del Ca^{2+} ya que la disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles en los corazones atontados de ratones PLN-WT y PLN-DM no fue diferente entre sí.

3) La disminución en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos no puede ser explicada por la degradación de TnI en nuestras condiciones experimentales.

4) la falta del sitio fosforilable Thr¹⁷ en los corazones PLN-DM y su consecuencia, el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, no influyen sobre la predisposición a sufrir alternancias mecánicas y arritmias respecto a los corazones PLN-WT. Sin embargo, la sustitución de este residuo por uno no fosforilable, induce a una mayor duración de las alternancias mecánicas una vez iniciadas.

II. Injuria Irreversible en Corazones Perfundidos de Ratas

Los resultados presentados en la primera sección de este trabajo de tesis permiten sugerir un rol beneficioso de CaMKII en la injuria reversible en el AM. La importancia de la fosforilación de Thr¹⁷ de PLN que demostramos, indicaría que la activación de la CaMKII durante los primeros minutos de reperfusión permite un mejor manejo del Ca²⁺ intracelular, con preservación del transitorio de Ca²⁺ evitando una mayor depresión de la contractilidad y disminuyendo la perpetuación de las alternancias mecánicas.

Para determinar cuál sería el rol de la CaMKII en la *injuria irreversible* inducida por IR, se realizaron experimentos en los que se evaluó la muerte por necrosis y apoptosis en corazones aislados de rata sometidos a IR, con y sin inhibición de CaMKII.

1. Fosforilación de fosfolamban en la injuria irreversible por IR

En una primera serie de experimentos se exploró si en la reperfusión luego de un período de isquemia prolongado se producía la activación de la CaMKII, como se observó en el AM (Vittone y col., 2002; Said y col., 2003). Para evaluar la actividad de CaMKII se realizó la medida del curso en el tiempo de la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN. La

Figura 34 muestra los resultados de estos experimentos.

La fosforilación de Ser¹⁶ de PLN aumentó levemente alcanzando valores significativos a los 3 minutos de reperfusión. La fosforilación de Thr¹⁷ de PLN aumentó significativamente a los 3 minutos de reperfusión y luego disminuyó a los valores controles durante el transcurso de la misma, con un perfil similar al que ocurrió en los experimentos mostrados anteriormente,

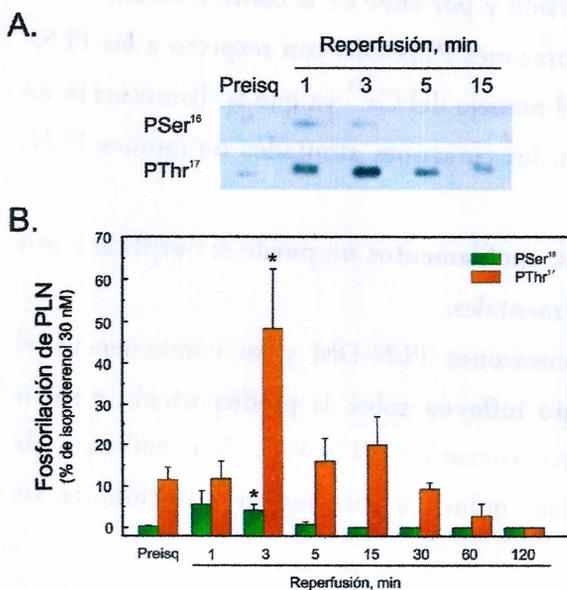


Figura 34. Curso en el tiempo de la fosforilación de los residuos de PLN de corazones de rata sometidos a isquemia prolongada y reperfusión. En (A) se muestran blots representativos de las fosforilaciones de los dos residuos fosforilables de PLN a diferentes tiempos de reperfusión luego de 45 minutos de isquemia comparados con la preisquemia (Preisq): 1, 3, 5 y 15 minutos de reperfusión. En el gráfico de barras (B) se muestran los resultados promedio de fosforilación. El nivel de fosforilación de Ser¹⁶ aumentó levemente alcanzando valores significativos a los 3 minutos de reperfusión. La fosforilación de Thr¹⁷ mostró un mayor aumento significativo a los 3 minutos de reperfusión. Los resultados representan la media \pm ES, expresados como porcentaje de la máxima fosforilación inducida por isoproterenol 30 nM en corazones no isquémicos (n=3-11). *p<0,05 respecto a Preisq.

luego de una isquemia breve. Estos resultados confirman que CaMKII también se activa durante los primeros minutos de reperfusión luego de una isquemia prolongada en el corazón de rata.

2. Actividad mecánica durante el protocolo de isquemia y reperfusión en corazones de rata

Cuando se interrumpió el flujo coronario en los corazones, la contractilidad disminuyó gradualmente hasta valores no detectables. La Figura 35 muestra el registro típico de la PVI medida con un balón intraventricular durante el protocolo de IR.

Hacia los veinte minutos de isquemia, la PFD comenzó a incrementar y luego se mantuvo elevada durante todo el período restante de isquemia. Con la reperfusión, la PFD volvió a aumentar y permaneció elevada durante todo el transcurso de la misma. La

contractilidad se recuperó levemente durante el período de reperfusión, alcanzando a las 2 horas valores muy inferiores respecto a los alcanzados luego de isquemias breves [presentes resultados en ratones y experimentos previos en ratas (Said y col., 2003)].

Con el objeto de explorar el rol de la activación de CaMKII durante la reperfusión luego de una isquemia prolongada, se realizaron experimentos en los que los corazones aislados de rata fueron sometidos al protocolo de IR, en ausencia y presencia del inhibidor de CaMKII, KN-93 (2,5 μ M).

La Figura 36 muestra los resultados promedio de estos experimentos. Se observa que la recuperación contráctil (LVDP y $+dP/dt_{m\acute{a}x}$) hacia el final del período de reperfusión fue significativamente mayor cuando el protocolo de IR se realizó con inhibición de CaMKII (LVDP, $3,6\pm 0,6$ vs. $13,8\pm 4,1$ mmHg respectivamente).

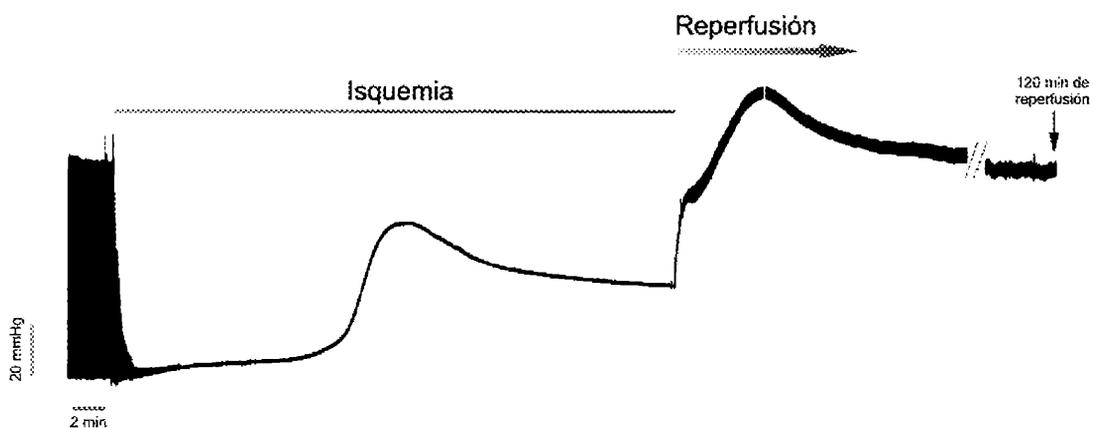


Figura 35. Registro típico de la presión ventricular izquierda en corazones aislados perfundidos de rata durante el protocolo de isquemia prolongada y reperfusión. En los registros continuos se observa que la isquemia redujo la contractilidad hasta valores no detectables. Durante la isquemia se produjo un aumento de la PFD, que se estabilizó durante el resto de la isquemia, y se acentuó aún más al comienzo de la reperfusión y luego se recuperó parcialmente. La contractilidad se recuperó muy poco a lo largo de la reperfusión.

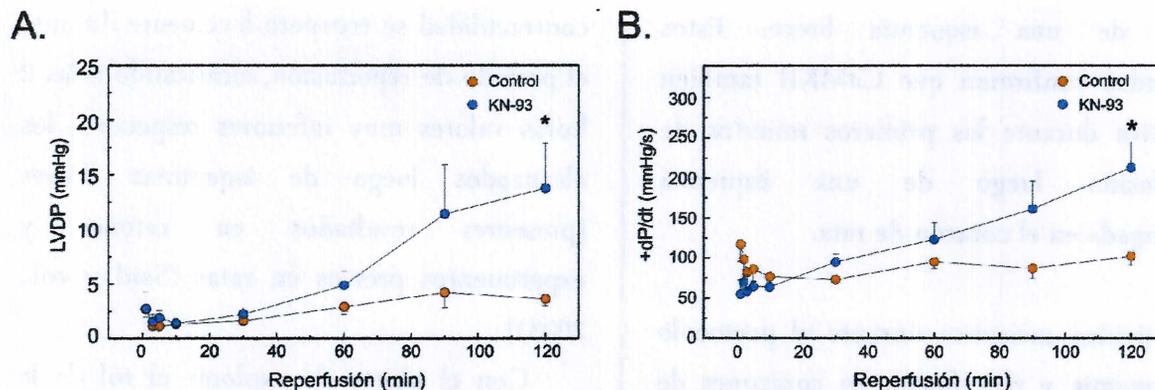


Figura 36 Resultados promedio del curso en el tiempo de la contractilidad de corazones de rata sometidos a isquemia prolongada y reperusión. La recuperación de la PDVI y la dP/dt_{max} luego de 120 minutos de reperusión en los corazones con CaMKII inhibida fue mayor respecto a los corazones sometidos a IR en ausencia de KN-93. Los resultados representan el valor de la media \pm ES de corazones sometidos a IR ($n=4$ en cada condición experimental). * indica $p<0,05$ respecto de la preisquemia.

Estos resultados sugerirían un efecto deletéreo de la activación de la CaMKII en la injuria irreversible por IR, opuesto al descrito en el AM.

3. Tamaño de infarto

La menor recuperación contráctil de los corazones sometidos a isquemias prolongadas se debe a la instauración de un daño

irreversible en el tejido cardíaco. Esta injuria tiene un componente de muerte celular por necrosis y otro por apoptosis (Gottlieb y col., 1994; Kajstura y col., 1996; Freude y col., 2000). Para evaluar la posible participación de esta quinasa en la muerte celular inducida por isquemias largas, se determinó el tamaño del infarto luego de dos horas de reperusión posteriores a 45 minutos de isquemia, con y sin inhibición de CaMKII (KN-93 2,5 μ M).

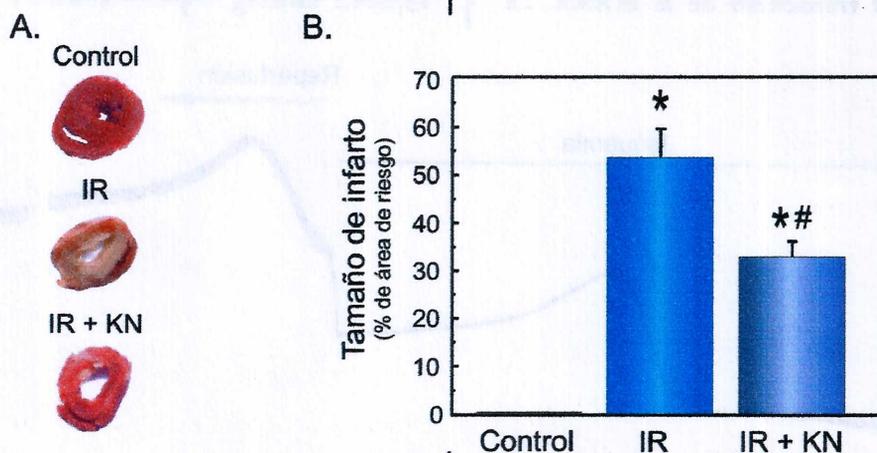


Figura 37. Tinción representativa de TTC en corazones control y sometidos a IR, en presencia y ausencia de inhibición de CaMKII. (A) Cortes representativos de tres corazones tenidos con TTC luego de 3 horas de perfusión sin isquemia (control), 45 minutos de isquemia y 120 de reperusión en ausencia de KN-93 (IR) y en presencia de KN-93 (IR+KN). (B) En barras se muestran los resultados promedio del tamaño de infarto. Los resultados representan el valor de la media \pm ES, expresados como porcentaje del área total de riesgo ($n=4$ en cada condición experimental). * indica $p<0,05$ respecto de control, # indica $p<0,05$ respecto de IR.

En la Figura 37A se muestran cortes de corazones teñidos con el colorante TTC (ver materiales y métodos), en un corazón control (sin isquemia y perfundido durante 3 horas, tiempo que dura el protocolo de IR), y en corazones sujetos a IR en ausencia y presencia de KN-93. En los corazones controles se observó que no hubo áreas de infarto visibles. En los corazones IR tratados con KN-93, el tamaño del infarto (área blanca) disminuyó respecto al área de infarto que presentaron los corazones sometidos a IR en ausencia de inhibición de CaMKII. Los resultados totales (Figura 37B) indican que en los corazones IR el área infartada alcanzó un valor de $55,3 \pm 8,1$ % del área de riesgo (área total, es decir: área blanca + teñida de rojo). La inhibición de CaMKII redujo el tamaño del infarto a $33,0 \pm 3,2$ %.

4. Liberación de LDH

Para evaluar el grado de necrosis, se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) presente en el efluente de corazones perfundidos sometidos a isquemias de 45 minutos. Esta enzima se libera al líquido intersticial cuando la célula sufre un proceso de ruptura de la membrana y por lo tanto muerte por necrosis. La actividad de LDH se determinó en el líquido recolectado durante los 10 primeros minutos de reperfusion postisquémica. La Figura 38 muestra que la liberación de LDH disminuyó aproximadamente un 57% en los corazones

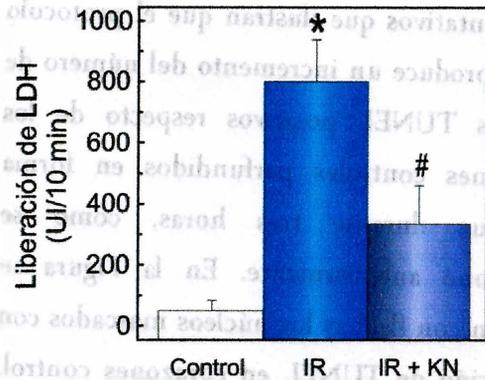


Figura 38. Medida de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa en el perfusato de corazones perfundidos de rata. La liberación de LDH en corazones sometidos a 45 minutos de isquemia y 120 de reperfusion (IR, n=10) fue significativamente mayor que en los corazones perfundidos sin isquemia (control, n=9). La inhibición de CaMKII con KN-93 (IR+KN, n=5) disminuyó significativamente la liberación de LDH. Los resultados representan el valor de la media \pm ES, expresados como unidades internacionales en el perfusato de 10 minutos de reperfusion. * indica $p < 0,05$ respecto de control, # indica $p < 0,05$ respecto de IR.

que fueron perfundidos en presencia de KN-93, respecto a los corazones sometidos a IR en ausencia de inhibición de CaMKII. Estos resultados indican que la inhibición de CaMKII disminuye el grado de necrosis en corazones perfundidos

5. Apoptosis

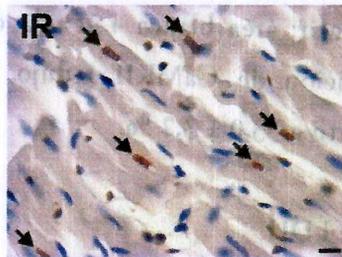
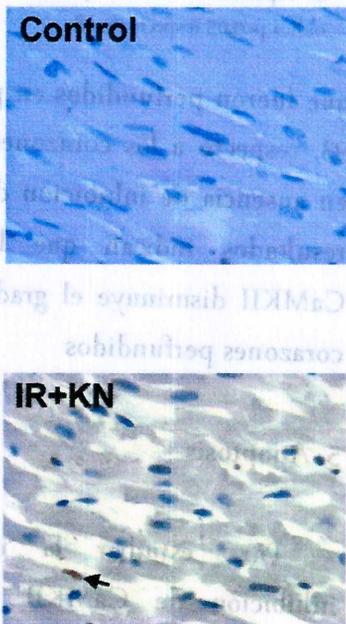
Para estudiar la influencia de la inhibición de CaMKII en el grado de apoptosis provocado por IR, se realizó la tinción de TUNEL para marcar los núcleos de las células apoptóticas en cortes de corazones sometidos a IR en presencia o ausencia de KN-93 (ver Materiales y métodos). La Figura 39A muestra ejemplos

representativos que ilustran que el protocolo de IR produce un incremento del número de núcleos TUNEL positivos respecto de los corazones controles perfundidos en forma continua durante tres horas, como se mencionó anteriormente. En la Figura se indican con flechas los núcleos marcados con la tinción de TUNEL en corazones control, con IR, y con IR en presencia del inhibidor KN-93. En los corazones perfundidos con KN-93, se puede observar que la inhibición de CaMKII redujo significativamente el número de núcleos TUNEL positivos. La Figura 39B muestra el resultado promedio

del total de los experimentos.

Dado que la activación de caspasas es un paso fundamental en los mecanismos moleculares de la apoptosis, se estimó también la actividad de caspasa-3 que es uno de los efectores al cual convergen las cascadas apoptóticas tal como fue descrito en la Introducción. Esta proteasa se encuentra en el citosol principalmente en su forma inactiva de 32 kDa de peso molecular (procaspasa-3). Ante un estímulo apoptótico, ésta es clivada generando un fragmento de 17 kDa que posee actividad catalítica (caspasa-3 activa). Por Western blot se cuantificó el

A.



B.

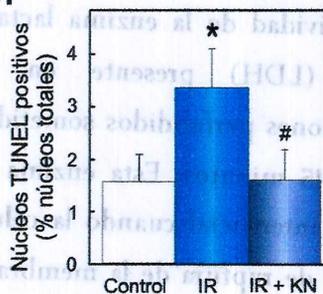


Figura 39. Tinción TUNEL de cortes de corazones perfundidos de rata. (A) El número de núcleos positivos para la tinción de TUNEL aumentó significativamente en los corazones sometidos a 45 minutos de isquemia y 120 de reperusión (IR) respecto a los corazones perfundidos sin isquemia (control). La inhibición de CaMKII con 2,5 μ M KN-93 (IR+KN) disminuyó significativamente el número de núcleos TUNEL positivos. La barra de calibración indica 10 μ m (B) En barras se muestran los resultados promedio del número de núcleos TUNEL positivos. Los resultados representan el valor de la media \pm ES, expresados como porcentaje de núcleos TUNEL positivos respecto a número total de núcleos (n= 3-7 por condición experimental). * indica $p < 0,05$ respecto de control, # indica $p < 0,05$ respecto de IR.

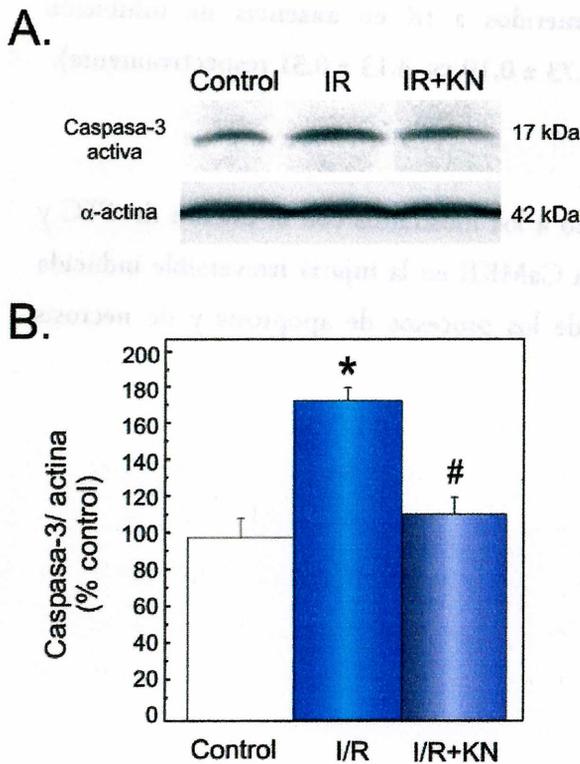


Figura 40. Actividad de Caspasa-3. (A) Blot representativo de la detección inmunológica de caspasa-3 activa y de α -actina. Los corazones sometidos a IR mostraron un aumento de la actividad de caspasa-3 respecto a los corazones control. El protocolo de IR realizado en presencia de KN-93 previno la activación de esta caspasa. (B) Los resultados promedio muestran que la inhibición de CaMKII con KN-93 disminuyó la activación de caspasa-3. Los resultados representan el valor de la media \pm ES, expresados como porcentaje del control normalizados por actina (n= 4-5 en las diferentes condiciones experimentales). * indica $p < 0,05$ respecto de control, # indica $p < 0,05$ respecto de IR.

fragmento de 17 kDa con un anticuerpo específico para la forma clivada, lo que permite estimar la activación de caspasa-3. En la Figura 40A se puede observar un blot representativo de la detección inmunológica de caspasa-3 activa. El protocolo de IR aumentó significativamente la cantidad de caspasa-3 clivada, indicando una activación de los mecanismos apoptóticos. El tratamiento de los corazones perfundidos

sometidos a IR con KN-93 redujo dicha actividad. En el panel inferior (Figura 40B) se muestra el promedio de todos los experimentos. Como puede observarse, la inhibición de CaMKII produjo una disminución significativa de la actividad de caspasa-3 inducida por IR.

Como se mencionó en la introducción, la familia de proteínas Bcl-2 constituye un punto de control en la apoptosis. Esta familia posee tanto proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xs, Bik, Bim, Hrk), como antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1). La relación entre proteínas anti- y proapoptóticas, tal como Bcl-2/Bax, determina la respuesta a una señal de muerte. Cuando ésta disminuye, es indicativo de activación del proceso de apoptosis, y en forma recíproca, si esta relación aumenta se considera que el tejido tiene una menor sensibilidad a la apoptosis.



Figura 41. Expresión de Bcl-2 y Bax. Blot representativo de la detección inmunológica de Bcl-2 y Bax. El tratamiento con KN-93 aumentó la relación Bcl-2/Bax, lo que indicaría una disminución en la sensibilidad a la apoptosis.

En la Figura 41 se muestra un blot representativo de la relación Bcl-2/Bax para corazones perfundidos y sometidos a IR, en ausencia y presencia de KN-93. Cuando se realizó la IR en los corazones tratados con

KN-93, se observó que esta relación aumentó significativamente respecto de los corazones

sometidos a IR en ausencia de inhibición ($1,73 \pm 0,19$ vs. $3,13 \pm 0,51$ respectivamente).

Estos resultados del estudio de la apoptosis, junto a los mostrados con la tinción de TTC y liberación de LDH, sugieren un efecto deletéreo de la CaMKII en la injuria irreversible inducida por IR, e indican que CaMKII es una mediadora de los procesos de apoptosis y de necrosis iniciados por IR.

Discusión

La disminución en la respuesta contráctil luego de un período de isquemia breve se denomina atontamiento miocárdico (AM). Este tiempo de isquemia ha de ser lo suficientemente corto como para no producir la muerte de los cardiomiocitos. Es por ello que se considera al AM como una alteración o *injuria reversible*. Si el tiempo de isquemia se prolonga lo suficiente, sobreviene la *injuria irreversible* (corazón infartado), es decir una disfunción contráctil que persiste en el tiempo. Este daño irreversible ocurre por la muerte celular provocada por el desarrollo de procesos de necrosis y apoptosis (Kajstura y col., 1996; Yaoita y col., 1998).

Los resultados expuestos en este trabajo de Tesis nos permiten concluir un rol dual de la CaMKII en la injuria por isquemia y reperfusión (IR). Este papel de la CaMKII, beneficioso o deletéreo, depende de la duración de la isquemia. La actividad de la CaMKII, a través de la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN, sería beneficiosa y contribuiría a la recuperación del Ca²⁺ intracelular en el caso que la IR genere AM. En isquemias más largas, la participación sería deletérea, y en parte responsable de los fenómenos de necrosis y apoptosis típicos de la injuria irreversible por IR.

I. Injuria reversible en corazones de ratones sometidos a isquemias breves

Como hipótesis del trabajo, se propuso que la presencia de los residuos fosforilables de PLN, específicamente la fosforilación dependiente de CaMKII en el residuo Thr¹⁷ de PLN, era necesaria para la recuperación del transitorio de Ca²⁺ luego de la isquemia, y su ausencia generaría una alteración en el mismo y/o provocaría una sobrecarga de Ca²⁺ intracelular, con dos posibles consecuencias: una mayor alteración de la respuesta al Ca²⁺ de las proteínas contráctiles, y un aumento en las alteraciones mecánicas y del ritmo, típicas de la sobrecarga y mal manejo de Ca²⁺ (Nwasokwa, 1995; Qian y col., 2001). Esta hipótesis se basó en experimentos previos de nuestro laboratorio

en los que se demostró que la CaMKII era necesaria para la recuperación mecánica del corazón atontado, y que el efecto de la CaMKII aparecía mediado exclusivamente por la fosforilación del sitio Thr¹⁷ de PLN (Said y col., 2003). Sin embargo, estos experimentos no permitieron dilucidar si este efecto sobre la contractilidad era mediado por una recuperación del transitorio de Ca²⁺.

Independientemente de la duración de la isquemia (12 y 20 min) y de la especie (ratón y rata), se observó que durante los primeros instantes de la reperfusión, ocurre la fosforilación dependiente de CaMKII del residuo Thr¹⁷ de PLN en concordancia con lo descrito previamente en nuestro

laboratorio (Vittone y col., 2002; Said y col., 2003).

En el AM la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN precedió a una virtualmente completa recuperación del Ca²⁺ diastólico y sistólico intracelular hacia los valores preisquémicos hacia el final de los 30 minutos de reperfusión. Por el contrario, cuando el mismo protocolo se realizó en corazones de ratones con PLN mutante (residuos Ser¹⁶ y Thr¹⁷ mutados por Ala, residuo no fosforilable), la recuperación de la contractilidad y del transitorio de Ca²⁺ fue significativamente más baja que en los corazones de ratones PLN-WT. Los presentes resultados proveen evidencia que indica que la activación de la CaMKII y la consecuente fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN son fundamentales para la recuperación del transitorio de Ca²⁺. En línea con estos resultados, en experimentos previos en los cuales se inhibió CaMKII con KN-93 en corazones de ratas sometidos a isquemias breves, se observó que la recuperación contráctil fue significativamente menor que en ausencia del inhibidor (Said y col., 2003). Nuestros resultados no pudieron mostrar ninguna diferencia en la respuesta al Ca²⁺ de los miofilamentos entre los corazones de los ratones PLN-WT y PLN-DM, tal como había sido hipotetizado. En cambio, los resultados demostraron que la presencia de los residuos fosforilables de PLN es importante para reducir la extensión de los períodos de

alternancias mecánicas, una de las consecuencias de la sobrecarga de Ca²⁺.

1.- Evaluación del Ca²⁺ intracelular -

Para evaluar el Ca²⁺ intracelular se utilizó una novedosa técnica que permite la detección simultánea de la presión intraventricular y del transitorio de Ca²⁺ a nivel celular en el corazón entero perfundido. La medida de las señales de Ca²⁺ cuando las células se encuentran formando parte del tejido nos brinda una gran información de la función del órgano, a diferencia de las medidas que generalmente se realizan en miocitos aislados. El registro de Ca²⁺ en el corazón intacto latiendo, generalmente ha hecho uso de la espectroscopía fluorescente (Del Nido y col., 1998). Sin embargo, un obstáculo generalmente asociado con las técnicas que emplean la fluorescencia, son los artefactos de movimiento generados por la contracción cardíaca. Para minimizar los efectos provocados por el movimiento del corazón sobre la señal de la fluorescencia, estudios previos han trabajado con corazones inmovilizados mecánicamente (Brandes y col., 1992; Girouard y col., 1996) o químicamente (Kaneko y col., 2000). No obstante, en estos estudios, las largas distancias ópticas utilizadas, limitaban la resolución espacial. Para solucionar este problema se comenzaron a utilizar las medidas de epifluorescencia realizadas con fibras ópticas (Neunlist y col., 1992). Los problemas frecuentes con estas

técnicas son la relación entre la señal de interés y el ruido de fondo. Se conoce como señal a todo estímulo que lleva una información significativa para construir un mensaje y como ruido a cualquier otro estímulo que acompaña a la señal dificultando la adecuada transmisión, almacenamiento y comprensión de la misma. Se pretende que esta relación entre la señal y el ruido sea lo más elevada posible. Otro de los problemas frecuentes al utilizar indicadores fluorescentes es el *photobleach*. Para los indicadores fluorescentes, por *photobleach* se entiende la disminución de la emisión de fluorescencia por la degradación progresiva del indicador debido a la exposición a la luz.

En el presente trabajo se empleó una forma novedosa de mejorar la relación señal/ruido. Para ello, se utilizó una técnica denominada fluorescencia de campo local pulsado, en la que se usa un láser con pulsos de luz de muy corta duración, que permite iluminar con picos de alta potencia que aumentan la relación señal/ruido. Para disminuir el *photobleach* se adaptó un obturador en el camino del haz de luz emitido desde el corazón entre la fibra óptica y los lentes filtro. El obturador sólo se abrió a ciertos tiempos preestablecidos para minimizar el tiempo de exposición de la luz del láser al indicador fluorescente. En conjunto, esta metodología basada en la técnica presentada por Mejía-Alvarez y colaboradores (Mejía-Alvarez y col., 2003),

tiene una relación señal/ruido mejorada junto a un menor *photobleach* del indicador fluorescente.

Una de las limitaciones de este trabajo fue que el Ca^{2+} intracelular sólo se evaluó a nivel del epicardio, dado que la fibra óptica fue colocada en contacto con la superficie exterior del corazón. Existen trabajos que reportan diferencias en los transitorios de Ca^{2+} entre el epicardio y el endocardio, y sugieren que éstas pueden deberse a la heterogeneidad transmural de los mecanismos encargados del proceso de acoplamiento excitación-contracción (Laurita y col., 2003). La concordancia temporal que existe entre los parámetros mecánicos y las medidas de Ca^{2+} intracelular permiten sugerir que estas diferencias no afectan significativamente las conclusiones de este trabajo. Sería interesante sin embargo, para comprobar esa idea, la realización de experimentos en los cuales se mida simultáneamente el transitorio de Ca^{2+} en endocardio y epicardio, junto con la medida de la presión ventricular, para evaluar posibles diferencias en el manejo del Ca^{2+} intracelular en respuesta a la IR, entre las zonas más internas y las más externas de la pared miocárdica.

Los resultados del registro del Ca^{2+} intracelular obtenidos en los corazones de ratones indican que la reperfusión genera un dramático incremento en el Ca^{2+} diastólico que gradualmente regresa hacia los valores preisquémicos luego de aproximadamente 10

minutos de reperfusión en los corazones de ratones PLN-WT. La amplitud de los transitorios de Ca^{2+} , que inicialmente se encuentra deprimida, también se recupera lentamente durante la reperfusión alcanzando valores similares a los de la preisquemia hacia el final del período de reperfusión estudiado. En concordancia con resultados previos, los resultados de este trabajo de Tesis indican que en los corazones de ratones PLN-WT, la disponibilidad del Ca^{2+} como activador no es la causa primaria de la disfunción contráctil en el corazón atontado, al menos en roedores (Gao y col., 1995; Meissner y Morgan, 1995). Por otra parte, los corazones de ratones PLN-DM sufren un incremento de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión, que a diferencia de los PLN-WT, se mantiene en valores significativamente mayores que los preisquémicos a lo largo de todo el período estudiado de reperfusión. El Ca^{2+} diastólico elevado en los corazones PLN-DM podría ser el resultado de una menor retoma de Ca^{2+} por el RS debido a la ausencia de los sitios de fosforilación de PLN, fundamentalmente el sitio Thr¹⁷ de PLN, dependiente de CaMKII, que es el que se ha demostrado que se fosforila en la reperfusión. Como consecuencia de esto, la liberación de Ca^{2+} por el RS se vería comprometida debido a una menor carga de Ca^{2+} del RS. Esta interpretación podría explicar que la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en los corazones PLN-DM resulte significativamente menor que en los PLN-

WT. Estos resultados indican que la disminución en la amplitud del transitorio del Ca^{2+} intracelular es un componente principal en la alteración contráctil de los corazones PLN-DM "atontados".

2.- Respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos -

El protocolo de IR en los corazones PLN-WT, provocó una importante disminución en la contractilidad luego de 12 minutos de isquemia global seguida de 30 minutos de reperfusión. Por otro lado, la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} disminuyó significativamente durante el inicio de la reperfusión, pero sin embargo se recuperó gradualmente a lo largo del período de reperfusión hasta prácticamente alcanzar, a los 30 minutos de reperfusión, los valores preisquémicos. Así mismo, los valores de Ca^{2+} diastólico retornaron al valor de la preisquemia. De acuerdo a resultados previos obtenidos en ratas, hurones, cerdos y chanchillos de la India (Hofmann y col., 1993; Gao y col., 1995; Meissner y Morgan, 1995; Louch y col., 2002; Vittone y col., 2002), estos resultados indican que la disminución de la contractilidad en estos ratones es debida principalmente a una menor respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, siendo mínima o transitoria la contribución de la alteración del Ca^{2+} intracelular. Entre los mecanismos posibles involucrados en la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos se

encuentra la degradación proteolítica dependiente de Ca^{2+} de las proteínas contráctiles (Bolli y Marbán, 1999). En este trabajo propusimos como hipótesis que la disminución de la respuesta al Ca^{2+} en los corazones PLN-DM debería ser mayor que la de los ratones PLN-WT, debido a la elevación sostenida del Ca^{2+} intracelular que presentan los corazones PLN-DM durante toda la reperusión. Sin embargo, nuestros resultados no pudieron detectar una diferencia significativa en la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos entre las dos cepas de ratones transgénicos. Adicionalmente, la degradación de TnI en los dos grupos fue similar, e incluso no difirieron significativamente de los corazones controles sometidos o no a IR. Estos resultados indicarían que 1) la sobrecarga de Ca^{2+} sostenida en los corazones PLN-DM no fue suficiente como para comprometer aún más la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles respecto de los corazones PLN-WT o bien que el aumento de Ca^{2+} intracelular no es la causa de la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles. Entre otros mecanismos posiblemente responsables se pueden mencionar la producción de radicales libres, elevación persistente del magnesio intracelular o incluso edema (Murphy y col., 1989; Bolli y Marbán, 1999); 2) la degradación de TnI no es la causa de la disminución la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles durante el AM, al

menos en las condiciones experimentales que se utilizaron en el presente trabajo. La degradación de otras proteínas contráctiles tales como Tm, actina, miosina y TnT, así como estructurales como desmina o espectrina, podrían tener un importante rol en la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles típica de los corazones atontados (Matsumura y col., 1993; Atsma y col., 1995; Hein y col., 1995).

3.- Alteraciones mecánicas -

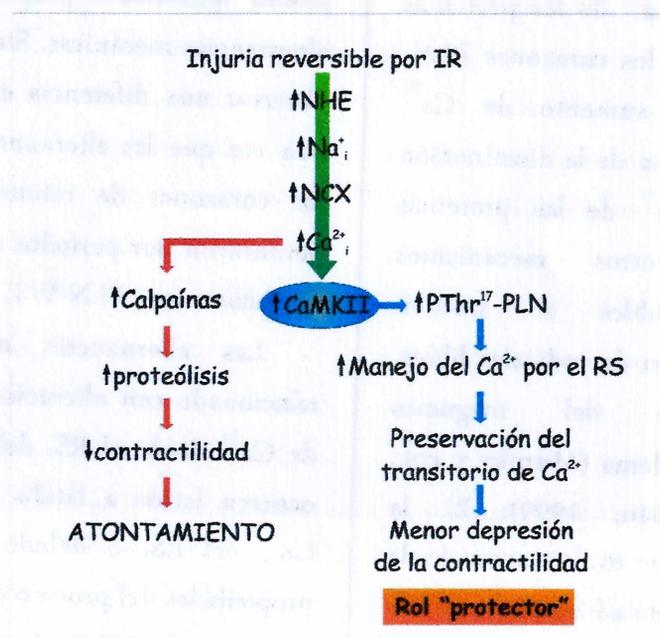
Las alternancias mecánicas son alteraciones que se manifiestan no sólo en la insuficiencia cardíaca, sino también en la isquemia y acidosis (Kihara y Morgan, 1991; Orchard y col., 1991; Nwasokwa, 1995; Qian y col., 2001). En nuestras condiciones experimentales, los corazones de los dos grupos estudiados (PLN-WT y PLN-DM) fueron igualmente propensos a desarrollar alternancias mecánicas. Sin embargo, se pudo observar una diferencia entre las dos cepas: una vez que las alternancias se iniciaron en los corazones de ratones PLN-DM, éstas perduraron por períodos más largos respecto a los corazones PLN-WT.

Las alternancias mecánicas se han relacionado con alteraciones en la liberación de Ca^{2+} desde el RS, debido a cambios que ocurren latido a latido en el contenido de Ca^{2+} del RS, o debido a cambios en las propiedades del proceso de liberación de Ca^{2+} (Diaz y col., 2004). A pesar de que en este

trabajo no se exploró este punto, es razonable especular que la inhibición crónica de la SERCA2a en los corazones PLN-DM, debido a la imposibilidad que tiene PLN de fosforilarse, sea la base de la predisposición que poseen estos corazones, con PLN mutada, a perpetuar las alternancias mecánicas una vez que éstas han comenzado. Esta tendencia de los corazones PLN-DM a perpetuar los periodos de anomalías mecánicas, junto con el incremento en el nivel de Ca^{2+} diastólico y sistólico, indica que estos corazones son menos tolerantes a la sobrecarga de Ca^{2+} respecto de los PLN-WT.

Los resultados del presente trabajo de Tesis indican que el aumento de la fosforilación de Thr¹⁷, al inicio de la reperfusión en los corazones PLN-WT, es un factor crucial en la consiguiente recuperación del manejo del Ca^{2+} y en la función contráctil del corazón atontado. Este deterioro en la

recuperación del Ca^{2+} que presentan los animales transgénicos, que no poseen los sitios fosforilables de PLN, destaca el rol de estos sitios de fosforilación cuando están presentes. En la misma línea de nuestro trabajo, un estudio realizado en un modelo celular de injuria por IR (Abdallah y col., 2005), enfatizó el importante papel de la fosforilación de PLN durante el período de reperfusión, en particular durante la fase temprana de la misma que es la crítica para la recuperación. En este trabajo se demuestra que la fosforilación dependiente de guanidilmonofosfato cíclico (GMPc) del sitio Ser¹⁶ de PLN, producida por la administración de agonistas de la PKG durante la reoxigenación luego de un período de isquemia simulada, tiene un rol protector contra la injuria por reoxigenación en miocitos aislados. El incremento en la actividad de SERCA2a debido a la



fosforilación de PLN colaboraría a la rápida remoción del exceso de Ca^{2+} en el citosol, favoreciendo así al ciclado de Ca^{2+} y reduciendo el incremento de las oscilaciones de Ca^{2+} . Esto se traduciría en una reducción de la hipercontractura de los miocitos durante el comienzo de la reperfusión.

Estos resultados en su conjunto, nos permiten sugerir una cascada de eventos que indican un rol protector de la CaMKII en la injuria reversible por IR. Los primeros pasos de esta cascada de señales intracelulares serían similares a los sugeridos para explicar la sobrecarga de Ca^{2+} que ocurre al comienzo

de la reperfusión y la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles atribuida a dicha sobrecarga, ya descrita en la página 34 (Grinwald y Brosnahan, 1987; Kitakaze y col., 1988). El aumento de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión provocaría un aumento de la actividad de CaMKII, responsable del incremento de la fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN. La fosforilación de este residuo mejoraría el manejo del Ca^{2+} intracelular, lo que permitiría a la célula preservar el transitorio de Ca^{2+} y así evitar una mayor depresión contráctil del corazón atontado.

II. Injuria irreversible en corazones de rata sometidos a isquemias prolongadas

Los experimentos realizados en corazones de rata Wistar sometidos a isquemia prolongada, mostraron que la inhibición de CaMKII provoca una mejor recuperación contráctil, junto a una disminución en la necrosis y un menor grado de apoptosis, en comparación a los corazones sometidos al mismo tiempo de isquemia pero en ausencia de inhibición de CaMKII.

1.- Recuperación contráctil -

Cuando se evaluó la actividad mecánica de los corazones aislados de rata Wistar sometidos a un protocolo de 45 minutos de isquemia seguidos de 120 minutos de reperfusión, se observó una profunda

depresión de la contractilidad que luego se recuperó muy lentamente durante el período de reperfusión estudiado. Como era esperable, la recuperación contráctil en estos corazones fue menor que la obtenida en experimentos previos de nuestro laboratorio, en los cuales el tiempo de isquemia fue de 20 minutos (Vittone y col., 2002; Said y col., 2003). La reperfusión luego de una isquemia prolongada también provocó el aumento de la fosforilación del sitio Thr¹⁷ de PLN, aunque esta fosforilación fue significativamente menor que la que ocurrió luego de una isquemia breve (Said y col., 2003). A pesar de que en este trabajo de Tesis no se exploró la causa de la menor fosforilación de Thr¹⁷ durante la reperfusión

luego de una isquemia prolongada respecto a una breve, esta diferencia podría deberse a una menor reserva energética luego de la isquemia prolongada que impida una mayor fosforilación como ocurre luego de las isquemias breves. También se podría especular que esta diferencia es debida a la diferencia en especie, ya que los resultados de los protocolos con isquemias breves se realizaron en ratones, mientras que los de isquemias prolongadas fueron realizados en ratas. Sin embargo, experimentos de nuestro laboratorio realizados en ratas (Vittone y col., 2002) muestran un máximo de fosforilación del residuo Thr¹⁷ de PLN durante la reperusión luego de una isquemia breve, con valores aproximados a los obtenidos en ratones con isquemias breves (presentes resultados).

Este aumento significativo en la fosforilación de Thr¹⁷ de PLN, dependiente de CaMKII, respecto a los niveles basales, podría hacer esperar una mejor recuperación mecánica durante la reperusión que la observada cuando la fosforilación de este residuo no ocurre en presencia de la inhibición de la CaMKII. Sorprendentemente, la modesta recuperación contráctil aumentó significativamente a aproximadamente el doble, cuando el protocolo de isquemia prolongada se realizó en presencia de KN-93. Cabe recordar que la inhibición de CaMKII durante el protocolo de isquemia breve y reperusión provoca una disminución en la recuperación contráctil,

tanto en corazones de rata (Vittone y col., 2002; Said y col., 2003), como en corazones de ratones con PLN-WT (Said y col., 2003; Valverde y col., 2006). *A priori*, estos resultados indican que la activación de CaMKII durante los primeros minutos de la reperusión puede provocar un efecto beneficioso o perjudicial sobre la recuperación contráctil postisquémica, de acuerdo a la duración de la isquemia.

2.- *Infarto y Necrosis* -

En el presente trabajo, se evaluó el tamaño del infarto en corazones de rata teñidos con TTC luego de haber sido sometidos a una isquemia prolongada con el objeto de inducir un daño irreversible en el tejido miocárdico. Cuando este protocolo se realizó en presencia de KN-93, el tamaño del infarto se redujo significativamente en asociación con la mayor recuperación contráctil mencionada anteriormente. Estos resultados evidencian que la inhibición de CaMKII protege del daño inducido por isquemias prolongadas.

Asimismo, la inhibición de esta quinasa produjo una disminución de la liberación de la enzima LDH, marcadora de muerte celular por necrosis.

Estos resultados apoyan la hipótesis del papel deletéreo que tendría la CaMKII en la muerte celular inducida por isquemia y reperusión.

Por otra parte involucran por primera vez a la CaMKII con los procesos de necrosis.

3.- Apoptosis -

En el presente trabajo, además de evaluar la participación de CaMKII en la vía de muerte por necrosis, se estudió si la activación de esta enzima cumplía algún rol en el proceso apoptótico, y de ser así, cuál era ese papel. Por la técnica de TUNEL (tinción de núcleos celulares con ADN fragmentado por apoptosis), se verificó que CaMKII participa en la muerte celular por apoptosis ya que los corazones sometidos a isquemia prolongada seguida de reperfusión, en presencia de KN-93, presentaron una reducción significativa en porcentaje del número de núcleos TUNEL positivos.

Además, la reperfusión en presencia de KN-93, evitó el aumento en la activación de la caspasa-3, enzima central de la apoptosis (común a las dos vías de activación, extrínseca e intrínseca). La caspasa-3 ha sido extensamente involucrada con la muerte de los miocitos por apoptosis en respuesta a una isquemia como estímulo (Freude y col., 2000; Condorelli y col., 2001; Zhao y col., 2003). Los presentes resultados involucran a la CaMKII como mediadora de esta respuesta inducida por isquemia y reperfusión.

Otra medida del proceso de apoptosis fue la expresión de proteínas pro y anti

apoptóticas (Bax y Bcl-2, respectivamente). La relación entre estas dos proteínas determina la respuesta a una señal de muerte. Así, la sobreexpresión de Bax por sí sola, sin una señal adicional, es capaz de inducir la muerte por apoptosis (Xiang y col., 1996; McCarthy y col., 1997). La inducción de Bax provoca una disfunción mitocondrial así como la activación de caspasas que conlleva a la muerte celular. En este trabajo probamos que los corazones sometidos al protocolo de isquemia prolongada y reperfusión con CaMKII inhibida, sufrieron un aumento en la relación Bcl-2/Bax, indicando un papel deletéreo por parte de la CaMKII, por el cual ocurriría el daño a nivel mitocondrial con el consecuente disparo de la vía intrínseca de apoptosis.

Los resultados de los estudios de apoptosis junto a los mostrados con la tinción de TTC y liberación de LDH, indican que CaMKII ejerce un efecto deletéreo en la injuria irreversible inducida por isquemias prolongadas seguidas de reperfusión.

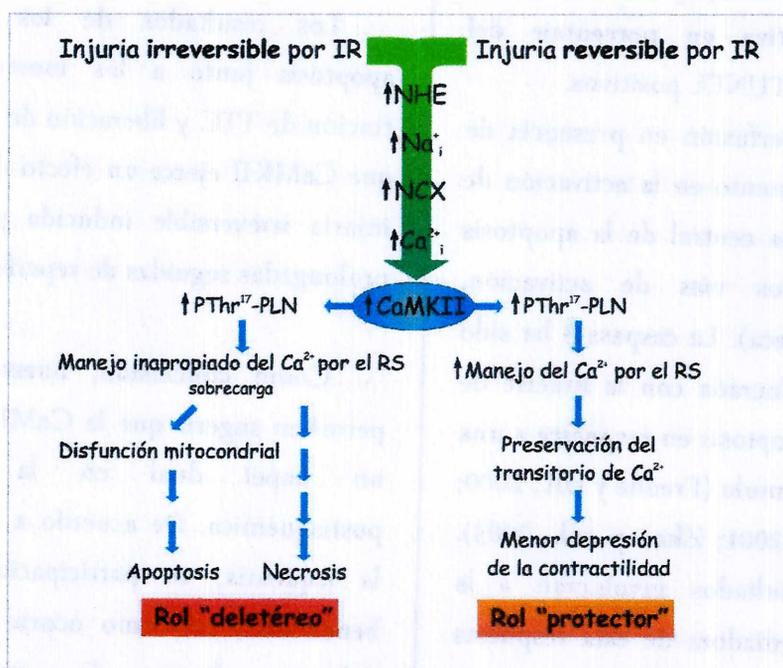
Como conclusión, nuestros resultados permiten sugerir que la CaMKII desempeña un papel dual en la recuperación postisquémica. De acuerdo a la duración de la isquemia, su participación podría ser beneficiosa, tal como ocurre en el AM, o deletérea luego de isquemias más prolongadas, participando en las vías que llevan a la muerte del tejido a través de los procesos de necrosis y apoptosis.

Resultados de nuestro laboratorio en miocitos aislados de rata sometidos a un protocolo de isquemia y reperfusión simulada muestran que el bloqueo con rianodina y tapsigargina de la liberación y retoma de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático, respectivamente, reduce la muerte celular. Estos resultados junto a los del presente trabajo aunque no concluyen los blancos de acción de la CaMKII que provocan la muerte por apoptosis, sugieren una cascada de señales en la cual estarían involucrados el retículo sarcoplasmático y la mitocondria, y en donde CaMKII tendría un papel perjudicial para la célula.

La siguiente Figura presenta un esquema de las cascadas propuestas para explicar el

efecto beneficioso y deletéreo que presenta la activación de CaMKII en la injuria por IR.

Este rol dual de la CaMKII también ha sido observado en otras intervenciones o situaciones patológicas, como por ejemplo durante la activación beta adrenérgica, en donde bajo estimulación aguda, la activación de CaMKII produce un efecto que resulta beneficioso, al fosforilar proteínas que median un inotropismo positivo y un efecto relajante (Mundiña-Weilenmann y col., 1996), en tanto que frente a una estimulación prolongada, la activación de CaMKII se vuelve parte de una señal apoptótica (Zhu y col., 2003).



BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abdallah, Y.A. GkatzofliaH. PieperE. ZogaS. WaltherS. KasseckertM. SchaferK. D. SchluterH. M. PiperC. Schafer (2005). "Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury." *Cardiovasc Res* 66(1): 123-31.
- Aceto, J. F.M. CondrescuC. KroupisH. NelsonN. NelsonD. NicollK. D. PhilipsonJ. P. Reeves (1992). "Cloning and expression of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger." *Arch Biochem Biophys* 298(2): 553-60.
- Adams, B. y T. Tanabe (1997). "Structural regions of the cardiac Ca channel alpha subunit involved in Ca-dependent inactivation." *J Gen Physiol* 110(4): 379-89.
- Adams, J. M. y S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* 281(5381): 1322-6.
- Allshire, A.H. M. PiperK. S. CuthbertsonP. H. Cobbold (1987). "Cytosolic free Ca²⁺ in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation." *Biochem J* 244(2): 381-5.
- Anderson, M. E.A. P. BraunH. SchulmanB. A. Premack (1994). "Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes." *Circ Res* 75(5): 854-61.
- Anderson, S. E.E. MurphyC. SteenbergenR. E. LondonP. M. Cala (1990). "Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca." *Am J Physiol* 259(6 Pt 1): C940-8.
- Aracena-Parks, P.S. A. GoonasekeraC. P. GilmanR. T. DirksenC. HidalgoS. L. Hamilton (2006). "Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1." *J Biol Chem* 281(52): 40354-68.
- Aracena, P.G. SanchezP. DonosoS. L. HamiltonC. Hidalgo (2003). "S-glutathionylation decreases Mg²⁺ inhibition and S-nitrosylation enhances Ca²⁺ activation of RyR1 channels." *J Biol Chem* 278(44): 42927-35.
- Asahi, M.E. McKennaK. KurzydłowskiM. TadaD. H. MacLennan (2000). "Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases are dissociated by elevated Ca²⁺, but not by phospholamban phosphorylation, vanadate, or thapsigargin, and are enhanced by ATP." *J Biol Chem* 275(20): 15034-8.
- Atsma, D. E.E. M. BastiaanseA. JerzewskiL. J. Van der ValkA. Van der Laarse (1995). "Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition." *Circ Res* 76(6): 1071-8.

- Balshaw, D. M.L. Xu N. Yamaguchi D. A. Pasek G. Meissner (2001). "Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor)." *J Biol Chem* 276(23): 20144-53.
- Bassani, J. W.R. A. Bassani D. M. Bers (1994). "Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms." *J Physiol* 476(2): 279-93.
- Bassani, R. A.A. Mattiazzi D. M. Bers (1995). "CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes." *Am J Physiol* 268(2 Pt 2): H703-12.
- Bayer, K. U. y H. Schulman (2001). "Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII." *Biochem Biophys Res Commun* 289(5): 917-23.
- Beard, N. A.M. G. Casarotto L. Wei M. Varsanyi D. R. Laver A. F. Dulhunty (2005). "Regulation of ryanodine receptors by calsequestrin: effect of high luminal Ca²⁺ and phosphorylation." *Biophys J* 88(5): 3444-54.
- Berlin, J. R.M. B. Cannell W. J. Lederer (1989). "Cellular origins of the transient inward current in cardiac myocytes. Role of fluctuations and waves of elevated intracellular calcium." *Circ Res* 65(1): 115-26.
- Berridge, M. J.P. Lipp M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Bers, D. M. (2001). "Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force." The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Bers, D. M.J. W. Bassani R. A. Bassani (1996). "Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle." *Ann N Y Acad Sci* 779: 430-42.
- Bers, D. M.D. M. Christensen T. X. Nguyen (1988). "Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction?" *J Mol Cell Cardiol* 20(5): 405-14.
- Bers, D. M. y V. M. Stiffel (1993). "Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling." *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): C1587-93.
- Blinks, J. R. y M. Endoh (1986). "Modification of myofibrillar responsiveness to Ca⁺⁺ as an inotropic mechanism." *Circulation* 73(3 Pt 2): III85-98.
- Block, B. A.T. Imagawa K. P. Campbell C. Franzini-Armstrong (1988). "Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle." *J Cell Biol* 107(6 Pt 2): 2587-600.

- Bodi, I.G. Mikala S. E. Koch S. A. Akhter A. Schwartz (2005). "The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on." *J Clin Invest* 115(12): 3306-17.
- Bolli, R. (1990). "Mechanism of myocardial "stunning"." *Circulation* 82(3): 723-38.
- Bolli, R. (1995). "Common methodological problems and artifacts associated with studies of myocardial stunning in vivo." *Basic Res Cardiol* 90(4): 257-62.
- Bolli, R.M. O. Jeroudi B. S. Patel O. I. Aruoma B. Halliwell E. K. Lai P. B. McCay (1989). "Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury." *Circ Res* 65(3): 607-22.
- Bolli, R. y E. Marbán (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." *Physiol Rev* 79(2): 609-34.
- Bolli, R.B. S. Patel M. O. Jeroudi E. K. Lai P. B. McCay (1988). "Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron." *J Clin Invest* 82(2): 476-85.
- Bolli, R.W. X. Zhu C. J. Hartley L. H. Michael J. E. Repine M. L. Hess R. C. Kukreja R. Roberts (1987). "Attenuation of dysfunction in the postischemic 'stunned' myocardium by dimethylthiourea." *Circulation* 76(2): 458-68.
- Bootman, M. D.P. Lipp M. J. Berridge (2001). "The organisation and functions of local Ca(2+) signals." *J Cell Sci* 114(Pt 12): 2213-22.
- Bossy-Wetzel, E.D. D. Newmeyer D. R. Green (1998). "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization." *Embo J* 17(1): 37-49.
- Bozler, E. (1954). "Relaxation in extracted muscle fibers." *J Gen Physiol* 38(2): 149-59.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Bragadeesh, T.A. R. Jayaweera M. Pascotto A. Micari D. E. LeC. M. Kramer F. H. Epstein S. Kaul (2008). "Post-ischaemic myocardial dysfunction (stunning) results from myofibrillar edema." *Heart* 94(2): 166-71.
- Brandes, R.V. M. Figueredo S. A. Camacho B. M. Massie M. W. Weiner (1992). "Suppression of motion artifacts in fluorescence spectroscopy of perfused hearts." *Am J Physiol* 263(3 Pt 2): H972-80.
- Braun, A. P. y H. Schulman (1995). "The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function." *Annu Rev Physiol* 57: 417-45.

- Braunwald, E. y R. A. Klöner (1982). "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction." *Circulation* 66(6): 1146-9.
- Bridge, J. H.M. M. BersohnF. GonzalezJ. B. Bassingthwaighte (1982). "Synthesis and use of radio cobaltic EDTA as an extracellular marker in rabbit heart." *Am J Physiol* 242(4): H671-6.
- Brocke, L.M. SrinivasanH. Schulman (1995). "Developmental and regional expression of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain." *J Neurosci* 15(10): 6797-808.
- Buja, L. M. y M. L. Entman (1998). "Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease." *Circulation* 98(14): 1355-7.
- Carafoli, E. (1987). "Intracellular calcium homeostasis." *Annu Rev Biochem* 56: 395-433.
- Carafoli, E. y T. Stauffer (1994). "The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression." *J Neurobiol* 25(3): 312-24.
- Colomer, J. M.L. MaoH. A. RockmanA. R. Means (2003). "Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo." *Mol Endocrinol* 17(2): 183-92.
- Condorelli, G.R. RoncaratiJ. Ross, Jr.A. PisaniG. StassiM. TodaroS. TrochaA. DruscoY. GuM. A. RussoG. FratiS. P. JonesD. J. LeferC. NapoliC. M. Croce (2001). "Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9977-82.
- Cozens, B. y R. A. Reithmeier (1984). "Size and shape of rabbit skeletal muscle calsequestrin." *J Biol Chem* 259(10): 6248-52.
- Cranefield, P. F.A. L. WitB. F. Hoffman (1973). "Genesis of cardiac arrhythmias." *Circulation* 47(1): 190-204.
- Crow, M. T.K. ManiY. J. NamR. N. Kitsis (2004). "The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis." *Circ Res* 95(10): 957-70.
- Chapman, R. A. y J. Tunstall (1980). "The interaction of sodium and calcium ions at the cell membrane and the control of contractile strength in frog atrial muscle." *J Physiol* 305: 109-23.
- Chen-Izu, Y.C. W. WardW. Stark, Jr.T. BanyaszM. P. SumandeaC. W. BalkeL. T. IzuX. H. Wehrens (2007). "Phosphorylation of RyR2 and shortening of RyR2 cluster spacing in spontaneously hypertensive rat with heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(4): H2409-17.

- Chen, X.X. Zhang H. Kubo D. M. Harris G. D. Mills J. Moyer R. Berretta S. T. Potts J. D. Marsh S. R. Houser (2005). "Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes." *Circ Res* 97(10): 1009-17.
- Dabertrand, F.J. L. Morel V. Sorrentino J. Mironneau C. Mironneau N. Macrez (2006). "Modulation of calcium signalling by dominant negative splice variant of ryanodine receptor subtype 3 in native smooth muscle cells." *Cell Calcium* 40(1): 11-21.
- De Koninck, P. y H. Schulman (1998). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations." *Science* 279(5348): 227-30.
- Del Nido, P. J.P. Glynn P. Buenaventura G. Salama A. P. Koretsky (1998). "Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2." *Am J Physiol* 274(2 Pt 2): H728-41.
- DeSantiago, J.L. S. Maier D. M. Bers (2002). "Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban." *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 975-84.
- Diaz, M. E.S. C. O'Neill D. A. Eisner (2004). "Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans." *Circ Res* 94(5): 650-6.
- DiPolo, R. y L. Beauge (2006). "Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions." *Physiol Rev* 86(1): 155-203.
- Dolmetsch, R. E.R. S. Lewis C. C. Goodnow J. I. Healy (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration." *Nature* 386(6627): 855-8.
- Dosemeci, A.J. H. Tao-Cheng L. Vinade C. A. Winters L. Pozzo-Miller T. S. Reese (2001). "Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10428-32.
- Duchen, M. R. (2000). "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death." *J Physiol* 529 Pt 1: 57-68.
- Ebashi, S. (1960). "Calcium binding and relaxation in the actomyosin system." *J Biochem* 48: 150-151.
- Ebashi, S. (1980). "The Croonian lecture, 1979: Regulation of muscle contraction." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 207(1168): 259-86.
- Ebashi, S. y M. Endo (1968). "Calcium ion and muscle contraction." *Prog Biophys Mol Biol* 18: 123-83.
- Ebashi, S. y F. Lipmann (1962). "Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle." *J Cell Biol* 14: 389-400.

- Edman, C. F. y H. Schulman (1994). "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* 1221(1): 89-101.
- Endo, M. (2006). "Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling." *J Pharmacol Sci* 100(5): 519-24.
- Engelmann, T. W. (1873). "Mikroskopische Untersuchungen über die quergestreifte Muskelsubstanz " *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 7(1): 33-71.
- Fabiato, A. (1985). "Effects of ryanodine in skinned cardiac cells." *Fed Proc* 44(15): 2970-6.
- Fabiato, A. y F. Fabiato (1975). "Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells." *J Physiol* 249(3): 469-95.
- Fedida, D.D. Noble A. J. Spindler (1988). "Mechanism of the use dependence of Ca²⁺ current in guinea-pig myocytes." *J Physiol* 405: 461-75.
- Feng, J.B. J. Schaus J. A. Fallavollita T. C. Lee J. M. Canty, Jr. (2001). "Preload induces troponin I degradation independently of myocardial ischemia." *Circulation* 103(16): 2035-7.
- Ferreira, G.J. Yi E. Rios R. Shirokov (1997). "Ion-dependent inactivation of barium current through L-type calcium channels." *J Gen Physiol* 109(4): 449-61.
- Ferrero, P.M. Said G. Sanchez L. Vittone C. Valverde P. Donoso A. Mattiazzi C. Mundina-Weilenmann (2007). "Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation." *J Mol Cell Cardiol* 43(3): 281-91.
- Fleischer, S.E. M. Ogunbunmi M. C. Dixon E. A. Fleer (1985). "Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(21): 7256-9.
- Fliss, H. y D. Gatteringer (1996). "Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium." *Circ Res* 79(5): 949-56.
- Frank, J. S. y G. A. Langer (1974). "The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange." *J Cell Biol* 60(3): 586-601.
- Frank, K. y E. G. Kranias (2000). "Phospholamban and cardiac contractility." *Ann Med* 32(8): 572-8.
- Franzini-Armstrong, C. y L. D. Peachey (1981). "Striated muscle contractile and control mechanisms." *J Cell Biol* 91(3 Pt 2): 166s-186s.
- Franzini-Armstrong, C.F. Protasi V. Ramesh (1999). "Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles." *Biophys J* 77(3): 1528-39.

- Freude, B.T. N. Masters F. Robicsek A. Fokin S. Kostin R. Zimmermann C. Ullmann S. Lorenz-Meyer J. Schaper (2000). "Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion." *J Mol Cell Cardiol* 32(2): 197-208.
- Frey, N.T. A. McKinsey E. N. Olson (2000). "Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function." *Nat Med* 6(11): 1221-7.
- Fruen, B. R.J. M. Bardy T. M. Byrem G. M. Strasburg C. F. Louis (2000). "Differential Ca²⁺ sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3): C724-33.
- Furuichi, T.D. Furutama Y. Hakamata J. Nakai H. Takeshima K. Mikoshiba (1994). "Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain." *J Neurosci* 14(8): 4794-805.
- Gao, W. D.D. Atar P. H. Backx E. Marban (1995). "Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle." *Circ Res* 76(6): 1036-48.
- Gao, W. D.D. Atar Y. Liu N. G. Perez A. M. Murphy E. Marban (1997). "Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium." *Circ Res* 80(3): 393-9.
- Gao, W. D.Y. Liu R. Mellgren E. Marban (1996). "Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis?" *Circ Res* 78(3): 455-65.
- Giannini, G.E. Clementi R. Ceci G. Marziali V. Sorrentino (1992). "Expression of a ryanodine receptor-Ca²⁺ channel that is regulated by TGF-beta." *Science* 257(5066): 91-4.
- Giannini, G.A. Conti S. Mammarella M. Scrobogna V. Sorrentino (1995). "The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues." *J Cell Biol* 128(5): 893-904.
- Gill, C.R. Mestral A. Samali (2002). "Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?" *FASEB J* 16(2): 135-46.
- Girouard, S. D.J. M. Pastore K. R. Laurita K. W. Gregory D. S. Rosenbaum (1996). "Optical mapping in a new guinea pig model of ventricular tachycardia reveals mechanisms for multiple wavelengths in a single reentrant circuit." *Circulation* 93(3): 603-13.
- Goldberg, J.A. C. Nairn J. Kuriyan (1996). "Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I." *Cell* 84(6): 875-87.
- Gottlieb, R. A.K. O. Burleson R. A. Kloner B. M. Babior R. L. Engler (1994). "Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes." *J Clin Invest* 94(4): 1621-8.
- Green, D. R. y J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281(5381): 1309-12.

- Grinwald, P. M. y C. Brosnahan (1987). "Sodium imbalance as a cause of calcium overload in post-hypoxic reoxygenation injury." *J Mol Cell Cardiol* 19(5): 487-95.
- Gross, G. J.N. E. FarberH. F. HardmanD. C. Warltier (1986). "Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs." *Am J Physiol* 250(3 Pt 2): H372-7.
- Guerini, D.F. GuidiE. Carafoli (2002). "Differential membrane targeting of the SERCA and PMCA calcium pumps: experiments with recombinant chimeras." *FASEB J* 16(6): 519-28.
- Gyorke, I. y S. Gyorke (1998). "Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites." *Biophys J* 75(6): 2801-10.
- Gyorke, I.N. HesterL. R. JonesS. Gyorke (2004). "The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium." *Biophys J* 86(4): 2121-8.
- Hadley, R. W. y J. R. Hume (1987). "An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea-pig myocytes." *J Physiol* 389: 205-22.
- Hagemann, D.M. KuscheIT. KuramochiW. ZhuH. ChengR. P. Xiao (2000). "Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes." *J Biol Chem* 275(29): 22532-6.
- Hakamata, Y.S. NishimuraJ. NakaiY. NakashimaT. KitaK. Imoto (1994). "Involvement of the brain type of ryanodine receptor in T-cell proliferation." *FEBS Lett* 352(2): 206-10.
- Hampton, T. G.I. AmendeK. E. TraversJ. P. Morgan (1998). "Intracellular calcium dynamics in mouse model of myocardial stunning." *Am J Physiol* 274(5 Pt 2): H1821-7.
- Hasselbach, W. y M. Makinose (1961). "The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting." *Biochem Z* 333: 518-28.
- Heilbrunn, L. V. (1940). "The action of calcium on muscle protoplasm." *Physiol Zool* 13: 88-94.
- Hein, S.T. ScheffoldJ. Schaper (1995). "Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium." *J Thorac Cardiovasc Surg* 110(1): 89-98.
- Heineke, J. y J. D. Molkenstin (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 589-600.
- Heyndrickx, G. R.R. W. MillardR. J. McRitchieP. R. MarokoS. F. Vatner (1975). "Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs." *J Clin Invest* 56(4): 978-85.

- Hill, A. V. (1948). "On the Time Required for Diffusion and Its Relation to Processes in Muscle" Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 135(881): 446-453.
- Hirano, Y. y M. Hiraoka (1994). "Dual modulation of unitary L-type Ca²⁺ channel currents by [Ca²⁺]_i in fura-2-loaded guinea-pig ventricular myocytes." J Physiol 480 (Pt 3): 449-63.
- Hofmann, P. A.W. P. MillerR. L. Moss (1993). "Altered calcium sensitivity of isometric tension in myocyte-sized preparations of porcine postischemic stunned myocardium." Circ Res 72(1): 50-6.
- Homans, D. C.E. SublettK. J. ElspergerJ. S. SchwartzR. J. Bache (1986). "Mechanisms of remote myocardial dysfunction during coronary artery occlusion in the presence of multivessel disease." Circulation 74(3): 588-96.
- Hook, S. S. y A. R. Means (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 471-505.
- House, S. J.R. G. GinnanS. E. ArmstrongH. A. Singer (2007). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-delta isoform regulation of vascular smooth muscle cell proliferation." Am J Physiol Cell Physiol 292(6): C2276-87.
- Hudmon, A. y H. Schulman (2002). "Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function." Annu Rev Biochem 71: 473-510.
- Huxley, A. y R. Straub (1958). "Local activation and interfibrillar structures in striated muscle." J Physiol 143: 40.
- Ikemoto, N.G. M. BhatnagarB. NagyJ. Gergely (1972). "Interaction of divalent cations with the 55,000-dalton protein component of the sarcoplasmic reticulum. Studies of fluorescence and circular dichroism." J Biol Chem 247(23): 7835-7.
- Inui, M.A. SaitoS. Fleischer (1987). "Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures." J Biol Chem 262(32): 15637-42.
- Ishida, A.Y. ShigeriT. TaniguchiI. Kameshita (2003). "Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology." Pharmacol Ther 100(3): 291-305.
- Jeroudi, M. O.J. CheirifG. HabibR. Bolli (1994). "Prolonged wall motion abnormalities after chest pain at rest in patients with unstable angina: a possible manifestation of myocardial stunning." Am Heart J 127(5): 1241-50.

- Kajstura, J.W. ChengK. ReissW. A. ClarkE. H. SonnenblickS. KrajewskiJ. C. ReedG. OlivettiP. Anversa (1996). "Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats." *Lab Invest* 74(1): 86-107.
- Kamada, T. y H. Kinoshita (1943). "Disturbances initiated from the naked surface of muscle protoplasm." *Jpn J Zool* 10: 469-493.
- Kaneko, T.H. TanakaM. OyamadaS. KawataT. Takamatsu (2000). "Three distinct types of Ca(2+) waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy." *Circ Res* 86(10): 1093-9.
- Karmazyn, M. (1999). "The role of the myocardial sodium-hydrogen exchanger in mediating ischemic and reperfusion injury. From amiloride to cariporide." *Ann N Y Acad Sci* 874: 326-34.
- Kass, R. S. y M. C. Sanguinetti (1984). "Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms." *J Gen Physiol* 84(5): 705-26.
- Kihara, Y. y J. P. Morgan (1991). "Abnormal Ca_i2+ handling is the primary cause of mechanical alternans: study in ferret ventricular muscles." *Am J Physiol* 261(6 Pt 2): H1746-55.
- Kim, S. J.R. K. KudejA. YataniY. K. KimG. TakagiR. HondaD. A. ColantonioJ. E. Van EykD. E. VatnerR. L. RasmussonS. F. Vatner (2001). "A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca(2+) handling." *Circ Res* 89(9): 831-7.
- Kitakaze, M.M. L. WeisfeldtE. Marban (1988). "Acidosis during early reperfusion prevents myocardial stunning in perfused ferret hearts." *J Clin Invest* 82(3): 920-7.
- Kloner, R. A.R. BolliE. MarbanL. ReinlibE. Braunwald (1998). "Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop." *Circulation* 97(18): 1848-67.
- Kranias, E. (2002). "Introduction." *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 883.
- Krause, S. M.W. E. JacobusL. C. Becker (1989). "Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium." *Circ Res* 65(2): 526-30.
- Ladilov, Y.O. EfeC. SchaferB. RotherS. KasseckertY. AbdallahK. MeuterK. Dieter SchluterH. M. Piper (2003). "Reoxygenation-induced rigor-type contracture." *J Mol Cell Cardiol* 35(12): 1481-90.
- Ladilov, Y. V.B. SiegmundC. BalslerH. M. Piper (1997). "Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture." *Circ Res* 80(1): 69-75.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.

- Laurita, K. R.R. Katta B. Wible X. Wan M. H. Koo (2003). "Transmural heterogeneity of calcium handling in canine." *Circ Res* 92(6): 668-75.
- Lazdunski, M.C. Frelin P. Vigne (1985). "The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH." *J Mol Cell Cardiol* 17(11): 1029-42.
- Lee, C. O. y H. A. Fozzard (1975). "Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle." *J Gen Physiol* 65(6): 695-708.
- Lee, K. S.E. Marban R. W. Tsien (1985). "Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium." *J Physiol* 364: 395-411.
- Leem, C. H.D. Lagadic-Gossman R. D. Vaughan-Jones (1999). "Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte." *J Physiol* 517 (Pt 1): 159-80.
- Lehninger, A. L.E. Carafoli C. S. Rossi (1967). "Energy-linked ion movements in mitochondrial systems." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 29: 259-320.
- Li, P.D. Nijhawan I. Budihardjo S. M. Srinivasula M. Ahmad E. S. Alnemri X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 91(4): 479-89.
- Li, Y.E. G. Kranias G. A. Mignery D. M. Bers (2002). "Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes." *Circ Res* 90(3): 309-16.
- Limbruno, U.R. Zucchi S. Ronca-Testoni P. Galbani G. Ronca M. Mariani (1989). "Sarcoplasmic reticulum function in the "stunned" myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 21(10): 1063-72.
- Lokuta, A. J.T. B. Rogers W. J. Lederer H. H. Valdivia (1995). "Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism." *J Physiol* 487 (Pt 3): 609-22.
- Louch, W. E.G. R. Ferrier S. E. Howlett (2002). "Changes in excitation-contraction coupling in an isolated ventricular myocyte model of cardiac stunning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2): H800-10.
- Lucchesi, P. A. y K. J. Sweadner (1991). "Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity." *J Biol Chem* 266(14): 9327-31.
- Luo, W.I. L. Grupp J. Harrer S. Ponniah G. Grupp J. J. Duffy T. Doetschman E. G. Kranias (1994). "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation." *Circ Res* 75(3): 401-9.

- MacLennan, D. H. y P. T. Wong (1971). "Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(6): 1231-5.
- Maier, L. S. y D. M. Bers (2002). "Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond." *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 919-39.
- Malenka, R. C. y R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" *Science* 285(5435): 1870-4.
- Maltsev, V. A.T. M. VinogradovaE. G. Lakatta (2006). "The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat." *J Pharmacol Sci* 100(5): 338-69.
- Maraldi, T.M. RugoloD. FiorentiniL. LandiG. Hakim (2006). "Glucose transport activation in human hematopoietic cells M07e is modulated by cytosolic calcium and calmodulin." *Cell Calcium* 40(4): 373-81.
- Marbán, E. y R. W. Tsien (1982). "Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: positive feed-back regulation by intracellular calcium?" *J Physiol* 329: 589-614.
- Martonosi, A. N. y S. Pikula (2003). "The network of calcium regulation in muscle." *Acta Biochim Pol* 50(1): 1-30.
- Marx, S. O.J. GaburjakovaM. GaburjakovaC. HenriksonK. OndriasA. R. Marks (2001). "Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors)." *Circ Res* 88(11): 1151-8.
- Matsumura, Y.H. KusuokaM. InoueM. HoriT. Kamada (1993). "Protective effect of the protease inhibitor leupeptin against myocardial stunning." *J Cardiovasc Pharmacol* 22(1): 135-42.
- Mattiazzi, A.L. Hove-MadsenD. M. Bers (1994). "Protein kinase inhibitors reduce SR Ca transport in permeabilized cardiac myocytes." *Am J Physiol* 267(2 Pt 2): H812-20.
- McCarron, J. G.J. G. McGeownS. ReardonM. IkebeF. S. FayJ. V. Walsh, Jr. (1992). "Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II." *Nature* 357(6373): 74-7.
- McCarthy, N. J.M. K. WhyteC. S. GilbertG. I. Evan (1997). "Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak." *J Cell Biol* 136(1): 215-27.
- McDonough, A. A.K. GeeringR. A. Farley (1990). "The sodium pump needs its beta subunit." *FASEB J* 4(6): 1598-605.
- McDonough, J. L.D. K. ArrellJ. E. Van Eyk (1999). "Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury." *Circ Res* 84(1): 9-20.

- McDonough, J. L.R. LabuggerW. PickettM. Y. TseS. MacKenzieS. C. PangD. AtarG. RopchanJ. E. Van Eyk (2001). "Cardiac troponin I is modified in the myocardium of bypass patients." *Circulation* 103(1): 58-64.
- Meissner, A. y J. P. Morgan (1995). "Contractile dysfunction and abnormal Ca²⁺ modulation during postischemic reperfusion in rat heart." *Am J Physiol* 268(1 Pt 2): H100-11.
- Meissner, G. (1986). "Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 261(14): 6300-6.
- Meissner, G. (2004). "Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel." *Cell Calcium* 35(6): 621-8.
- Mejía-Alvarez, R.C. MannoC. A. Villalba-GaleaL. del Valle FernandezR. R. CostaM. FillT. GharbiA. L. Escobar (2003). "Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach for measuring cellular signals in the beating heart." *Pflugers Arch* 445(6): 747-58.
- Morano, I.F. HofmannM. ZimmerJ. C. Ruegg (1985). "The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres." *FEBS Lett* 189(2): 221-4.
- Mundiña-Weilenmann, C.L. VittonM. OrtaleG. C. de CingolaniA. Mattiazzi (1996). "Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart." *J Biol Chem* 271(52): 33561-7.
- Murayama, T. y Y. Ogawa (1996). "Properties of Ryr3 ryanodine receptor isoform in mammalian brain." *J Biol Chem* 271(9): 5079-84.
- Murphy, E.C. SteenbergenL. A. LevyB. RajuR. E. London (1989). "Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart." *J Biol Chem* 264(10): 5622-7.
- Myers, M. L.R. BolliR. F. LekichC. J. HartleyR. Roberts (1985). "Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia." *Circulation* 72(4): 915-21.
- Nakai, J.T. ImagawaY. HakamatM. ShigekawaH. TakeshimaS. Numa (1990). "Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel." *FEBS Lett* 271(1-2): 169-77.
- Nawada, R.T. MurakamiT. IwaseK. NagaiY. Morital. KouchiM. AkaoS. Sasayama (1997). "Inhibition of sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase activity reduces the infarct size-limiting effect of preconditioning in rabbit hearts." *Circulation* 96(2): 599-604.
- Neunlist, M.S. Z. ZouL. Tung (1992). "Design and use of an "optrode" for optical recordings of cardiac action potentials." *Pflugers Arch* 420(5-6): 611-7.

- Neylon, C. B.S. M. RichardsM. A. LarsenA. AgrotisA. Bobik (1995). "Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are expressed in vascular smooth muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 215(3): 814-21.
- Nicoll, D. A.S. LongoniK. D. Philipson (1990). "Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} exchanger." *Science* 250(4980): 562-5.
- Nixon, J. V.C. N. BrownT. C. Smitherman (1982). "Identification of transient and persistent segmental wall motion abnormalities in patients with unstable angina by two-dimensional echocardiography." *Circulation* 65(7): 1497-503.
- Nuss, H. B. y S. R. Houser (1992). "Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes." *Am J Physiol* 263(4 Pt 2): H1161-9.
- Nwasokwa, O. N. (1995). "Mechanism of mechanical alternans in ischemia-reperfusion: role of deficient relaxation of the strong twitch." *Am J Physiol* 269(1 Pt 2): H169-75.
- Odermatt, A.K. KurzydowskiD. H. MacLennan (1996). "The v_{max} of the Ca^{2+} -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban." *J Biol Chem* 271(24): 14206-13.
- Ohta, Y.E. NishidaH. Sakai (1986). "Type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase binds to actin filaments in a calmodulin-sensitive manner." *FEBS Lett* 208(2): 423-6.
- Orchard, C. H.E. McCallM. S. KirbyM. R. Boyett (1991). "Mechanical alternans during acidosis in ferret heart muscle." *Circ Res* 68(1): 69-76.
- Park, C. O.X. H. XiaoD. G. Allen (1999). "Changes in intracellular Na^{+} and pH in rat heart during ischemia: role of $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger." *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): H1581-90.
- Peachey, L. D. (1965). "The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius." *J Cell Biol* 25(3): Suppl:209-31.
- Peterson, B. Z.C. D. DeMariaJ. P. AdelmanD. T. Yue (1999). "Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels." *Neuron* 22(3): 549-58.
- Philipson, K. D. y D. A. Nicoll (2000). "Sodium-calcium exchange: a molecular perspective." *Annu Rev Physiol* 62: 111-33.
- Picciotto, M. R.M. ZoliG. BertuzziA. C. Nairn (1995). "Immunochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I." *Synapse* 20(1): 75-84.
- Piuhola, J.A. HammesK. SchuhL. NeysesO. VuolteenahoH. Ruskoaho (2001). "Overexpression of sarcolemmal calcium pump attenuates induction of cardiac gene expression in response to ET-1." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(3): R699-705.
- Porter, K. R. y G. E. Palade (1957). "Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells." *J Biophys Biochem Cytol* 3(2): 269-300.

- Porzio, M. A. y A. M. Pearson (1977). "Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Biochim Biophys Acta* 490(1): 27-34.
- Post, J. A.G. A. LangerJ. A. Op den KampA. J. Verkleij (1988). "Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and 'gas-dissected' membranes." *Biochim Biophys Acta* 943(2): 256-66.
- Przyklenk, K. y R. A. Kloner (1986). "Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium"." *Circ Res* 58(1): 148-56.
- Qian, Y. W.W. T. ClusinS. F. LinJ. HanR. J. Sung (2001). "Spatial heterogeneity of calcium transient alternans during the early phase of myocardial ischemia in the blood-perfused rabbit heart." *Circulation* 104(17): 2082-7.
- Ramirez, M. T.X. L. ZhaoH. SchulmanJ. H. Brown (1997). "The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes." *J Biol Chem* 272(49): 31203-8.
- Ranu, H. K.C. M. TerraccianoK. DaviaE. BernobichB. ChaudhriS. E. RobinsonZ. Bin KangR. J. HajjarK. T. MacLeodS. E. Harding (2002). "Effects of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾-exchanger overexpression on excitation-contraction coupling in adult rabbit ventricular myocytes." *J Mol Cell Cardiol* 34(4): 389-400.
- Reddy, L. G.L. R. JonesR. C. PaceD. L. Stokes (1996). "Purified, reconstituted cardiac Ca²⁺-ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 271(25): 14964-70.
- Retzius, G. (1881). "Zur Kenntniss der quergestreiften Muskelfaser." *Biol Untersuch Series I* 1: 1-26.
- Ringer, S. (1883). "A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction." *J Physiol* 4(2-3): 222-5.
- Ríos, E. y G. Pizarro (1991). "Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle." *Physiol Rev* 71(3): 849-908.
- Rodríguez, P.M. S. BhogalJ. Colyer (2003). "Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A." *J Biol Chem* 278(40): 38593-600.
- Said, M.L. VittoneC. Mundina-WeilenmannP. FerreroE. G. KraniasA. Mattiazzi (2003). "Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(3): H1198-205.

- Satoh, H.K. S. GinsburgK. QingH. TeradaH. HayashiD. M. Bers (2000). "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* 101(12): 1441-6.
- Schneider, M. F. y W. K. Chandler (1973). "Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling." *Nature* 242(5395): 244-6.
- Serrano, C. V., Jr.E. A. MikhailP. WangB. NobleP. KuppusamyJ. L. Zweier (1996). "Superoxide and hydrogen peroxide induce CD18-mediated adhesion in the postischemic heart." *Biochim Biophys Acta* 1316(3): 191-202.
- Shen, K.M. N. TeruelK. SubramanianT. Meyer (1998). "CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines." *Neuron* 21(3): 593-606.
- Simmerman, H. K.Y. M. KobayashiJ. M. AutryL. R. Jones (1996). "A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure." *J Biol Chem* 271(10): 5941-6.
- Sitsapesan, R. y A. J. Williams (1997). "Regulation of current flow through ryanodine receptors by luminal Ca2+." *J Membr Biol* 159(3): 179-85.
- Smith, J. S.R. CoronadoG. Meissner (1985). "Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels." *Nature* 316(6027): 446-9.
- Soderling, T. R. (1999). "The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade." *Trends Biochem Sci* 24(6): 232-6.
- Soderling, T. R.B. ChangD. Brickey (2001). "Cellular signaling through multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Biol Chem* 276(6): 3719-22.
- Soderling, T. R. y J. T. Stull (2001). "Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases." *Chem Rev* 101(8): 2341-52.
- Soeller, C. y M. B. Cannell (1999). "Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques." *Circ Res* 84(3): 266-75.
- Solaro, R. J. y F. N. Briggs (1974). "Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. Calcium binding." *Circ Res* 34(4): 531-40.
- Sommer, J. R. y R. A. Waugh (1976). "The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell-with special emphasis on the tubular membrane systems. A review." *Am J Pathol* 82(1): 192-232.
- Srinivasan, M.C. F. EdmanH. Schulman (1994). "Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus." *J Cell Biol* 126(4): 839-52.

- Sun, H.N. Leblanc S. Nattel (1997). "Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes." *Am J Physiol* 272(4 Pt 2): H1625-35.
- Suzuki, T. y J. H. Wang (1986). "Stimulation of bovine cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump and blocking of phospholamban phosphorylation and dephosphorylation by a phospholamban monoclonal antibody." *J Biol Chem* 261(15): 7018-23.
- Szent-Gyorgyi, A. (1949). "Attacks on Muscle." *Science* 110(2860): 411-413.
- Tada, M.M. A. Kirchberger D. I. Repke A. M. Katz (1974). "The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 249(19): 6174-80.
- Tada, M. y T. Toyofuku (1998). "Molecular regulation of phospholamban function and expression." *Trends Cardiovasc Med* 8(8): 330-40.
- Takeshima, H.S. Nishimura T. Matsumoto H. Ishida K. Kangawa N. Minamino H. Matsuo M. Ueda M. Hanaoka T. Hirose et al. (1989). "Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor." *Nature* 339(6224): 439-45.
- Thomas, S. A.J. A. Fallavollita T. C. Lee J. Feng J. M. Canty, Jr. (1999). "Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine." *Circ Res* 85(5): 446-56.
- Tombes, R. M. y G. W. Krystal (1997). "Identification of novel human tumor cell-specific CaMK-II variants." *Biochim Biophys Acta* 1355(3): 281-92.
- Toyofuku, T.K. Curotto Kurzydowski N. Narayanan D. H. MacLennan (1994). "Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase that is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 269(42): 26492-6.
- Triana, J. F.X. Y. Li U. Jamaluddin J. I. Thornby R. Bolli (1991). "Postischemic myocardial "stunning". Identification of major differences between the open-chest and the conscious dog and evaluation of the oxygen radical hypothesis in the conscious dog." *Circ Res* 69(3): 731-47.
- Valdivia, C.J. O. Hegge R. D. Lasley H. H. Valdivia R. Mentzer (1997). "Ryanodine receptor dysfunction in porcine stunned myocardium." *Am J Physiol* 273(2 Pt 2): H796-804.
- Valverde, C. A.C. Mundina-Weilenmann M. Reyes E. G. Kranias A. L. Escobar A. Mattiazzi (2006). "Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca²⁺ after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart." *Cardiovasc Res* 70(2): 335-45.

- Valverde, C. A.C. Mundina-WeilenmannM. SaidP. FerreroL. VittonoM. SalasJ. PalomequeM. V. PetroffA. Mattiazzi (2005). "Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation." *J Physiol* 562(Pt 3): 801-13.
- Van Emous, J. G.J. H. SchreurT. J. RuigrokC. J. Van Echteld (1998). "Both Na⁺-K⁺ ATPase and Na⁺-H⁺ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts." *J Mol Cell Cardiol* 30(2): 337-48.
- Van Eyk, J. E.F. PowersW. LawC. LarueR. S. HodgesR. J. Solaro (1998). "Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation." *Circ Res* 82(2): 261-71.
- Vaughan-Jones, R. D.K. W. SpitzerP. Swietach (2006). "Spatial aspects of intracellular pH regulation in heart muscle." *Prog Biophys Mol Biol* 90(1-3): 207-24.
- Vittono, L.C. Mundina-WeilenmannM. SaidP. FerreroA. Mattiazzi (2002). "Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways." *J Mol Cell Cardiol* 34(1): 39-50.
- Wanaverbecq, N.S. J. MarshM. Al-QatariD. A. Brown (2003). "The plasma membrane calcium-ATPase as a major mechanism for intracellular calcium regulation in neurones from the rat superior cervical ganglion." *J Physiol* 550(Pt 1): 83-101.
- Wang, J.R. H. SchwingerK. FrankJ. Muller-EhmsenP. Martin-VasalloT. A. PressleyA. XiangE. ErdmannA. A. McDonough (1996). "Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger in the human heart." *J Clin Invest* 98(7): 1650-8.
- Wang, S.W. R. TrumbleH. LiaoC. R. WessonA. K. DunkerC. H. Kang (1998). "Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." *Nat Struct Biol* 5(6): 476-83.
- Wehrens, X. H.S. E. LehnartS. R. ReikenA. R. Marks (2004). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor." *Circ Res* 94(6): e61-70.
- Wei, L.M. VarsanyiA. F. DulhuntyN. A. Beard (2006). "The conformation of calsequestrin determines its ability to regulate skeletal ryanodine receptors." *Biophys J* 91(4): 1288-301.
- Wibo, M.G. BravoT. Godfraind (1991). "Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors." *Circ Res* 68(3): 662-73.

- Wilkins, B. J.Y. S. DaiO. F. BuenoS. A. ParsonsJ. XuD. M. PlankF. JonesT. R. KimballJ. D. Molkentin (2004). "Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy." *Circ Res* 94(1): 110-8.
- Witcher, D. R.R. J. KovacsH. SchulmanD. C. CefaliL. R. Jones (1991). "Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity." *J Biol Chem* 266(17): 11144-52.
- Wu, Y.I. DzhuraR. J. ColbranM. E. Anderson (2001). "Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism." *J Physiol* 535(Pt 3): 679-87.
- Xiang, J.D. T. ChaoS. J. Korsmeyer (1996). "BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14559-63.
- Xiao, B.M. T. JiangM. ZhaoD. YangC. SutherlandF. A. LaiM. P. WalshD. C. WarltierH. ChengS. R. Chen (2005). "Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure." *Circ Res* 96(8): 847-55.
- Xiao, B.X. TianW. XieP. P. JonesS. CaiX. WangD. JiangH. KongL. ZhangK. ChenM. P. WalshH. ChengS. R. Chen (2007). "Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca²⁺ release." *J Biol Chem* 282(41): 30256-64.
- Xiao, R. P.H. ChengW. J. LedererT. SuzukiE. G. Lakatta (1994). "Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20): 9659-63.
- Xiao, X. H. y D. G. Allen (1999). "Role of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat heart." *Circ Res* 85(8): 723-30.
- Xu, A.C. HawkinsN. Narayanan (1993). "Phosphorylation and activation of the Ca⁽²⁺⁾-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 268(12): 8394-7.
- Xu, A. y N. Narayanan (1999). "Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of the Ca²⁺-ATPase, uncoupled from phospholamban, stimulates Ca²⁺-pumping in native cardiac sarcoplasmic reticulum." *Biochem Biophys Res Commun* 258(1): 66-72.
- Yang, L.G. LiuS. I. ZakharovJ. P. MorrowV. O. RybinS. F. SteinbergS. O. Marx (2005). "Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms." *J Biol Chem* 280(1): 207-14.

- Yang, Y.W. Z. ZhuM. L. JoinerR. ZhangC. V. OddisY. HouJ. YangE. E. PriceL. GleavesM. ErenG. NiD. E. VaughanR. P. XiaoM. E. Anderson (2006). "Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(6): H3065-75.
- Yaoita, H.K. OgawaK. MaeharaY. Maruyama (1998). "Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor." *Circulation* 97(3): 276-81.
- Yuan, W. y D. M. Bers (1994). "Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase." *Am J Physiol* 267(3 Pt 2): H982-93.
- Yuan, W.K. S. GinsburgD. M. Bers (1996). "Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes." *J Physiol* 493 (Pt 3): 733-46.
- Zhang, T. y J. H. Brown (2004). "Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure." *Cardiovasc Res* 63(3): 476-86.
- Zhang, T.L. S. MaierN. D. DaltonS. MiyamotoJ. Ross, Jr.D. M. BersJ. H. Brown (2003). "The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure." *Circ Res* 92(8): 912-9.
- Zhao, Z. Q.C. D. MorrisJ. M. BuddeN. P. WangS. MurakiH. Y. SunR. A. Guyton (2003). "Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion." *Cardiovasc Res* 59(1): 132-42.
- Zhao, Z. Q.M. NakamuraN. P. WangJ. N. WilcoxS. ShearerR. S. RonsonR. A. GuytonJ. Vinten-Johansen (2000). "Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death." *Cardiovasc Res* 45(3): 651-60.
- Zhu, W.A. Y. WooD. YangH. ChengM. T. CrowR. P. Xiao (2007). "Activation of CaMKII δ C is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis." *J Biol Chem* 282(14): 10833-9.
- Zhu, W. Z.S. Q. WangK. ChakirD. YangT. ZhangJ. H. BrownE. DevicB. K. KobilkaH. ChengR. P. Xiao (2003). "Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II." *J Clin Invest* 111(5): 617-25.
- Zorzato, F.J. FujiiK. OtsuM. PhillipsN. M. GreenF. A. LaiG. MeissnerD. H. MacLennan (1990). "Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 265(4): 2244-56.
- Zucchi, R.S. Ronca-TestoniP. Di NapoliG. YuS. GallinaG. BoscoG. RoncaA. M. CalafioreM. MarianiA. Barsotti (1996). "Sarcoplasmic reticulum calcium uptake in human

myocardium subjected to ischemia and reperfusion during cardiac surgery." *J Mol Cell Cardiol* 28(8): 1693-701.

Zuhlke, R. D.G. S. PittK. DeisserothR. W. TsienH. Reuter (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." *Nature* 399(6732): 159-62.

