

Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - Facultad de Ciencias Médicas

“APOPTOSIS INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II: ROL KINASA DEPENDIENTE DE Ca^{+2} - CALMODULINA II”

TESIS DOCTORAL

Lic. en Gen. Jorge Omar VELEZ RUEDA

Directora

Dra. Alicia R. Mattiazzi

Profesora Consulta de la Cátedra de Fisiología con Física Biológica
Investigadora consulta (CONICET)
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

Co-Directora

Dra. Julieta Palomeque

Investigadora adjunta del CONICET
Jefa de Trabajos Prácticos de la Cátedra de
Fisiología y Física Biológica.
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP



Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad
de Ciencias Médicas, UNLP.

A mis padres y a mi hermana, a
mis amigos y colegas, a todos
ellos por ayudarme a ser una mejor
persona y profesional.

Agradecimientos

A la Dra. Mattiazzi por permitirme desarrollar este trabajo de doctorado y el compromiso en mi formación como un profesional de excelencia. En ella también, agradecer al Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC) por permitirme el desarrollo de mi trabajo de tesis y por su buena predisposición cada vez que tuve que acudir a ella.

A Julieta por el compromiso asumido en la co-dirección de mi tesis (diariamente), por su compañerismo, por sus valiosos consejos, por guiarme y transmitirme sus conocimientos, por su apoyo constante, por su interés en mi aprendizaje, por su confianza y por su opinión sincera.

Al Dr. Cingolani por darme un gran apoyo al ingresar al Centro de Investigaciones Cardiovasculares y también por establecer un sincero compañerismo.

A Martín, Moni, Marga, Luciana, Luis, Charly y Jole por prestarse incondicionalmente en todo momento a ayudarme en cualquier situación o problema y, principalmente por el afecto y “por la buena onda”. Conjuntamente con esto a Andrés por la incondicionalidad. Todos ellos participantes necesarios de este trabajo de tesis.

A Irene, Carolina, Alejandro, Martín, Celeste, Mariela, Luisa, Susana, Leticia, Matilde, Caro, Verito, Alejandra, Gustavo, Gisel y Vero por prestarse incondicionalmente en todo momento a mi pavadita en cualquier situación y, principalmente por el afecto y “por la buena onda”.

A Lore, Patricio, Bernardo y Vero por el “día a día”, en la convivencia laboral, la predisposición a ayudarme y sobretodo el aguante. Juli a vos también... eso es aguante.

A Albita, Ros, Ale, Ceci e Inés por la incondicionabilidad en todo momento para ayudarme en cualquier situación o problema, especialmente a Albita por sus mates.

A todos los integrantes del Centro por estar siempre y con la mejor buena predisposición, Albita, Ros, Ale M, Ceci, Inés, Alicia M, Leticia, Romina, Matilde, Gisel, Gustavo, Alejandro, Ale O, Ale Y, Verito DG, Caro C, Venosa, Escudero, Claudia, Chichita, Patricio, Vero, Bernardo, Lore, Martín Vila, Luis, Marisa, Lean Charly, Noe, Nacho, Cecilia Mundiña, Martín Piaggio, Susana M, Nacho S, Luisa, Mariela, Irene, Carolina G, Andrés, Julieta, Juliana, Margarita, Jesica, Rinaldi, Mariana, Gende, Luciana, Mónica, Omar, Miriam, Emanuel, Juan, Juan Manuel y Alicia Rodríguez.

A Nora, Eduardo, Julia, Ro, Pili, Beli, Juan Andrés, Coca, Pupi, Claudio, Lean y Sabri, Vir, Javi, mi gran familia por soportarme, por apoyarme incondicionalmente, por confiar en mí y por su amor. LOS AMO... y nuevamente GRACIAS...

A todos mis amigos, en general, a quienes trato de expresarles que también los amo.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
Angiotensina II	3
<i>Conceptos generales</i>	3
<i>Cascadas de señalización a través de las cuales la AngII ejerce efectos en el músculo cardiaco</i>	5
<i>Efectos de la AngII a nivel del miocardio</i>	8
<i>AngII y apoptosis miocárdica</i>	11
CaMKII	13
<i>Isoformas, localización y características estructurales</i>	13
<i>Activación de la CaMKII. Mecanismos moleculares</i>	14
<i>Otras formas de activación de la CaMKII</i>	15
<i>CaMKII en condiciones fisiológicas</i>	16
<i>La CaMKII en situaciones patológicas</i>	18
MUERTE CELULAR	20
APOPTOSIS	20
<i>Descripción morfológica de una célula apoptótica</i>	21
<i>Eventos citosólicos</i>	22
<i>Eventos nucleares</i>	28
OBJETIVO	31
Hipótesis de Trabajo	31
Objetivos específicos	31
<i>PARTE 1</i>	31
<i>PARTE 2</i>	31
<i>PARTE 3</i>	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Modelos biológicos	32
Aislamiento y cultivo de miocitos	33
Evaluación morfológica de la viabilidad celular	34
Medidas de Ca^{+2}_i y contractilidad en miocitos cultivados	35
<i>Indicadores de Ca^{+2}_i</i>	35
<i>Procedimiento de carga de los indicadores</i>	38
<i>Registros de Ca^{+2}_i y acortamiento de los miocitos</i>	38
Medida del grado de apoptosis	40
Inmunodetección por Western Blot	42
Medida de las especies reactivas del O_2 (ROS)	43
Actividad de CaMKII y p38 MAPK	44
<i>Infeción adenoviral</i>	44
Fosforilación in Vitro	46

Análisis Estadístico	46
RESULTADOS	47
Inducción de apoptosis por AngII: Rol de los ROS y de la CaMKII	47
<i>Viabilidad celular</i>	47
<i>Apoptosis</i>	48
<i>ROS</i>	50
CaMKII	53
<i>La activación de CaMKII es inducida por la producción de ROS y ocurre sin cambios detectables en el Ca^{+2}_i</i>	57
<i>La activación de CaMKII por ROS no puede atribuirse a un efecto de los ROS sobre la CaM</i>	62
La activación de la p38 MAPK interviene en la muerte celular inducida por AngII	64
DISCUSIÓN	67
La AngII induce muerte celular por apoptosis a través de la activación de CaMKII mediada por ROS.	69
La CaMKII incrementó su actividad por medio de los ROS en condiciones libres de Ca^{+2} y luego de la inhibición de la CaM	70
Rol de la p38 MAPK en la apoptosis.	73
APÉNDICE	75
<i>Soluciones, medio de cultivo, drogas y anticuerpos</i>	75
<i>Buffer HEPES</i>	75
<i>Buffer de lisis para corazón entero</i>	75
<i>Buffer de lisis de miocitos</i>	75
<i>Buffer de siembra desnaturalizante para proteínas</i>	76
<i>Buffer de fosforilación</i>	76
<i>Buffer PBS</i>	77
<i>Buffer TBS</i>	77
<i>Lista de anticuerpos</i>	77
<i>Medio de cultivos de miocitos</i>	77
<i>Compuestos activos utilizados durante el período de cultivo.</i>	78
REFERENCIAS	79

Introducción

INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se estudió el rol de la kinasa dependiente de Ca^{+2} y Calmodulina II (CaMKII) en las vías de señales que conducen a la apoptosis inducidas por Angiotensina II (AngII).

Se realizará en primer término una breve revisión de tres temas que constituyen la base del presente estudio:

1. AngII
2. CaMKII
3. Muerte celular

Angiotensina II

Conceptos generales

La AngII es un octapéptido circulante que genera un potente efecto vasoconstrictor a nivel sistémico. Clásicamente se describió a la AngII como un componente del sistema hormonal Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) del organismo, encargado de regular distintas funciones tales como el tono vascular o la filtración glomerular y la reabsorción de Na^+ y agua a nivel renal, constituyendo así un sistema principal en la regulación del equilibrio hidrosalino. Actualmente se conoce que existen SRAA localizados, capaces de ejercer su función moduladora a nivel de tejidos incluyendo al miocardio^[1, 2].

En 1940 se describió la formación de AngII^[3-5] a partir de un péptido circulante (el angiotensinógeno), en respuesta a la caída de la presión arterial^[6] y a la disminución sistémica de Na^+ por liberación de renina desde el complejo yuxtglomerular a nivel renal^[7]. El

angiotensinógeno, un péptido de 14 aminoácidos de longitud perteneciente a la familia de la 2- α -globulina, es sintetizado principalmente en el hígado. El clivaje de este péptido por la renina genera un decapeptido denominado angiotensina I (AngI). La enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente principalmente en pulmón, (aunque como se mencionó anteriormente también se han descrito sistemas locales), cliva a la AngI produciendo el octapéptido, AngII. Este tiene una vida media muy breve (aproximadamente 1 hora), ya que es degradado por distintas aminopeptidasas presentes en los tejidos, dando como producto la angiotensina III, un producto de menor actividad^[8] (Figura II) que induce la secreción de aldosterona por parte de las glándulas suprarrenales, sin modificar los parámetros de presión sanguínea.

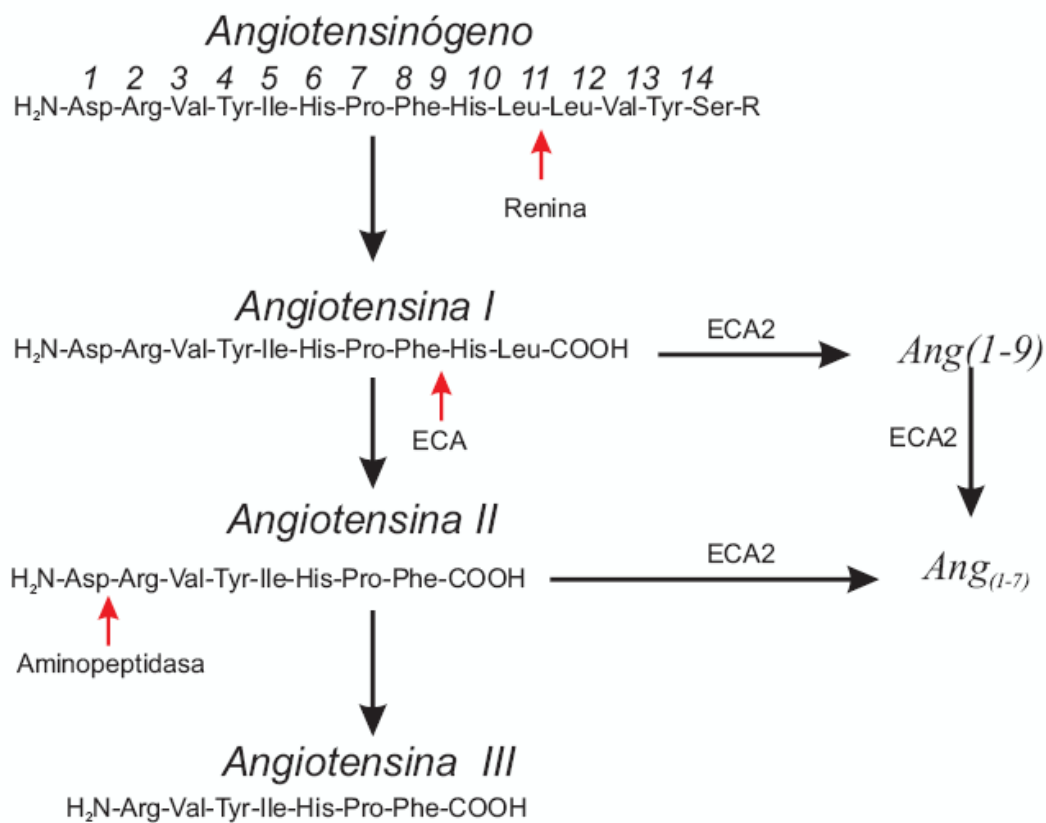


Figura II: Esquema que representa la cascada por la que el angiotensinógeno origina distintos derivados activos hasta la generación de angiotensina III. Las flechas rojas representan el sitio de corte de las proteasas involucradas en este proceso.

Existe un producto de degradación de la AngII y de la AngI (a través de un intermediario de hidrólisis, la Ang1-9), cuya producción está catalizada por una enzima análoga a la ECA, denominada ECA2, responsable de la generación de la angiotensina (1-7) [Ang₍₁₋₇₎]. La Ang₍₁₋₇₎ actuaría en miocitos a través de un receptor endógeno asociado a proteína G y Mas^[9], el receptor AT₍₁₋₇₎ Mas^[10]. La función biológica de la Ang₍₁₋₇₎ ha sido vinculada con la vasodilatación y la potenciación del efecto que induce la bradikinina, regulando negativamente los efectos y niveles plasmáticos de la AngII en numerosas especies^[10-14].

Distinto tipo de evidencia experimental ha demostrado la expresión cardíaca del mRNA de angiotensinógeno, ECA y receptores de angiotensina (AT en sus isoformas 1 y 2). Esta evidencia apoya fuertemente la teoría de producción local del SRAA^[15]. Es así que se ha descrito también en el intersticio del miocardio niveles incrementados hasta 100 veces de AngI y AngII en comparación a los niveles plasmáticos circulantes^[15].

Cascadas de señalización a través de las cuales la AngII ejerce efectos en el músculo cardíaco

La AngII puede unirse a dos tipos de receptores (receptores AT), los AT1 sensibles al bloqueo farmacológico con Losartan y los AT2 sensibles al bloqueo por PD123.319. La hormona puede actuar de modo endócrino, parácrino y/o autócrino^[16].

El receptor de AngII AT1, está presente en diversos tejidos entre los que se encuentra el corazón^[17, 18]. Está compuesto por 359 aminoácidos con un peso aproximado de 40 kDa con siete segmentos de transmembrana y presenta un 30% de homología con el receptor AT2, hecho que posibilita su dimerización y activación entre los receptores homólogos^[19, 20]. Esto también puede ocurrir con otros receptores de la misma familia, con quien comparten homología, como los β_2 -adrenérgicos y de Dopamina D₂, entre otros^[19, 20].

Tanto los receptores AT1 como los AT2 son miembros de una familia de receptores acoplados a proteínas regulatorias G (GPCR). Estas reciben su nombre por la capacidad de fijar nucleótidos de guanina, en este caso específicamente a la proteína G de tipo Gq^[21]. Los receptores acoplados a proteína Gq, están compuestos por tres subunidades: α , β y γ . Este trímero inactivo está constitutivamente asociado al receptor. Cuando el receptor asociado a proteína Gq se activa por unión de su ligando, se produce un cambio conformacional a nivel de la subunidad α que causa la liberación del GDP que estaba unido en estado basal. Como la concentración de GTP citosólico es mucho mayor que la de GDP, el sitio vacante para el nucleótido es ocupado por el GTP, lo que induce a la subunidad α a disociarse del receptor y de las subunidades $\beta\gamma$, acarreado al GTP. Tanto el monómero α como el dímero $\beta\gamma$, pueden actuar sobre proteínas blanco, generalmente asociadas con la membrana, las cuales actuarán sobre otros blancos en el citoplasma. La subunidad α tiene actividad GTPasa, por lo que al hidrolizar el GTP a GDP puede reasociarse con el dímero $\beta\gamma$ y de esta manera reiniciar el ciclo. Las proteínas G traducen señales de una gran cantidad de receptores y a su vez hay una gran variedad de proteínas G (tabla 1).

Proteína G	Función sobre el efector	Segundo mensajero	Ejemplo de receptor
s	+ adenilato cilasa	\uparrow AMPc	β -adrenérgico
Olf	+ adenilato ciclasa	\uparrow AMPc	Olfativo
i	- adenilato ciclasa abre canales de K^+	\downarrow AMPc \downarrow potencial de membrana	Somatostatina
o	Cierra canales de Ca^{+2}	\downarrow potencial de membrana	M_2 colinérgico
t	+ fosfodiesterasas del GMP_C	\downarrow GMP_C	Rodopsina
q	+ fosfolipasa C	\uparrow IP_3 y DAG	Angiotensina II

Tabla 1: Se enumeran algunos de los tipos de proteína G, su activación, sus efectos y sus segundos mensajeros. Los símbolos + ó - representan estimulación positiva y negativa respectivamente. *Modificado del libro de Lewin, 2000.*

Las subunidad α de la proteína Gq activa a la isoforma β de la fosfolipasa C (PLC_β). La PLC_β es una enzima que hidroliza fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP_2) presente en la cara interna de la membrana celular para generar inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El

IP₃ puede inducir la liberación de Ca⁺² al citosol desde depósitos intracelulares, tales como la envoltura nuclear^[22] o el retículo sarcoplasmático (RS)^[23], mecanismo preponderante en la contracción de las células musculares lisas^[24].

El DAG, que permanece unido a la membrana, es un activador de la proteína quinasa C (PKC), de la cual existen 11 isoformas dependientes de fosfolípidos, con actividad serina/treonina kinasa. Se clasifican en *convencionales* (α , β 1, β 2, γ), cuya activación es dependiente tanto de Ca⁺² como de DAG; *nóveles* (δ , ϵ , η , θ), que no presentan dependencia del ion, pero sí del DAG para su activación; y las *atípicas* (ζ , λ /i) independientes de Ca⁺² y del DAG, pero sensibles a otros fosfolípidos para su activación^[25-27] (Figura I2). Miembros de la familia PKC, fueron asociados clásicamente a la modulación del inotropismo^[28] y del cronotropismo^[28, 29] que induce la AngII, y también con la muerte celular^[30]. Brevemente, el efecto cronotrópico que induce la hormona es directo sobre las células nodales cardíacas. Principalmente es asociado con el incremento de la conductividad de las corrientes de Na⁺ (I_f) y las de Ca⁺² (I_{Ca}), generando un potencial de membrana más cercano al umbral, y favoreciendo así despolarizaciones más frecuente^[28, 29, 31].

Sin embargo, la cascada de señales que puede inducir la AngII no es tan simple ni lineal. Además de producir sus efectos celulares mediados por PKC, puede concomitantemente activar otras familias de proteínas como las JAK-STAT y las MAPKs que mediarían algunos otros efectos, independientes de la activación de PKC. Por ejemplo, distintos trabajos vinculan a la AngII con la activación de fosfolipasa A₂ y la producción de óxido nítrico en tejido vascular de rata^[32, 33].

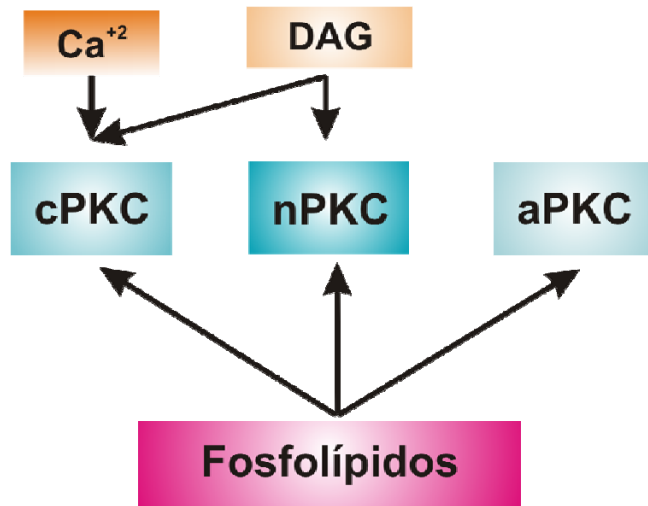


Figura I2: Clasificación de las subfamilias de la PKC, donde se esquematiza la dependencia de cada subfamilia a diversos factores. *Figura modificada Newton et al, J BIOL CHEM, 1995.*

Efectos de la AngII a nivel del miocardio

Como se mencionó anteriormente, además de sus acciones sistémicas, la AngII afecta la contractilidad miocárdica. Aunque los cambios en la contractilidad que produce la AngII en el corazón no son motivo de esta tesis, nos vamos a referir someramente a ellos. Esto es debido a que previamente se ha descrito que la AngII produce efectos diferentes en la contractilidad, dependiendo de la especie. Estos efectos diferentes involucran distintas cascadas de señalización, hecho que resulta relevante para el presente trabajo de tesis (ver más adelante). Describiremos brevemente 1. Los pasos fundamentales que van desde la despolarización de la membrana celular a la contracción y que constituyen lo que se denomina acoplamiento eléctrico-contráctil (AEC) y 2. La respuesta inotrópica a la AngII.

1. Durante el AEC (Ver Figura I3), la despolarización de la membrana plasmática produce entrada de Ca^{+2} a través de los canales de Ca^{+2} de la membrana tipo L (que son dependientes del voltaje de la membrana), e induce la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplasmático (RS) (fenómeno denominado liberación de Ca^{+2} inducida por Ca^{+2}), a través del canal de rianodina (RyR)^[34]. El aumento de Ca^{+2} citosólico produce la contracción. La relajación sobreviene por el re-secuestro de Ca^{+2} que ocurre a través de la Ca^{+2} -ATPasa del RS o SERCA, - que es regulada por el estado de fosforilación de otra

pequeña proteína llamada fosfolamban (PLB). Cuando la PLB está fosforilada se separa de la SERCA y esta última aumenta su actividad incrementando el secuestro de Ca^{+2} hacia el interior del RS^[35, 36], lo que incrementa la carga de Ca^{+2} del mismo y acelera la relajación. La fosforilación de PLB por CaMKII en el sitio Thr¹⁷ al igual que la fosforilación por la proteína kinasa A (PKA) en el sitio Ser¹⁶, contribuyen al secuestro de Ca^{+2} por el RS^[37].

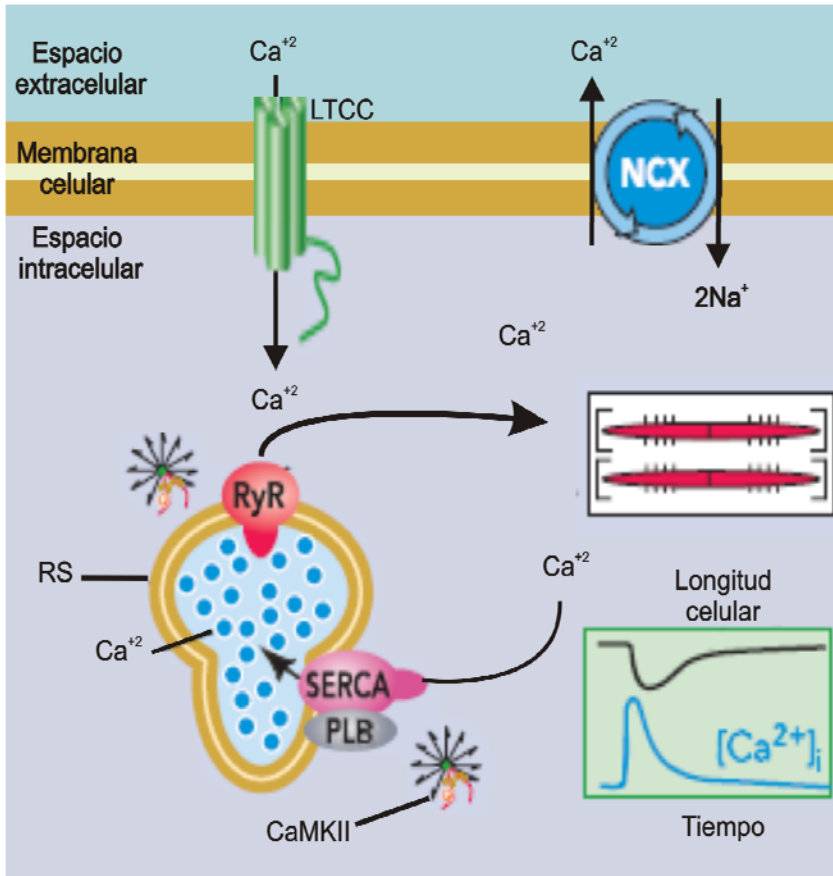


Figura I3: Acoplamiento éxito-contráctil. El esquema representa el conjunto de eventos que se suceden luego de la apertura de los canales tipo L de Ca^{+2} (LTCC) por despolarización de la membrana plasmática, y entrada de Ca^{+2} que induce la liberación del ion desde el retículo sarcoplásmico (RS) a través de los canales de rianodina (RyR) del mismo. Esto genera un aumento transitorio del Ca^{+2} intracelular (Ca^{+2}_i) y como consecuencia una contracción a nivel de los miofilamentos. El Ca^{+2} es luego despedido del espacio citosólico, principalmente por su retoma a través de la ATPasa dependiente de Ca^{+2} del RS (SERCA, que es controlada por fosfolamban, PLB), y también por su extrusión a través del intercambiador de Na^+ y Ca^{+2} (NCX). *Figura modificada de Couchonnall & Anderson, PHYSIOLOGY, 2008.*

2. La respuesta inotrópica del miocardio a la AngII depende de la concentración de la hormona en este tejido, de la duración del estímulo y de la especie. Así, se describe que la hormona puede producir un aumento de la contractilidad^[38, 39], una disminución de la misma^[40] o no causar alteraciones en el inotropismo^[41].

Estos efectos variables parecen ser dependientes de la especie y la condición experimental^[41].

Es conocido que las variaciones en el inotropismo, inducidos por una intervención dada pueden deberse tanto a cambios en la concentración del Ca^{+2}_i como a alteraciones en la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{+2} ^[42]. Un incremento del Ca^{+2}_i por AngII podría ocurrir por aumento de la corriente de Ca^{+2} (I_{Ca}) a través de los canales de Ca^{+2} tipo L^[43] y/o por la activación del modo revertido del NCX^[44] o el enlentecimiento de su modo directo^[45]. Un aumento del Ca^{+2} por estimulación de I_{Ca} se ha observado a concentraciones altas de AngII (1 μM), en miocitos adultos de gato, sin cambios en la respuesta al Ca^{+2} de las proteínas contráctiles^[39]. El aumento de la I_{Ca} es mediado por PKC^[46, 47]. Por otro lado, en miocitos de rata adulta, la AngII a altas concentraciones produce un efecto inotrópico negativo^[40]. Este efecto puede ser mediado por una disminución de I_{Ca} , de acuerdo a lo descrito^[48] y/o por una disminución en la respuesta al Ca^{+2} de las proteínas contráctiles, dependiente de p38 MAPK^[40]. Respaldo esta posibilidad, se ha descrito que la p38 MAPK activaría la proteína de shock térmico 27 (HSP 27) que la traslocaría a las líneas Z del sarcómero^[49]. La HSP 27 causaría una disminución de la activación de la ATPasa de la actomiosina, produciendo por este mecanismo una menor respuesta al Ca^{+2} de las proteínas contráctiles y una depresión de la contractilidad^[49, 50].

Concentraciones bajas de AngII (≤ 1 nM) producen un aumento del inotropismo por incremento del Ca^{+2}_i , a través de un mecanismo mediado por una compleja cadena de eventos, que involucra a la endotelina, liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS), activación del intercambiador Na^+/H^+ (NHE-1) y del NCX. Es interesante que esta cadena de eventos explique la fase lenta del aumento de la fuerza que se produce luego del estiramiento del músculo cardíaco (Ley de Starling del corazón). La misma cadena de eventos ha sido relacionada también con mecanismos involucrados en el desarrollo de hipertrofia cardíaca^[51].

Es pues entonces, que la hormona induce no sólo variaciones de la contractilidad sino que también, y dependiendo de la duración del estímulo, activaría señales que involucran la

expresión de genes que llevan a la expresión de proteínas involucradas en el remodelamiento e hipertrofia del corazón^[51, 52].

AngII y apoptosis miocárdica

Es conocido que la desregulación del SRAA y el incremento de la AngII circulante en distintos modelos animales concursan con incrementos en los eventos apoptóticos durante el desarrollo de insuficiencia cardíaca^[53, 54].

Desde hace ya más de una década se ha comenzado a relacionar la AngII con la apoptosis. Uno de los primeros trabajos referidos al tema fue el publicado por el grupo de Anversa, donde se relacionó la inducción a la muerte celular que genera la AngII en cardiomiocitos de rata, con la activación de la cascada apoptótica y fragmentación del DNA^[30, 55]. En este y otros trabajos se propone que la activación del receptor AT1 sería el desencadenante de la apoptosis producida por la hormona en cardiomiocitos de rata^[56]. Hasta donde nosotros conocemos, no se han documentado alteraciones que involucren muerte celular mediada por el receptor AT2 de AngII en cardiomiocitos, aunque sí se ha vinculado a este receptor con la muerte por apoptosis de líneas celulares neuronales^[57].

Como se mencionó antes, la AngII produce activación de la PKC. Si bien no es conocido específicamente el rol de la activación de PKC en la apoptosis, esta kinasa ha sido vinculada con el incremento de Ca^{+2}_i y la consecuente activación de endonucleasas Ca^{+2} -dependientes^[30]. Más aun, se ha vinculado la sobreexpresión de PKC en cardiomiocitos con moléculas involucradas en la apoptosis tales como el *citocromo c* mitocondrial y la caspasa3^[58] (Ver más adelante, muerte celular por apoptosis). Es así que la apoptosis que induce la AngII podría ser mediada por PKC y generarse de manera Ca^{+2} -dependiente^[30].

Por otro lado, existen vías apoptóticas de señalización independientes del Ca^{+2} que involucran PKC^[58], ROS^[59] y p38 MAPKs^[60]. Estas tres moléculas por separado han sido vinculadas con eventos apoptóticos. Como se verá después, tanto el Ca^{+2} como los ROS y la PKC podrían

activar otras moléculas mediadoras de apoptosis entre las cuales se encuentra la CaMKII, que ha sido descrita como mediadora de múltiples vías que culminan en apoptosis^[59] y que vamos a estudiar luego en detalle.

Bajo los conceptos ya enunciados, planteamos que no sólo la actividad del SRAA posee relevancia fisiológica de vital importancia, sino que la activación de este sistema, bajo condiciones especiales (patológicas) puede generar respuestas que se tornan perjudiciales para el organismo. En este escenario, el presente trabajo se propone dilucidar la cascada de señales por las que la AngII induce efectos deletéreos (apoptosis) en el corazón.

CaMKII

Isoformas, localización y características estructurales

El Ca^{+2} se encuentra formando parte de numerosas vías de señalización en distintos tipos celulares actuando como segundo mensajero. En algunos tipos celulares el Ca^{+2} induce la modulación de las quinasas dependientes de Ca^{+2} y calmodulina (CaMKs) que pueden asociarse reversiblemente al ión. Dentro de esta familia de quinasas se presentan la CaMKI, la CaMKIV y la CaMKII^[61]. Esta última es una serina/treonina quinasa de amplia distribución, codificada por cuatro genes separados (α , β , γ y δ). Las isoformas α y β predominan en tejido nervioso, en tanto que la isoforma β se presenta preponderante en el tejido muscular esquelético y las isoformas γ y δ se distribuyen en el resto de los tejidos^[61]. En el tejido cardíaco predomina la isoforma δ ^[61]. La isoforma δ presenta dos variantes de *splicing*: La δ_C que es predominantemente citosólica y la δ_B , que es predominantemente nuclear^[62, 63]. En la mayoría de los tejidos, la CaMKII existe como un oligómero de entre 8-12 subunidades. Cada uno de estos monómeros posee un peso de 50kD con 480 aminoácidos de extensión aproximadamente. Cada monómero está compuesto por tres dominios con funciones específicas (figura I4): un dominio con función catalítica, cercano al extremo N-terminal, uno con función regulatoria en la región media, en donde se encuentra el sitio de unión al complejo Ca^{+2} /calmodulina (Ca^{+2} /CaM) y donde se encuentran los sitios susceptibles de fosforilación y oxidación, de gran importancia para el mantenimiento de la actividad de la quinasa^[64, 65], y un tercer dominio cercano al extremo C-terminal, que es un dominio de asociación variable, que permite a los monómeros de la CaMKII asociarse entre sí o formar diversos complejos moleculares^[66].

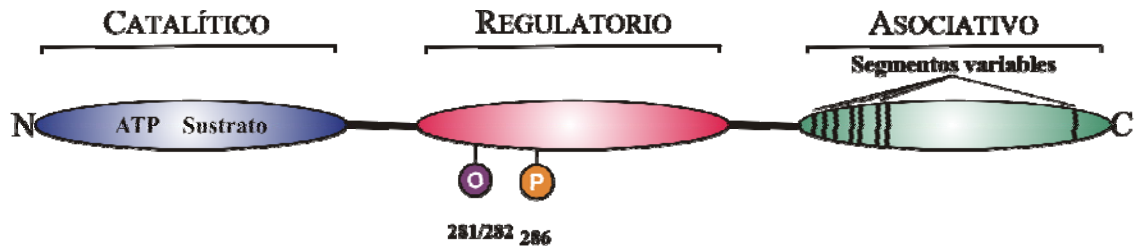


Figura I4: Esquema lineal que representa la molécula de CaMKII (consenso de las isoformas mencionadas). Separados por colores, el dominio catalítico en azul, el regulatorio en rojo y el de asociación en verde. También se representan con una P el sitio fosforilable, con O, el sitio oxidable y con un pequeño rectángulo en negro, las regiones variables por *splicing*.

El dominio catalítico se encuentra reprimido por el dominio regulatorio ya que se asocian por plegamiento de la molécula sobre sí misma (Figura I5), impidiendo que el complejo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ se una al sitio regulatorio.

Activación de la CaMKII. Mecanismos moleculares

La manera en que se activa la CaMKII es la siguiente (Figura I5): Cuatro iones de Ca^{+2}_i unidos a la CaM se fijan al dominio regulatorio, provocando la “apertura” o despliegue de la molécula y la liberación del sitio catalítico, que queda expuesto así al ATP y los sustratos. La CaMKII activada puede fosforilar distintos sustratos y además a los monómeros contiguos (autofosforilación). La autofosforilación tiene lugar en los residuos $\text{Thr}^{286/287}$ (la numeración precisa es dependiente de la isoforma). La fosforilación de este residuo no es esencial para la activación de la quinasa, pero tiene importantes consecuencias. La autofosforilación del residuo Thr^{286} aumenta la afinidad del complejo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ por la CaMKII, 10^5 veces^[67]; y además dicha fosforilación impide la reasociación con el dominio catalítico. Como resultado de esto la fosforilación del residuo Thr^{286} permite una actividad persistente de la CaMKII aun después de la disociación del complejo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ ^[66] (figura I5.A). Esta es la forma canónica de regulación de la quinasa, por activación por Ca^{+2} , autofosforilación y defosforilación por fosfatasas^[61, 66], fundamentalmente la fosfatasa tipo 1 (PP1). Esta liberación del grupo fosfato

en la posición Thr²⁸⁶ permite volver a la kinasa a su estado inactivo inicial por autoinhibición (figura I5.A).

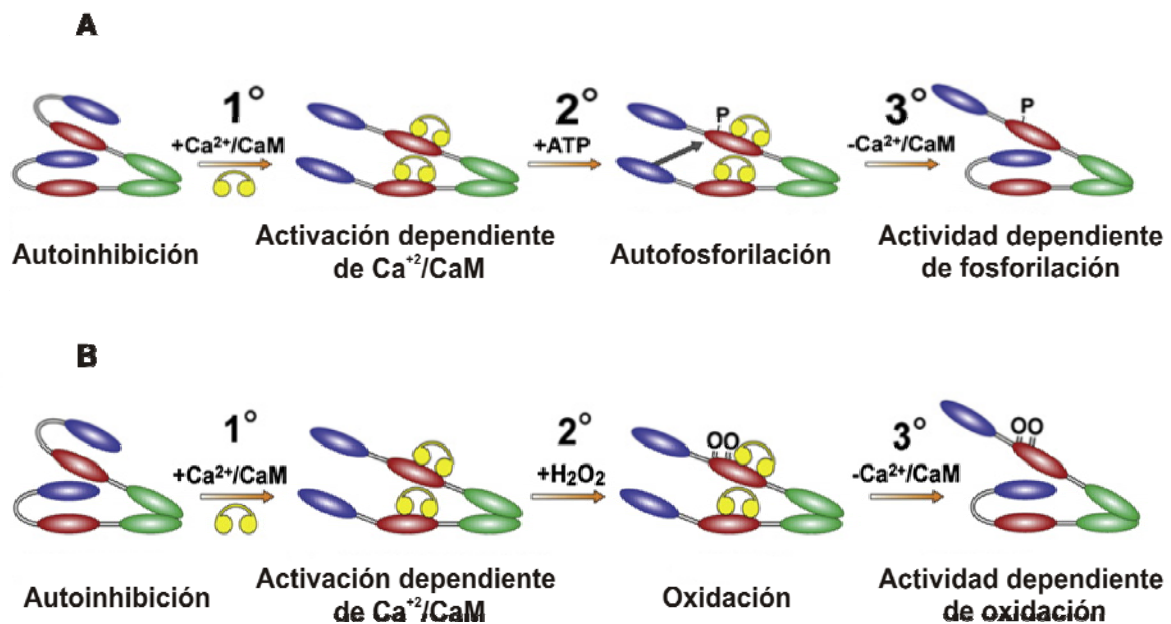


Figura I5: **A.** El esquema representa la forma de activación canónica de un dimero de CaMKII. Luego de la unión del complejo Ca^{2+} -CaM, se produce la activación de la kinasa dependiente de Ca^{2+}/CaM (1°). Esta activación puede ser sostenida por autofosforilación, luego de la cual no es requerida la asociación de Ca^{2+}/CaM (2° y 3°). **B.** Esquema que representa el mantenimiento de la activación de CaMKII en presencia de niveles altos de ROS. La oxidación de los residuos Metionina^{281/282}, previa activación por Ca^{2+} -CaM (1°), mantiene desplegada a la kinasa y sostiene así su activación, de la misma manera que lo hace la fosforilación del sitio Thr^{286/287} (2° y 3°). Figura modificada de Couchonnall & Anderson, *PHYSIOLOGY*, 2008.

Otras formas de activación de la CaMKII

Un hallazgo importante respecto a la activación de la CaMKII, fue el realizado por el grupo de Anderson (Universidad de Iowa, Iowa, IA, USA) quienes describieron la activación sostenida de la CaMKII por ROS^[65]. Niveles elevados de ROS causan una modificación oxidativa del par de residuos Met^{281/282} en el dominio regulatorio de la CaMKII, bloqueando la reasociación con el dominio catalítico y preservando de esta manera la actividad de la kinasa a través de un mecanismo similar y paralelo al de autofosforilación del sitio Thr²⁸⁶; para ello es necesario previamente la presencia del complejo Ca^{2+}/CaM que permita el despliegue de la molécula (Figura I5.B).

Experimentos *in vitro* en diferentes tipos celulares demostraron la posibilidad de activación de CaMKII mediada por PKC^[68], TNF α y radiación ultravioleta^[69]. El significado funcional de estos hallazgos y su posible vinculación con el miocardio no han sido explorados.

CaMKII en condiciones fisiológicas

Los requerimientos fisiológicos de la CaMKII en condiciones basales resultan difíciles de discernir ya que ratones transgénicos que carecen de la isoforma más importante de CaMKII en el corazón (CaMKII δ)^[70] y ratones con expresión de un péptido inhibitorio de la CaMKII a nivel del miocardio, no presentan alteraciones significativas en la función ventricular basal y en los diferentes parámetros del AEC^[71]. Estos hallazgos no indican sin embargo la ausencia de efectos de la CaMKII en condiciones basales, ya que en dichas condiciones es posible detectar activación de la kinasa (fosforilación del residuo Thr²⁸⁶, ver Resultados). En cambio es posible visualizar claramente el efecto de la CaMKII sobre distintos parámetros del AEC, una vez que la kinasa ha sido activada. La CaMKII se activa en respuesta a señales generadas a través de los receptores acoplados a proteína-G (GPCR): 1. Receptores α_1 -adrenérgicos, receptores de endotelina y AngII, que inducen el acoplamiento de los GPCR a la proteína Gq. Mecánicamente, este efecto podría ocurrir a través de la liberación de Ca⁺² de los depósitos perinucleares sensibles a IP₃^[22] o por aumento del Ca⁺²_i a través de los canales de Ca⁺² o el NCX^[45]. 2. Receptores β -adrenérgicos (β -AR) acoplados a GPCR estimuladora, Gs. La activación de estos receptores forman AMP cíclico (AMPc), activan a la PKA con un concomitante aumento del Ca⁺²_i que activa a la CaMKII^[37, 72]. La estimulación β (ej. Isoproterenol), produce además la activación de la CaMKII indirectamente, a través del factor de intercambio de nucleótido de guanina, (Epac), una proteína directamente activada por AMPc^[73].

La activación de CaMKII modula a través de la fosforilación, varias proteínas involucradas en el manejo del Ca^{+2}_i y el AEC, incluyendo a los RyR^[74], la PLB^[37, 72, 75], y los canales de Ca^{+2} tipo L^[76], con múltiples consecuencias funcionales (Figura I3). El RyR, es directamente fosforilado por CaMKII fundamentalmente en el sitio Ser²⁸¹⁴^[74, 77]. Aunque el significado funcional de este sitio es discutido, experimentos de nuestro laboratorio demostraron que la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ por CaMKII durante la estimulación β -adrenérgica favorece la liberación de Ca^{+2} por el RS, contribuyendo por lo tanto al efecto inotrópico positivo de esta estimulación^[74]. Por otra parte, la fosforilación de PLB por CaMKII en el sitio Thr¹⁷ contribuye al efecto relajante de la estimulación β -adrenérgica y por lo tanto al aumento de Ca^{+2} en el RS y al efecto inotrópico positivo de la estimulación simpática^[37]. Respecto a los canales de Ca^{+2} tipo L, la CaMKII activa a la I_{Ca} (facilitación de la I_{Ca}). Funcionalmente esta facilitación consiste en una escalera positiva de I_{Ca} , en la que la amplitud de la misma aumenta y la inactivación se enlentece a lo largo de una serie de pulsos de estimulación^[76, 78]. Es decir, la actividad de la CaMKII es importante en la regulación de actividades fisiológicas mediadas por Ca^{+2} , como por ejemplo la respuesta de lucha y huida frente a la estimulación simpática. Además de los ya mencionados canales de Ca^{+2} , la CaMKII puede fosforilar otros canales tales como los canales de Na^{+} ^[79] y de K^{+} ^[80]. El impacto integrado de estas acciones de la CaMKII sobre las propiedades del potencial de acción (tales como configuración, duración, etc), resulta complejo. Por ejemplo, la activación de la CaMKII aumenta la I_{Ca} y la corriente tardía de Na^{+} , acciones que tienden a prolongar la duración del potencial de acción; pero además también aumenta ciertas corrientes de K^{+} que tienden a acortar la duración del mismo. Aunque lo dicho es una sobresimplificación, resulta útil para apreciar que estos cambios dependientes de CaMKII pueden impactar en las características regionales de los potenciales de acción y producir arritmias (ver más adelante).

La activación de la CaMKII en las cercanías del núcleo es importante en la modulación del acoplamiento excitación-transcripción (AET). Aunque no vamos a detallar esta función, es importante mencionar que la actividad aumentada de la CaMKII, puede provocar alteraciones del AET que llevan a la hipertrofia (ver más adelante).

La CaMKII en situaciones patológicas

En condiciones patológicas la CaMKII aparece como una importante señal de enfermedad. La actividad de la CaMKII está aumentada en la enfermedad cardíaca donde puede contribuir, a través de un AEC y AET defectuosos, a las arritmias, la hipertrofia patológica y la apoptosis/necrosis en diferentes situaciones tales como la insuficiencia cardíaca, la isquemia/reperfusión y la estimulación con AngII^[81], como lo analizaremos en Resultados.

Por ejemplo, el aumento en la fosforilación por CaMKII de los canales de RyR del RS aumenta la liberación de Ca^{+2} durante la diástole (Ca^{+2} sparks o “chispas” de Ca^{+2}) que, además de deplecionar al RS, puede inducir una liberación de Ca^{+2} desde los canales vecinos generando una onda de Ca^{+2} . Este Ca^{+2} se extruye por el NCX aumentando la entrada de Na^{+} y originando una despolarización de la membrana celular (despolarización tardía, por ocurrir luego de que termina el potencial de acción, DADs), que si llega al umbral, provoca un latido prematuro^[66, 81, 82] (Figura I6). El aumento de la pérdida de Ca^{+2} en diástole puede ser responsable no sólo de arritmias sino, al menos en parte, de la pérdida en la contractilidad, como ocurre en la insuficiencia cardíaca y de apoptosis/necrosis, ya que el Ca^{+2} perdido podría producir sobrecarga de Ca^{+2} a nivel mitocondrial. Se ha relacionado también la hiperactividad de la CaMKII, con un aumento en la hiperfosforilación de los canales de LTCC, en la subunidad β específicamente. Este cambio sobre los LTCC genera un incremento en la I_{Ca} lo que predispone a una temprana despolarización de la membrana, EADs^[66].

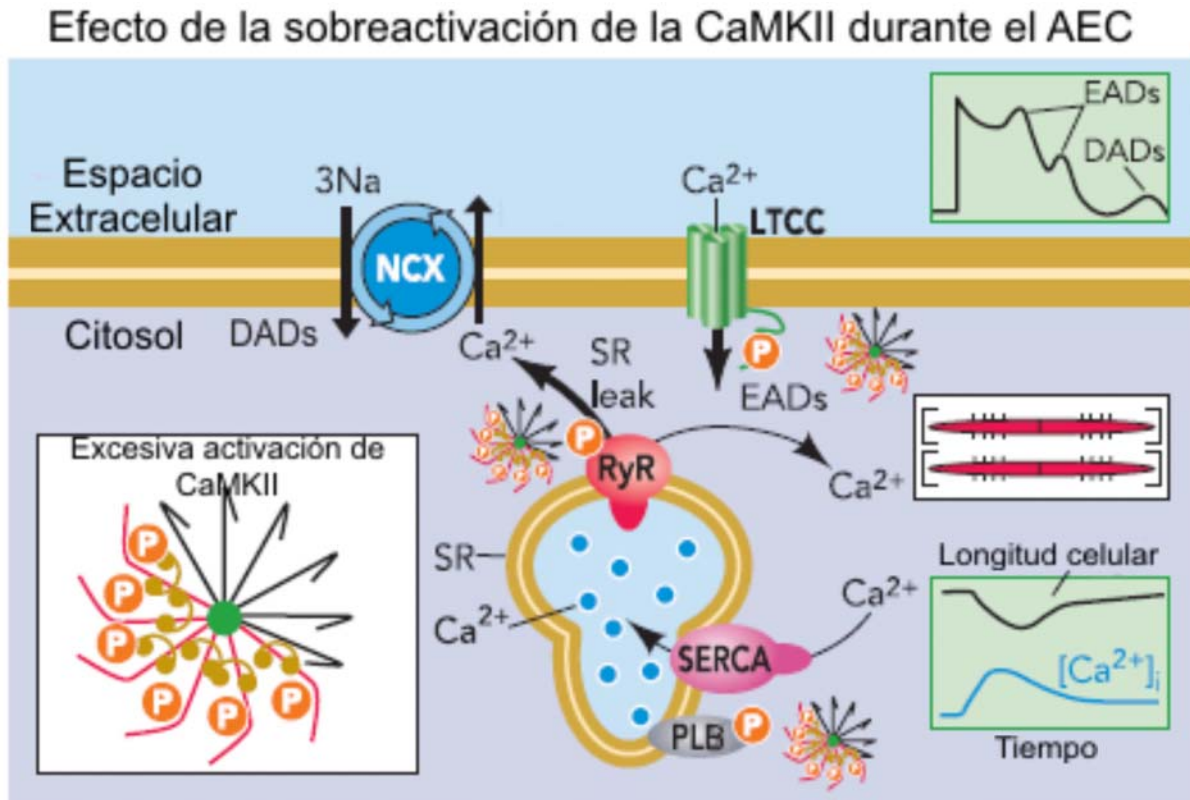


Figura 16: Efecto de la sobreactivación de la CaMKII en condiciones patológicas. El esquema representa los efectos de la mayor activación de la CaMKII, sobre las proteínas blanco de la kinasa. Las consiguientes alteraciones en el manejo del Ca²⁺ pueden generar EADs y DADs, entre otras modificaciones. *Figura modificada de Couchonnal & Anderson PHYSIOLOGY, 2008.*

MUERTE CELULAR.

Desde que una célula se divide hasta que culmina con su especialización en un tejido particular, pasa por numerosos eventos de control que le permiten generar un patrón de diferenciación propio del tejido que le dio origen, a través del cual podrá desempeñar una función fisiológica determinada. Cuando una célula no puede desempeñar sus funciones fisiológicas en el tejido en el cual está circunscrita, se la considera disfuncional y su existencia en el tejido perjudica al entorno celular. Una célula disfuncional, ya sea por pérdida de su integridad genómica o por incapacidad para responder ante las demandas de su entorno, debe morir.

Conjuntamente con la inducción de muerte celular, existe un gran número de mecanismos que tratan de rescatar a la célula, reparando o eliminando complejos moleculares y hasta organelas defectuosas enteras, por autofagia. En caso de no poder solventar el daño, la célula entra en una vía de muerte donde se pone en juego el comienzo de una cascada de señalización de muerte que puede ocurrir por necrosis o apoptosis. Describiremos en más detalle la vía apoptótica que es el tipo de muerte celular que estudiamos en este trabajo de tesis.

APOPTOSIS

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de control que ocurre tanto durante el desarrollo embrionario como en tejidos adultos, en eventos de remodelación o regeneración de los mismos. Este mecanismo está implicado en la homeostasis de la masa tisular al controlar el número de células en los eventos proliferativos, en la selección de unidades funcionales en el desarrollo de tejidos, en el desarrollo del sistema inmune y en la eliminación de células infectadas por un patógeno intracelular. Podemos dar como ejemplos de apoptosis fisiológicas en cordados superiores, la selección en el sistema inmune durante el desarrollo: es el caso de la eliminación de los linfocitos inoperantes o autorreactivos a receptores propios. Los linfocitos T

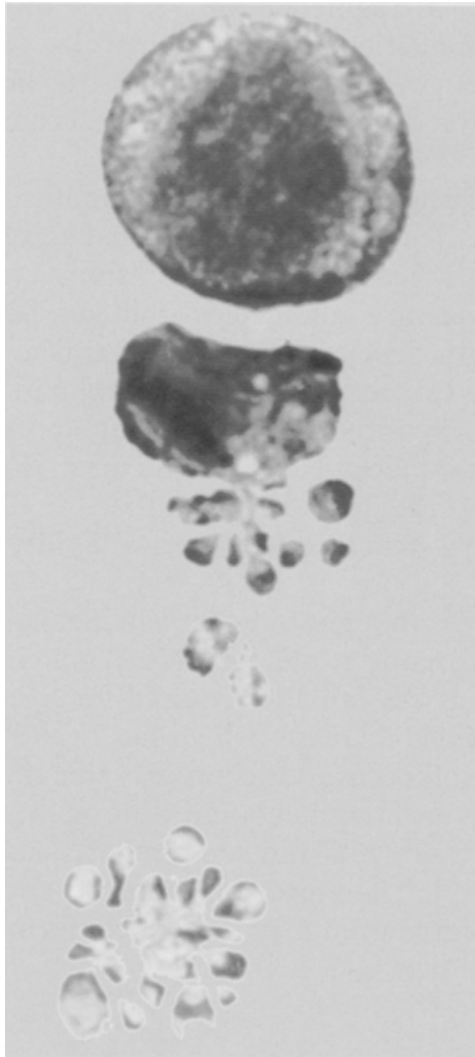
citotóxicos y *natural killer* inducen apoptosis en distintos blancos celulares en la respuesta inmune innata y adquirida en respuesta a patógenos intracelulares, células tumorales o células trasplantadas.

Asimismo, la apoptosis puede iniciarse intracelularmente de forma “altruista”, en distintos tejidos adultos en respuesta a una injuria o estrés celular, errores genéticos, o activaciones de vías apoptóticas intracelulares por pérdida de la integridad genómica, lo cual constituye un importante mecanismo para la prevención de oncogénesis. En condiciones patológicas, la inducción de la apoptosis puede ser generada por factores externos o internos al entorno celular. Entre los factores externos podemos mencionar la estimulación de los receptores de muerte, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral α (TNF α), implicado en numerosas patologías tales como arterioesclerosis, isquemia-reperfusión e infartos de numerosos tejidos^[83] y en la diabetes mellitus (muerte de los endotelios de microvasculaturas)^[84], entre otras.

Entre los factores internos que pueden inducir apoptosis se pueden mencionar las infecciones por patógenos, el incremento de Ca^{+2}_i o de los ROS^[85] o la deposición de sustancias tóxicas para la célula, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer^[86].

Descripción morfológica de una célula apoptótica

En 1972 Kerr^[87] mostró que en la vía apoptótica se suscitan cambios morfológicos tales como el encogimiento celular, el burbujeadado de la membrana plasmática, la condensación y fragmentación del núcleo y finalmente la formación de vesículas llamadas *cuerpos apoptóticos*^[88] (figura I7^[89]). Estos cuerpos apoptóticos, tienen intacta la membrana, hecho que permite asegurar a la *noxa* y favorecer su eliminación por el sistema inmune.



Podemos dividir esta serie de sucesos en eventos citosólicos y nucleares, según el espacio subcelular donde éstos ocurren.

Figura 17: En la parte superior de la figura se puede observar la morfología típica de una célula de la línea HL60 en condiciones normales. Tras una ligera exposición a la luz ultravioleta la célula comienza un proceso de apoptosis. En el centro de la fotografía se muestra la *retracción celular* acompañada por *burbujeo de la membrana*, marcadores típicos de la muerte por apoptosis. En la parte inferior de la fotografía observamos la fragmentación de la membrana y la generación de los *cuerpos apoptóticos*.

A partir de aquí los cuerpos apoptóticos deberían continuar siendo fagocitados por macrófagos específicos de tejidos, de forma tal de no exponer los antígenos al medio celular circundante. *Figura tomada del libro Gremm, GENETIC OF APOPTOSIS, 2003.*

Eventos citosólicos

Dentro de los eventos citosólicos podemos diferenciar dos grandes grupos, de acuerdo a donde se originen las señales: *la vía apoptótica Tipo I* o extrínseca, mediada inicialmente por la superfamilia de los receptores de muerte, y la *Tipo II* o intrínseca, mediada por las mitocondrias^[90]. Cada una de ellas posee una cascada de señalización propia aunque pueden entrecruzarse entre sí a lo largo de sus respectivos segundos mensajeros (Figura I8). Desde el espacio extracelular, la célula recibe un conjunto de señales y factores que desencadenan una respuesta intracelular. Algunas de estas respuestas son referidas al crecimiento y a la división, otras, a la muerte. Dentro de la célula existe un conjunto de moléculas que generan una respuesta apoptótica y otras que la previenen, siendo el equilibrio entre estos factores lo que determina la viabilidad de la célula.

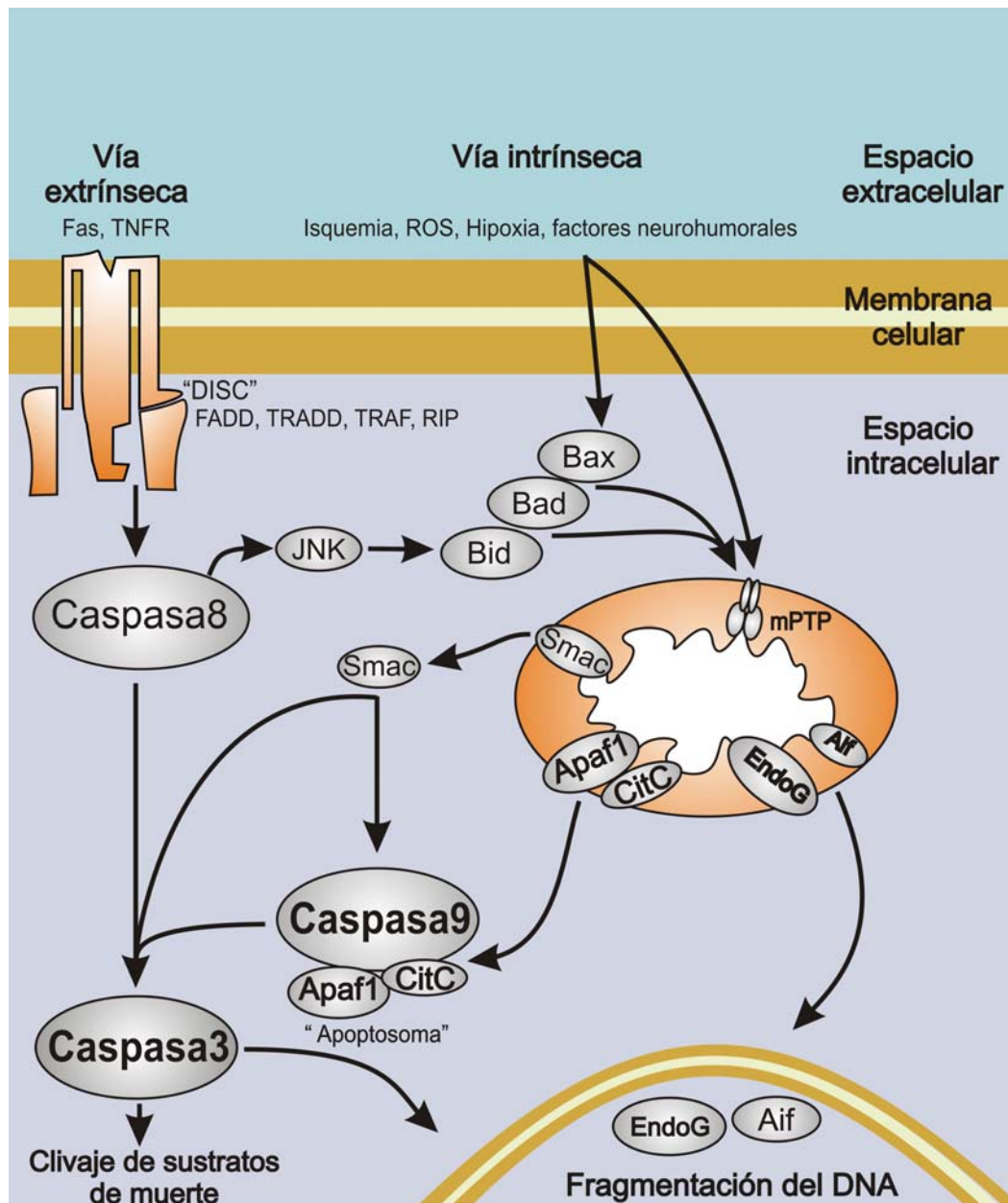


Figura 18: Esquema resumido de las vías apoptóticas *extrínseca* o *intrínseca* mediada por receptores de muerte o mitocondrias, respectivamente. Para ambas vías la molécula efectora final es la caspasa3 y las endonucleasas, que median el clivaje de elementos funcionales de la célula.

La vía apoptótica extrínseca o *Tipo I* (Figura 18) es un sistema mediado por receptor, que prototípicamente está activado por dos superfamilias de receptores: los del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) y los receptores Fas. La unión del ligando a estos receptores induce su trimerización y el reclutamiento de las llamadas moléculas adaptadoras al dominio de muerte, por ejemplo FADD, TRADD, TRAF y RIP, que son las encargadas de generar la traducción de señales del receptor activado^[91], formando el complejo de señalización inductor de muerte o

DISC^[92]. La formación de este complejo recluta al *iniciador* de la vía de las caspasas en la vía extrínseca, la caspasa8. Subsecuentemente, caspasa8 por autoproteólisis se activa, quien entonces cliva y activa al efector final de la vía de las caspasas, la caspasa3. Luego de la activación de los receptores, se induce la activación de moléculas efectoras y de segundos mensajeros, tales como las familias de las Proteínas Kinasas Activadoras Mitogénicas (MAPK), los factores nucleares kappa de cadena liviana activadores de células B (NF-κB) y las kinasas de la familia Akt. Estos segundos mensajeros son los encargados de activar la expresión y/o fosforilar a las proteínas efectoras pertenecientes a las familias de proteínas pro o anti-apoptóticas. Estos dos grupos de proteínas generan el mayor control de la vía apoptótica inducida por receptores de muerte. El mecanismo apoptótico mediado por receptores de muerte se hace presente en el miocardio y es significativo, en los procesos donde se exagera la respuesta inflamatoria del mismo^[92].

La vía apoptótica intrínseca o *Tipo II* está mediada por las mitocondrias. Hasta casi el final del siglo XX, se consideraba que la función exclusiva de las mitocondrias, era la de proveer la energía a la célula, maximizando la producción de la misma a través de la fosforilación oxidativa. Alrededor de 1995 se entendió, sin embargo, que las mitocondrias tenían una segunda función crucial: el control de la muerte celular. El concepto de que la ocurrencia de muerte celular, tanto en su forma fisiológica como patológica, está íntimamente ligado a la mitocondria, resulta contraintuitivo (¿Cómo puede explicarse que la función de la mitocondrias, fuentes de energía y de vida se pervierta para servir a propósitos letales?) y fue inicialmente controvertido. Sin embargo en la actualidad dicho concepto está sustentado por infinidad de evidencias experimentales y es incuestionablemente aceptado.

La vía intrínseca es la preponderante en miocitos cardíacos y es iniciada por estímulos como la isquemia y reperfusión^[93], hipoxia^[94] y estrés oxidativo^[59]. Los estímulos pro-apoptóticos estimulan la permeabilidad del poro de transición mitocondrial, provocando la pérdida de

potencial entre las membranas, junto con el extravasado de factores intramitocondriales hacia el citosol^[95]. La permeabilización de la mitocondria se produce por la formación de un poro entre las membranas propias de la organela, evento mediado por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa, la adenosina nucleótido translocasa (ANT) en la membrana interna y la ciclofilina-D perteneciente a la matriz mitocondrial de la organela^[95, 96]. La permeabilización de la mitocondria libera un notable número de proteínas que facilitan la señal apoptótica, como citocromo-C (CitC), Smac/DIABLO, endonucleasa G (EndoG) y factor inductor de apoptosis (IAPs), entre otros (figura I8). La liberación de CitC se une con la proteína citoplasmática cofactor-1 apoptótico activador de proteasa (Apaf1) y reclutan a la caspasa9, induciendo su activación (complejo denominado Apoptosoma^[90, 97]). El apoptosoma induce la activación de la caspasa3, el efector final de la vía de las caspasas. El complejo Smac/DIABLO facilita esta activación de caspasas^[98] ya que secuestra proteínas inhibitorias de caspasas; mientras que EndoG y AiF liberadas desde la mitocondria son translocadas al núcleo, y son ellas directa o indirectamente quienes facilitan la degradación del DNA^[99]. Por su parte, la caspasa3 activada como efectora final de la vía intrínseca o extrínseca actuará clivando o facilitando la degradación del aparato contráctil, todo contenido citosólico y la degradación del material nucleico como se detallará más adelante.

Existen un conjunto de familias proteicas que regulan la apoptosis. Miembros de las mismas son los que interactúan en las distintas vías y, hasta a veces, su interacción entrecruza las vías que median la apoptosis. Citaremos algunas características de ellas, a fin de comprender su función en la regulación de la apoptosis. La primera de ellas, es la familia de proteínas BCL-2, con al menos 15 miembros identificados, subdividida en tres sub-familias: la subfamilia formada por *Bcl2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-W*, *NR-13* (antiapoptótica); la subfamilia que comprende *Bak*, *Bax*, *Bcl-X_s* (proapoptótica)^[100]; y la subfamilia formada por *Bim*, *Bid*, *Bad* (proapoptótica)^[101]. Las proteínas pro-apoptóticas son las que activan (a veces no

directamente) y modulan a las proteasas de la familia de las calpaínas, las caspasas y las catepsinas. El entrecruzamiento entre la vía *Tipo I* y la *Tipo II* pueden generarse a varios niveles como por ejemplo la estimulación de Bax por JNK^[102] o Bid por la caspasa8 quien también activa a la caspasa3. La activación de la caspasa3 (mediante la caspasa8 activada por TRAF-2) genera la activación de Bid.

Por otro lado, la asociación Bax/Bad puede formar un poro, induciendo la liberación del CitC como evento iniciador de la cascada apoptótica mediada por la mitocondria, e incrementar los niveles de ROS^[103] que son liberados desde la misma.

La familia MAPKs cumple un rol importante en la regulación de la apoptosis mediada por las mitocondrias. En esta familia se incluyen las proteínas kinasas de regulación extracelular (ERK), JNK y p38 MAPK, entre otras. Algunas de las MAPKs interactúan con miembros de la familia de proteínas BCL2 en los eventos apoptóticos mediados por mitocondrias. Como inductor de la apoptosis, las MAPKs pueden inducir la activación de Bax mediada por JNK, y como respuesta anti-apoptótica ERK puede activar Akt quien inhibe a Bad y estimula ARC (dominio de reclutamiento de caspasas) e IAPs (péptido inhibidor de la apoptosis)^[90].

Las caspasas comprenden una familia de proteasas multigénicas que están relacionadas con la ejecución de la apoptosis, tanto para la vía *Tipo I* como para la *Tipo II*^[104]. La familia de las caspasas presentan dos características fundamentales, son sintetizadas como pro-enzimas y una vez activas reconocen una secuencia de clivaje tras un residuo aspartato^[104]. La familia de las caspasas está compuesta por 10 miembros de los cuales la gran mayoría son componentes de la vía de señalización y sólo algunos miembros son efectores^[88]. Entre los sustratos, se pueden destacar componentes del citoesqueleto, citoesqueleto contráctil, proteínas de reparación del DNA y factores reguladores de la transcripción así como factores de traducción, entre otros^[104].

Otra de las familias efectoras son las calpaínas, proteasas en cisteína presentes en todos los tipos celulares de mamíferos y activadas por influjos importantes de Ca⁺². Se diferencian en

dos grandes familias que difieren en su secuencia, las μ -calpaína o calpaína *I* y las m-calpaínas asociadas al RS o calpaínas *II*, ambas relacionadas con la apoptosis^[105].

Durante la apoptosis ocurre un gran número de reacciones enzimáticas, digestión de proteínas y eventos de oxidaciones locales, que producen focos de acidificación. En estos focos se produce la permeabilización local de lisosomas sosteniendo la acidez alcanzada, haciendo activas en parte, a las enzimas lisosomales quienes también terminan degradando los componentes del citosol. La acumulación de protones genera un descenso del pH a valores 6.6-6.9. Durante este proceso de acidificación celular se produce la activación de DNAsas ácidas (ver más adelante), activadas a este rango de pH. Durante el proceso apoptótico, los lisosomas pueden permeabilizarse y liberar un gran número de hidrolasas ácidas (fosfatasa, nucleasas, proteasas, glicosilasas, peptidasas sulfatasas, lipasas, catepsinas, entre otras), capaces de digerir una enorme cantidad de macromoléculas. Algunos autores proponen este evento de permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) como el disparador de apoptosis^[106, 107].

Con la activación de la caspasa3 se sucede un conjunto de clivajes mediados por la proteasa activa. El último de los eventos apoptóticos que se produce en el citosol es la degradación del citoesqueleto dirigida por caspasa3 y otras proteasas inespecíficas^[108]. Las Rho GTPasas rigen la cinética del citoesqueleto, sobre todo de la actina. Estas GTPasas son reguladas por las quinasas de Rho GTPasas (ROCK), que presentan dos isoformas la I y la II. Las ROCK II son clivadas por la caspasa3 en tanto que esta proteasa activaría a las ROCK I durante la apoptosis^[109]. Se responsabiliza a las ROCK I del burbujeo de la membrana, y conjuntamente con ROCK II de generar los cuerpos apoptóticos^[110]. El fenómeno antes descrito junto con la degradación del resto del citoesqueleto genera un fenotipo propio de la apoptosis, el burbujeo de la membrana, que representa la formación de vesículas con el contenido intracelular parcialmente digerido.

Eventos nucleares

Durante la apoptosis, con la activación de proteasas, son clivados sustratos específicos entre los cuales se encuentran múltiples componentes estructurales de los compartimientos subcelulares como ya hemos mencionado, y también son clivados represores de factores de transcripción pro-apoptóticos y represores de DNAsas. Dentro de los eventos de clivaje de represores de DNAsas podemos mencionar los dirigidos por caspasas. A las DNAsas inducidas por caspasas se las denomina CAD. Su estructura es similar a la de una chaperona y median la respuesta de degradación del DNA en la vía apoptótica. A las CAD DNAsas se las encuentran normalmente reprimidas por una familia inhibidora de CAD (ICAD), que las *arrestan* en el citosol. La modificación de las ICAD por la caspasa3 promueve la liberación y activación de las CAD DNAsas^[111]. Por otro lado, también se encuentra presente una gran familia de DNAsas endonucleasas no dirigidas por caspasas. Este grupo de DNAsas son activadas por la granzima A, las GAAD, y las L-DNasa II^[112, 113].

Como ya hemos mencionado durante el desarrollo de los eventos citosólicos de la apoptosis se produce una disminución del pH. Este descenso de pH determina la activación de una familia de DNAsas llamada DNAsas II. Toda la familia se caracteriza por ser endonucleasas DNAsas de doble cadena que corta oligonucleótidos por los puentes 3'P y por su marcado incremento de actividad durante la acidosis celular^[111].

Existen también otras endonucleasas activadas, no mediadas por caspasas, de las que no está aún en claro su vía de activación. Podemos mencionar a las Mg-endonucleasas o endonucleasas G (endoG) liberadas desde la mitocondria una vez abierto el mPTP, que son las encargadas de la degradación del DNA de esta organela^[99]. Todas las DNAsas luego de su activación y translocación del citosol al núcleo tendrán como blanco el DNA. Las DNAsas producen una fragmentación específica del material genético en fragmentos de entre 180-200 pares de bases (pb), contribuyendo a la condensación del material intranuclear. Esto es evidenciable en

ensayos en geles de agarosa generando un patrón de fragmentación en escalera denominado *DNA Laddering*, donde los fragmentos de igual peso molecular se agrupan^[89] (figura I10A). Por otro lado se genera un patrón de dispersión de estos pequeños fragmentos tras la tinción intercalar del bromuro de etidio en un ensayo denominado *cola de cometas* en agarosa^[89] (figura I10B). Estos ensayos permiten diferenciar eventos de fragmentación del DNA tras la acción de DNAsas inespecíficas por una injuria que provoque un daño irreversible para la célula. Basados en este principio de fragmentación del material genético, existe un ensayo muy utilizado para denotar el evento apoptótico, denominado el ensayo de marcado *in situ* por dUTP marcado en los extremos del DNA fragmentado (del inglés *Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*, TUNEL). Este método, detecta el DNA fragmentado de la célula apoptótica al incorporar a través de la transferasa terminal dUTPs marcados en los sitios 3'-hidroxilo-terminales de todos los fragmentos de cromatina, lo que permite elongar la cadena 3'OH. El marcado puede ser por fluorescencia, por la asociación de una enzima que catalice una reacción química con la formación de solutos no disociables (figura I10C) o bien por análogos de bases como la 5-bromo 2'-deoxiuridina-trifosfato y la subsecuente detección con anticuerpos por inmunohistoquímica. El DNA marcado en las células sanas posee sólo dos extremos terminales por cromosoma, por lo que incorpora menor cantidad relativa de nucleótidos marcados. Esto genera un fondo de marcación que puede o no ser visualizable. A su vez se puede utilizar conjuntamente el marcado de los núcleos totales, dependiendo de la microscopía utilizada, para destacar los núcleos negativos para esta tinción de TUNEL^[114].

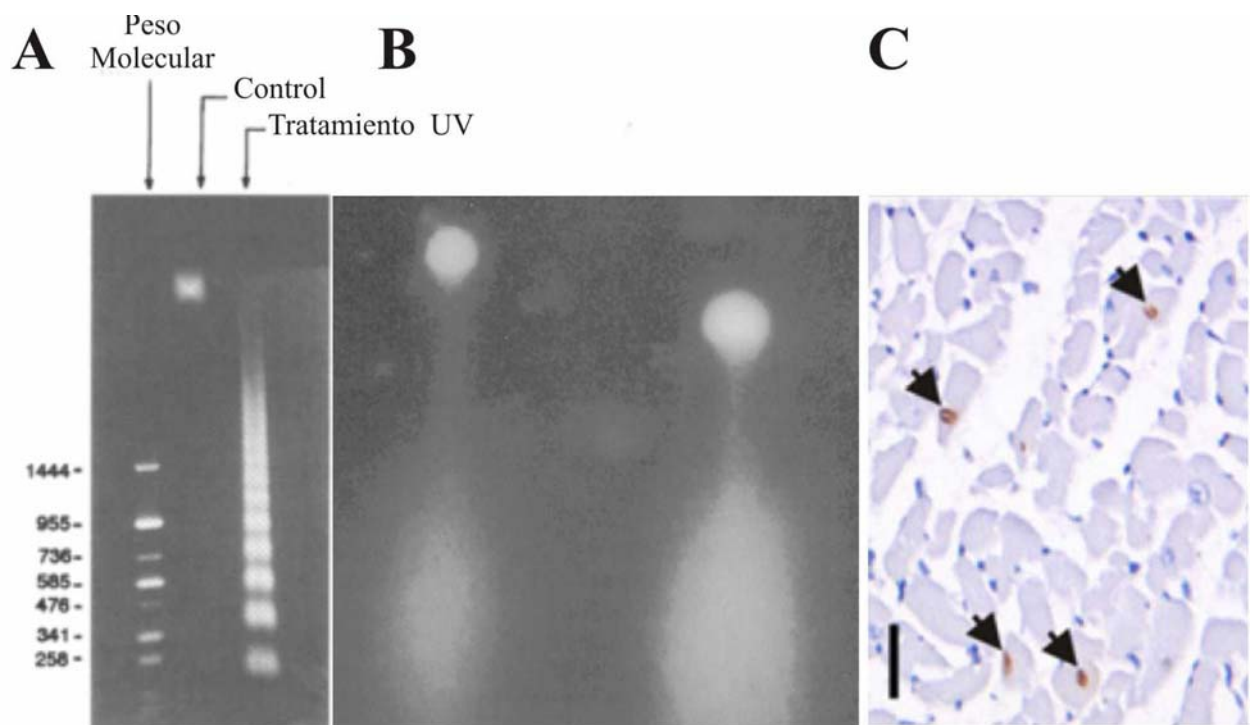


Figura 110: Indicadores de fragmentación del material genética. **A** *DNA laddering*; se observa la aparición de la fragmentación del DNA por inducción apoptótica tras la exposición a luz UV en la tercera calle del gel. **B** *Cola de Cometas*, se observa en la parte inferior la migración de los fragmentos de DNA como “chorreado” formando una cola de cometa. Estas células fueron expuestas a periodos crecientes de luz UV (de izquierda a derecha) y se las hizo correr a través de un campo magnético separándose en la parte superior los núcleos, y en la inferior las fragmentos del DNA generados por la ionización. *Figura modificada del libro GENETIC OF APOPTOSIS, Greem, 2003.* **C** *TUNEL*, se puede observar en este panel las células cardiacas de rata marcadas (con el núcleo de color naranja) positivamente para la técnica de TUNEL señaladas por las flechas, en contraste con la tinción de hematoxilina para núcleos. *Foto de Salas et al. J Mol Cell Cardio, l 2010.*

Objetivo

OBJETIVO

El presente trabajo propone conocer el rol de la CaMKII en la vía de señalización que conduce a la apoptosis inducida por AngII.

Hipótesis de Trabajo

- Nuestra hipótesis de trabajo es que la CaMKII está involucrada en la muerte celular por apoptosis inducida por AngII en el miocardio.

Objetivos específicos

PARTE 1

- Ratificar la inducción de apoptosis por AngII en nuestros preparados experimentales, a través de parámetros morfológicos, inmunohistoquímicos y bioquímicos.

PARTE 2

- Determinar si la CaMKII participa en la vía apoptótica inducida por AngII y en ese caso, investigar la cascada de señales intracelulares involucradas en su activación, realizando ensayos con inhibidores farmacológicos específicos de los posibles mediadores intracelulares, en combinación con medidas de Ca^{+2} intracelular y ROS.

PARTE 3

- Determinar los blancos moleculares de la CaMKII, a través de los cuales la vía apoptótica se hace efectiva.

Materiales y

Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos biológicos

Como modelos biológicos se utilizaron tres especies distintas: el gato, la rata y el ratón. La razón del uso de cada una de estas especies se detalla brevemente a continuación. Como hemos descrito previamente, el gato y la rata presentan una respuesta contráctil diferente ante la estimulación aguda con AngII: En el gato la respuesta inotrópica a la AngII es positiva^[39], en tanto que en la rata es negativa^[40]. Estos resultados plantean rutas de señalización distintas para cada especie, como ha sido en parte demostrado por nuestro y otros laboratorios (ver Introducción). En este trabajo nos interesó establecer la posible mediación de CaMKII en el efecto apoptótico de la AngII y, si dicha mediación ocurre, la forma en que la CaMKII es activada en esta cascada apoptótica, utilizando especies donde la hormona regula respuestas contráctiles dependientes del Ca^{+2} (gato) o independientes del ion (rata).

Los ratones que se utilizaron en este trabajo constituyen una cepa de ratones transgénicos, los AC3^[115, 116]. Esta línea comprende los ratones AC3I, que expresan un péptido inhibidor de la CaMKII de manera constitutiva (bajo el control de un promotor cardíaco), y sus pares controles, que expresan un péptido de igual longitud y cuya secuencia aminoacídica original ha sido cambiada para generar un péptido inactivo, los AC3-C. Una pareja de cada uno de estos ratones fue gentilmente donada por el Dr. Mark Anderson, de la Universidad de Iowa, Iowa, USA, y la línea se continuó en el bioterio de nuestra facultad. Las características de los ratones permitieron evaluar el efecto de la AngII sobre la viabilidad celular en presencia y ausencia de inhibición constitutiva de la actividad de la CaMKII.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicado por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos (publicación nro. 85-23, revisada en el año 1996).

Aislamiento y cultivo de miocitos

Los miocitos fueron aislados según la técnica descrita previamente^[39, 40], con algunas modificaciones. Brevemente, los gatos, las ratas y los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/kg). Los corazones fueron removidos del animal y unidos por la aorta a un aparato de perfusión tipo Langendorff, a través de una cánula. Los mismos fueron perfundidos retrógradamente a 37°C, a una presión constante de perfusión de 70-80 mmHg con una solución de HEPES con el Ca⁺² correspondiente a cada especie (ver apéndice). Todas las soluciones fueron burbujeadas continuamente con O₂ al 100%. Después de un período de estabilización de 4 min, la solución de perfusión fue cambiada por una libre de Ca⁺² por 6 min. Este período de perfusión es de crucial importancia, ya que la integridad de los discos intercalares y la adhesión entre las células es altamente dependiente de la concentración de Ca⁺² del medio y se ha descrito que bajos niveles del ion reducen la adhesión entre las células^[117]. Los corazones se perfundieron luego con una solución de HEPES con 50 µM CaCl₂ y colagenasa (300 U/ml), proteasa 0,1 mg/ml y albúmina del suero bovino al 1% (BSA). Estas enzimas, en conjunción con la BSA, permiten una digestión suave de la matriz proteica celular para poder extraer los miocitos. La perfusión continuó hasta que los corazones presentaron flaccidez (14-18 min). Luego, los corazones fueron separados del aparato de perfusión mediante un corte en la unión atrioventricular; el tejido ventricular fue disgregado y separado del tejido aún no digerido. El tejido disgregado se lavó varias veces con soluciones de HEPES al 1% de BSA y a concentraciones crecientes de CaCl₂. Después de cada lavado, los miocitos se dejaron sedimentar por 10 min. Este proceso permitió la recalcificación paulatina de los mismos. Las células se mantuvieron en la solución de HEPES con el Ca⁺² correspondiente a cada especie y a temperatura ambiente (20-22°C), hasta el momento de ser usados. Los miocitos fueron “plaqueados” a una densidad de ~2 x 10⁴ células/ml en placas para cultivo previamente tratadas con laminina por 1 h para favorecer la

adherencia de las células a la base de las mismas. Una vez adheridas las células, se procedió a cambiar la solución de HEPES por medio de cultivo fresco (DMEM, ver apéndice), con el agregado o no de AngII ($1\mu\text{M}$), y de los compuestos farmacológicos y/o vectores virales, de acuerdo a los distintos protocolos que se detallan en Resultados. Las células fueron incubadas en una estufa con una atmósfera de CO_2 al 5% por un período de 24 hs. Transcurrido este tiempo, los miocitos se destinaron a los diferentes estudios.

Evaluación morfológica de la viabilidad celular

Luego de 24 hs de cultivo, se evaluó la viabilidad celular a través de la morfología, de acuerdo a la relación largo/ancho de la células (una célula con una relación mayor a 3 fue considerada viable), como fue previamente descrito^[93]. En la figura M1 se puede observar la estructura de un miocito viable, con sus estriaciones propias y bordes definidos, y por el otro, miocitos muertos que han perdido la relación de área y las típicas estriaciones. En muchos de ellos se observa además la membrana “burbujeada”, una característica típica de apoptosis como ya se ha descrito en la Introducción.

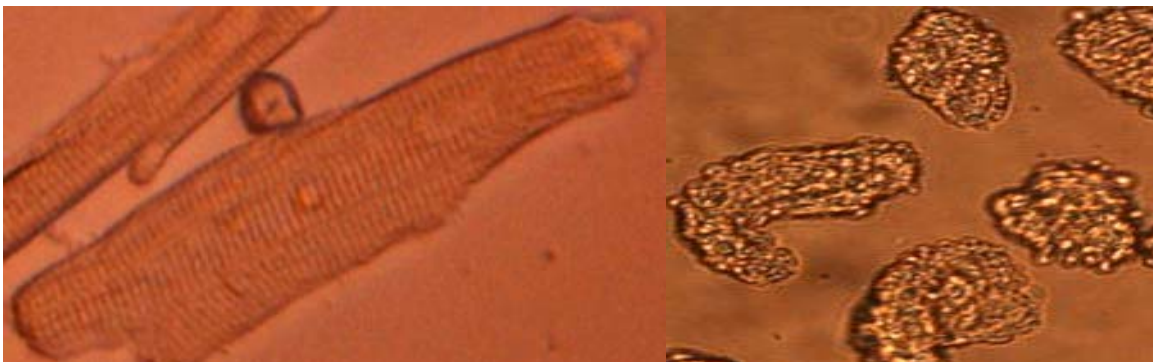


Figura M1: Se muestran imágenes representativas de miocitos de gato vivos (derecha) y muertos (izquierda), a 40X de aumento.

Para el recuento de los miocitos se tomaron fotos en un microscopio Olympus Bx51 con una cámara de carga acoplada (CCD) Olympus DP70 *cooled digital color* y un objetivo Uplan FLN de 20X. Se fotografiaron 20 campos al azar por cada posillo de la placa de cultivo. Los datos

fueron almacenados con formato JPG y el recuento se realizó de manera manual sobre cada foto. Todos los datos de viabilidad celular se expresaron como porcentaje del número total de células.

Medidas de Ca^{+2}_i y contractilidad en miocitos cultivados

Indicadores de Ca^{+2}_i

Los indicadores actualmente disponibles para las medidas de Ca^{+2}_i (Quin-2, Fura2, Indo1, Fluo3, Rhod2), han sido diseñados en base al ácido etilen-glicotetracético (EGTA), un quelante selectivo de Ca^{+2} ^[118, 119]. Las modificaciones químicas que han sufrido estos indicadores, sumado al uso de la microscopía de fluorescencia (y a la posibilidad de registrar a dos longitudes de onda distintas, ya sea para la excitación, Fura2, como para la emisión, Indo1), permiten estimar el Ca^{+2}_i libre a través de la proporción de indicador unido al Ca^{+2} y de indicador libre de Ca^{+2} , cuando el indicador está en equilibrio con la concentración de Ca^{+2} libre. Esta característica permite manejar los datos de fluorescencia como la relación entre la intensidad de fluorescencia obtenida a dos longitudes de onda (método del cociente). Con este método, variables que pueden alterar la exactitud de las mediciones pueden ser eliminadas; como por ejemplo, factores independientes de los iones que afectan la intensidad de la señal, tales como la concentración intracelular no uniforme del indicador, pérdida del indicador, inactivación a lo largo del tiempo cuando entra en contacto con la luz de excitación, espesor de la célula o artefactos de movimiento. Tanto el Indo1 como el Fura2, son los apropiados para realizar medidas de Ca^{+2} en células aisladas. Si bien el Indo1 es más susceptible a la inactivación por contacto con la luz de excitación que el Fura2, el primero presenta menos problemas de hidrólisis incompleta y compartimentalización^[119]. En el caso del Fura2 la doble-excitación/simple-emisión dificulta el monitoreo de cambios rápidos de Ca^{+2}_i ya que no hay una verdadera simultaneidad en el registro de las dos longitudes de onda utilizadas para

obtener el cociente. Tanto el Indo1 como el Fura2 en su forma permeable de ester de acetometilo (AM), se comportan como una molécula hidrofóbica y sin carga; estas propiedades le permiten atravesar las membranas celulares. Una vez en el interior celular, las esterasas endógenas “activan” al indicador transformándolo en su forma ácida, la cual es impermeable al sarcolema, lo que impide que el indicador se “escape” de la célula. Una propiedad importante de los indicadores de Ca^{+2} es su selectividad por el Ca^{+2} sobre el Mg^{+2} . Tanto el Indo1 como el Fura2 tiene un Kd para el Ca^{+2} de aproximadamente 350 nM, por lo que son muy específicos para la medición del Ca^{+2}_i . Otro ion que puede competir por los sitios de unión para el Ca^{+2} del Indo1 es el H^{+} ^[119].

Los problemas que pueden citarse respecto al manejo de estos indicadores son: 1) la amortiguación que producen sobre la $[\text{Ca}^{+2}]_i$, lo que puede alterar los cambios cinéticos del Ca^{+2} y por lo tanto influenciar las respuestas transitorias de Ca^{+2} ; 2) la compartimentalización en las organelas (especialmente en mitocondrias), que en el caso del Indo1 alcanza un 50% en miocitos cardíacos; 3) la incompleta desesterificación, que resulta en una contribución de fluorescencia insensible al Ca^{+2} ^[118] y 4) la contribución de fluorescencia dada por la autofluorescencia celular, debida a la producción de NAD(P)H mitocondrial^[118]. Debido a que cuando los miocitos aislados son cargados con Indo1-AM, hay una compartimentalización significativa del indicador en las mitocondrias, cuyo grado varía de célula a célula, los resultados no se expresaron como valores absolutos de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ sino como relación de fluorescencia. Este cociente de fluorescencia del Indo1 se considera, entonces, como una estimación del Ca^{+2}_i .

La longitud de onda de excitación para el Indo1 se centra a 350 nm, mientras que la fluorescencia emitida se recoge a 410 nm y a 490 nm. En la figura M2 se grafica la intensidad de emisión (Indo1) y de excitación (Fura2) en función de la longitud de onda y a diferentes concentraciones de Ca^{+2} . Para el Indo1, se observa que la fluorescencia emitida a 410 nm en

una solución libre de Ca^{+2} es prácticamente nula, mientras que la emitida a 490 nm en la misma solución, es virtualmente máxima. Al contrario, cuando la concentración de Ca^{+2} satura al indicador, la máxima emisión se observa a 410 nm en tanto que a 490 nm, la emisión es casi mínima. Esta emisión dual del Indo1 a las longitudes de onda de 490 nm (para el indicador sin Ca^{+2}) y de 410 nm (para el indicador unido al Ca^{+2}), permite, como ya se ha mencionado, calcular la relación o cociente (*ratio*) de las fluorescencias emitidas a las dos longitudes de onda (410/490). La estimación del Ca^{+2} a través del cálculo de dicho cociente, posibilita independizarse de las pérdidas del indicador que normalmente ocurren durante un experimento, y que distorsionarían las medidas de Ca^{+2} si éstas se realizaran a una sola longitud de onda.

El Fura2 también posee una alta afinidad para el Ca^{+2} . En este caso la longitud de onda de excitación se centra en 363 nm (para indicador sin Ca^{+2}) y 325 nm (con máximo Ca^{+2} ; doble excitación), generando una única emisión máxima centrada en 525 nm. Aunque con características similares al Indo1, el Fura2 es más resistente a foto-blanqueo (*photo-bleaching*) tras la estimulación prolongada a la longitud de onda de excitación.

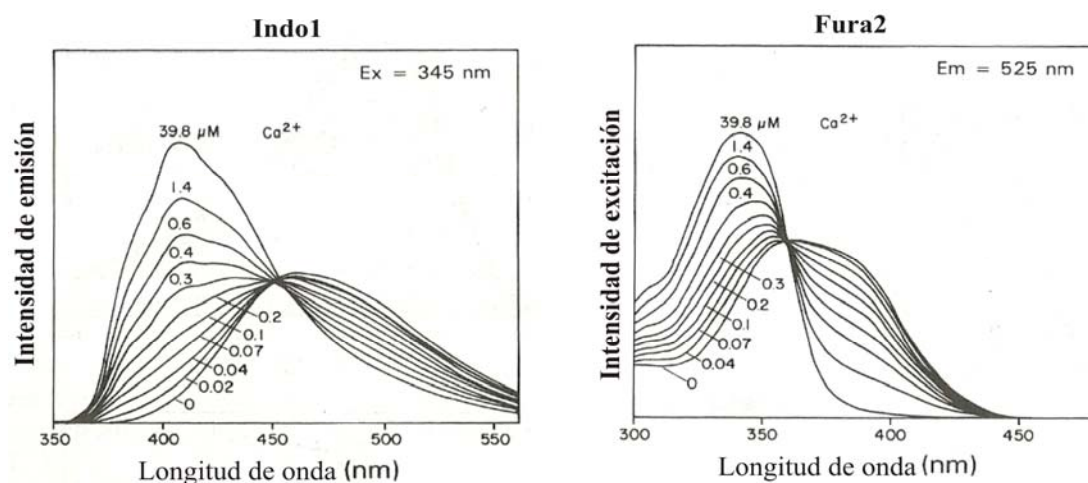


Figura M2: Espectros de excitación y emisión del Indo1 y Fura2, respectivamente, y su relación con la concentración de Ca^{+2} . Para ambos indicadores se representan la curva de emisión (Indo-1, izquierda) y de excitación (Fura2, derecha) a diferentes concentraciones (μM) de Ca^{+2} libre. Figura modificada de Haugland, R.P., *Molecular Probes: 1994, Orlando, Florida: Molecular Probes*. 421.

Procedimiento de carga de los indicadores

Luego del período de cultivo, los miocitos fueron removidos y lavados con una solución de HEPES a la concentración de Ca^{+2} adecuada para cada especie. Los miocitos se incubaron con Indo1-AM o Fura2-AM, en solución con dimetilsulfóxido (DMSO) y ácido plurónico, para incrementar la incorporación del indicador a las células. El indicador se incubó durante 9 min con Indo1, a una concentración de $17 \mu\text{M}^{[118]}$ o durante 15 min con Fura2-AM ($1 \mu\text{M}$), a temperatura ambiente. Luego del período de carga del indicador, las células fueron lavadas y dejadas en HEPES durante 45 min para su desesterificación. Ese lapso se considera suficiente para la hidrólisis de la mayoría de los ésteres AM^[119].

Registros de Ca^{+2}_i y acortamiento de los miocitos

Una vez cargadas con el indicador de Ca^{+2} , las células fueron colocadas sobre la platina de un microscopio invertido (*Nikon Diaphot 200*) adaptado para epifluorescencia y perfundidas continuamente con HEPES (pH 7,4) a un flujo constante de 1 ml/min. Los miocitos fueron estimulados a través de dos electrodos de platino colocados a cada lado de la cámara de perfusión (ondas cuadradas de 2 ms de duración y de una intensidad de 20% por encima del umbral), a una frecuencia de 30 pulsos/min. Las células fueron iluminadas por un haz de luz centrado a las longitudes de onda correspondientes para cada indicador y la fluorescencia emitida fue adquirida por dos fotomultiplicadores. La fluorescencia inespecífica (fondo) se sustrajo de cada señal, antes de obtener el cociente de fluorescencia. Para obtener el cociente de fluorescencia diastólico se consideró el valor promedio de dichas fluorescencias en un período de 100 ms luego de que la contracción se completara. El cociente de fluorescencia sistólico fue determinado directamente en el pico del cociente de la fluorescencia registrada.

La platina del microscopio fue iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de su sistema óptico para luz visible, con el fin de permitir mediciones simultáneas de fluorescencia y acortamiento celular (figura M3). La longitud del miocito en reposo y el acortamiento del

mismo fueron medidos por un detector de movimiento de bordes (*Crescent electronics, UT, SA*) y los datos almacenados por medio de un *software* adecuado para su posterior análisis. El acortamiento de los miocitos fue expresado como porcentaje de su longitud total.

En los experimentos se evaluó la amplitud de cada contracción individual y los transitorios del Ca^{+2}_i asociadas a dichas contracciones (CaT). El contenido de Ca^{+2} del RS fue evaluado a través de la exposición de las células a una solución con 25 mM de cafeína (caff), en ausencia de estimulación eléctrica. La caff induce la apertura de los canales de RyR y bloquea la actividad de la SERCA2a del RS, lo que genera la liberación de Ca^{+2} del RS e impide su recaptura, respectivamente.

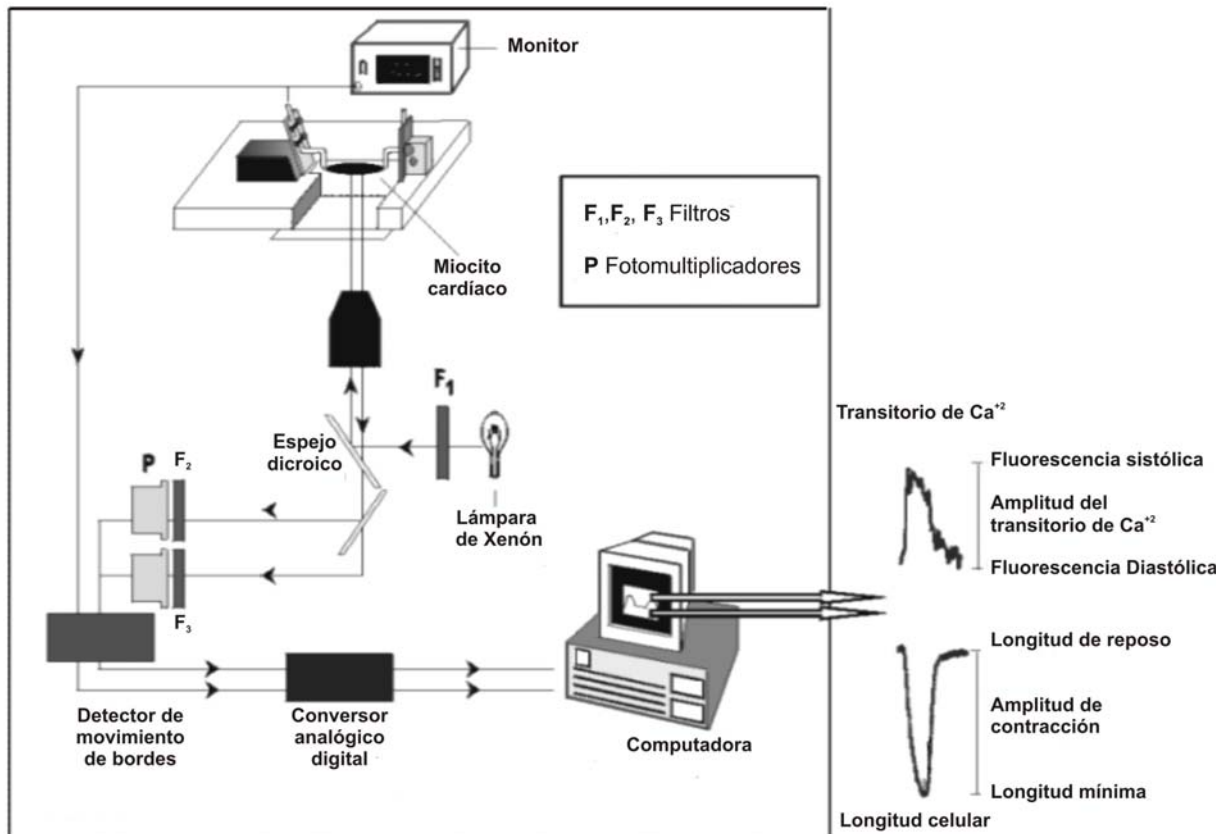


Figura M3: Esquema que muestra la disposición del instrumental utilizado para la determinación del Ca^{+2}_i por epifluorescencia y el acortamiento celular. Para la determinación del Ca^{+2}_i , se utiliza como fuente una lámpara de xenón cuyo haz de luz es centrado a la longitud de onda correcta a través del filtro adecuado para excitar apropiadamente a cada indicador (F_1). Este haz de luz es reflejado por un espejo dicroico que concentra la luz en el miocito seleccionado. La fluorescencia emitida por la célula es recolectada por un fotomultiplicador (P) a través de los filtros adecuados (F_2 y F_3), según la emisión del indicador, y por medio de un convertidor analógico/digital la señal puede ser analizada posteriormente. La computadora posee un *software* que archiva y permite el análisis ulterior. Simultáneamente, se detecta la variación de longitud celular a través de un monitor y un detector de bordes que emiten una señal también digitalizada y almacenada en la computadora. A la derecha del instrumental se observa un registro de fluorescencia (transitorio de Ca^{+2}_i) y uno de longitud celular, en donde aparecen indicados los parámetros que se midieron en este trabajo.

Medida del grado de apoptosis

Se utilizó la técnica histoquímica de TUNEL, que denota la fragmentación del DNA por DNAasas endógenas *in situ*, evento característico de la apoptosis, como se mencionó en la Introducción. Luego del período de cultivo, las células fueron fijadas en *p-formaldehído* al 4%, permeabilizadas con etanol y ácido acético y conservadas en alcohol 70% a $-20^{\circ}C$ hasta ser coloreadas. Se utilizó un kit comercial (*ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon*), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

El 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloridrato (DAPI) es un colorante de ácidos nucleicos, preponderantemente de doble cadena, que tiene una alta afinidad para asociarse a los pares de bases Adenina-Timina (AT) presentes en el DNA, mientras que presenta menor afinidad por el RNA por poseer Uracilo (AU)^[120]. Este colorante fluorescente presenta un espectro de absorción y emisión en la gama de la luz azul (máxima excitación a los 358 nm, y una emisión a los 461 nm) y es utilizado para visualizar los núcleos celulares. Luego de la tinción por la técnica de TUNEL, las células fueron tratadas con una solución acuosa del colorante DAPI (Invitrogen) de 5 mg/ml, por 5 min a temperatura ambiente, lavadas varias veces con PBS (ver apéndice) y luego deshidratadas y montadas con el medio de montaje comercial, bálsamo de Canadá. Se tomaron fotos al azar de al menos 20 campos por preparado con ambos filtros (TUNEL/DAPI) en un microscopio de fluorescencia Olympus Bx51 con una cámara de carga acoplada (CCD) Olympus DP70 *cooled digital color* y objetivos Uplan FLN de 20X. La doble tinción permitió establecer el grado de apoptosis evaluando la relación del número de células TUNEL positivas con respecto al número total de núcleos determinados por la coloración de DAPI para cada campo.

Por otro lado, como se describió en la Introducción, otro marcador de la vía apoptótica es la activación de caspasas, y entre ellas el efector final común de las vías apoptóticas, la caspasa3. El clivaje, que comprende la activación de la procaspasa3 en caspasa3, deja libre un fragmento de 17 kDa detectable por la técnica de *western blot*. La activación de la caspasa3 fue detectada por dos métodos distintos: el primero, por un *kit* comercial fluorescente que utiliza la actividad proteasa para inducir fluorescencia *in situ* (Phiphilux de OncoImmunin; Gaithersburg, MD)^[121]. Para realizar esta técnica se incubaron a los miocitos cultivados en presencia de 2,5 µmol/L de Phiphilux por 1 h a 37°C. Luego se lavaron y epiiluminaron en un microscopio de fluorescencia a fin de detectar el colorante. Luego las imágenes fueron procesadas por un *software* (IMAGE PRO PLUS) que permitió comparar la intensidad de fluorescencia. El

segundo método evaluó el grado de apoptosis a través de la inmunodetección por *western blot* de la proteína pro-apoptótica caspasa3^[93, 122].

Inmunodetección por Western Blot

Luego de las 24 horas de incubación con el tratamiento correspondiente, los miocitos fueron removidos y concentrados por centrifugación suave en un *pellet* o botón celular para ser lisados, con un *buffer* de lisis (ver apéndice). Los miocitos colocados en el *buffer* de lisis se mantuvieron refrigerados a 4°C por al menos 30 min, agitándolos cada 10 min para favorecer el proceso de lisis celular. Luego de este período, fueron centrifugados a 4°C por 15 min a 13000 r.p.m., recuperándose el sobrenadante, que es el que posee las proteínas en suspensión, el cual fue guardado a -80°C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford (BIORAD) por espectrofotometría a 595 nm^[123]. Esta determinación permitió estandarizar la cantidad de proteína a sembrar. Las muestras fueron mezcladas con un *buffer* de carga desnaturizante (ver apéndice) para facilitar la siembra en los geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se utilizaron al 10 y 15%^[124], para lograr una adecuada separación de las proteínas dentro del rango del peso molecular de interés (entre los 5 a 55 kDa), y se les aplicó una corriente eléctrica constante de 100 mV por 1 h. Esto permitió la separación por tamaño y carga eléctrica de las proteínas contenidas en la siembra. Conjuntamente con las muestras, se sembró un marcador de peso molecular (*Dual Color* BIORAD) para poder reconocer luego el peso de la fracción proteica de interés. Las proteínas, ahora separadas en la matriz del gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF, Immobilon Millipore), aplicando para ello un campo eléctrico de 60 mV durante 1 h. Las proteínas, asociadas a la membrana de PVDF por uniones electrostáticas, fueron incubadas con una solución de proteína conocida (como albúmina o caseína) a modo de *bloqueo*, a fin de

impedir la unión electrostática inespecífica del anticuerpo primario con la superficie cargada de la membrana, para poder detectar posteriormente la proteína de interés.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal específico, que reconoce el antígeno específico en la membrana: contra el estado fosforilado del residuo Thr²⁸⁶ de CaMKII, Thr¹⁷ de PLB y Tyr¹⁸⁹ de p38 MAPK, la fracción activada de caspasa3, la p38 MAPK total, la actina y la GAPDH. Las fracciones proteicas de interés con el anticuerpo específico unido, fueron detectadas con un anticuerpo secundario específico de especie, conjugado con la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRP) para así visualizarlas por quimioluminiscencia. Para esto se utilizó un sistema de detección comercial (ECL Plus, Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La detección se realizó mediante la cámara CCD de un equipo Chemidoc XRS (BIORAD), que captura y digitaliza las imágenes. Estas imágenes procesadas permitieron una cuantificación en unidades arbitrarias (UA) la densidad de las bandas por densitometría de imagen utilizando el programa *Scion Image* y normalizadas por una proteína de expresión constitutiva (actina o GAPDH) y expresadas en porcentaje del control.

Medida de las especies reactivas del O₂ (ROS)

Para evaluar la producción intracelular de ROS se utilizó un indicador fluorescente sensible a éstos, el 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetatometilo (CM-H₂DCFDA). Este indicador en su forma AM, es permeable a la membrana celular y es activado por las estearasas que además le confieren carga, confinándolo al interior celular. Las células fueron cargadas con 1µM de CM-H₂DCFDA por un período de 30 min a 37°C y luego lavadas del indicador con una solución de HEPES.

El CM-H₂DCFDA tiene un pico de excitación a los 485 nm y una emisión máxima a los 530 nm. Estos parámetros fueron visualizados en el microscopio invertido de fluorescencia en el que se tomaron las fotos. La señal de fluorescencia se cuantificó a través de un *Software*

especializado (*Image Pro Plus*). Como control positivo del incremento de ROS se utilizó el agregado de 200 μM de H_2O_2 al medio de cultivo.

Actividad de CaMKII y p38 MAPK

La actividad de la CaMKII se evaluó por un lado, a través de la detección inmunofluorescente *in situ* de la fosforilación del sitio Thr²⁸⁶ de la kinasa, usando anticuerpos específicos de especie conjugados con fluoresceína. Para ello las células cultivadas fueron fijadas en ρ -formaldehído al 4%, permeabilizadas con etanol y ácido acético, y conservadas en alcohol 70% a -20°C . Se *bloqueó* con suero de cabra al 5% por 1 h y se las incubó con anti-pCaMKII (1:400) durante toda la noche. Tras esta incubación y lavados con PBS (ver apéndice), se incubó con un anticuerpo contra conejo conjugado con fluoresceína y luego se observó y fotografió en microscopio de fluorescencia a 630 nm.

Por otro lado, se confirmó la activación de CaMKII por *western blot*, como se ha descrito previamente. Se evaluó el estado fosforilado del residuo Thr²⁸⁶ de CaMKII y la fosforilación de su sustrato específico, el residuo Thr¹⁷ de PLB, por medio de anticuerpos específicos. Del mismo modo, se evaluó la activación (por fosforilación de Tyr¹⁸⁹) de la p38 MAPK.

Se utilizó también la línea de ratones que expresan constitutivamente un péptido inhibidor de la CaMKII (AC3-I)^[115] y sus pares controles AC3-C. En ellos se evaluó la viabilidad celular en presencia de AngII durante 24 hs.

Infeción adenoviral

Se usaron adenovirus recombinantes gentilmente donados por el grupo del Dr Hajjar (Centro de Investigación Cardiovascular, Hospital General Massachusetts, Escuela de Medicina de Harvard, Boston, USA), portadores del gen de la p38 MAPK y de la β -galactosidasa (β -Gal), conjuntamente con el gen para la proteína fluorescente verde, GFP. Brevemente, la

construcción de los adenovirus fue realizada por dicho grupo sobre un vector adenoviral (Adv) que contenía gran parte del genoma viral, apto para el clonado en *Escherichia coli* (los pAdv EASY1). A estos adenovirus recombinantes se les eliminó el gen de la polimerasa temprana E1 (que sí existe en el tipo salvaje), para evitar la propagación a cualquier tipo celular. Esto permite que la amplificación se produzca sólo en la línea de células embrionarias de riñón humanos 293 (HEK-239) que posee este grupo de genes virales tempranos en su genoma. El cDNA de la p38 MAPK, o como control, el cDNA del gen *LacZ* que codifica para la β -gal se subclonaron y recombinaron con el gen de GFP, (como proteína reportera de la expresión) bajo el control del promotor del citomegalovirus para inducir una exacerbada expresión. En la línea celular HEK-293, fueron amplificados los adenovirus y purificados por el método de separación de partículas de gradiente de CICs. El título utilizado en este trabajo fué obtenido por ensayos de unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml), estimado en aproximadamente $2-4 \times 10^9$ pfu/ml. Las unidades formadoras de placa (pfu) son una medida del número de partículas virales infecciosas presentes en una suspensión. A partir de estas pfu se calculó el múltiplo de infección (MOI), que representa el número medio de partículas de virus que infecta a cada célula.

$$MOI = pfu / \text{número de células}$$

Para realizar la infección en miocitos adultos, luego de plaqueados a una densidad de 2×10^4 células/ml, los miocitos fueron infectados con un MOI de aproximadamente 100, agregando los virus junto con el medio de cultivo y el tratamiento a realizarse (ejmplo AngII+SB). Luego de 24 hs se evaluó por microscopía de fluorescencia la eficiencia de infección por detección de la fluorescencia de GFP (excitación a 480 nm), que resulta equivalente a la expresión de los genes de interés (*Lac Z* o p38 MAPK).

Fosforilación in Vitro

A partir de los corazones aislados se homogeneizó un volumen de tejido con 4 volúmenes de *buffer* de lisis (ver apéndice). Luego de la homogenización, se centrifugó a 12500 r.p.m. durante 10 min a 4°C y el sobrenadante fue utilizado para la reacción de fosforilación. La determinación de la concentración protéica se realizó por el método de Bradford por espectrofotometría, según las recomendaciones del fabricante (BIORAD), como ya fue descrito.

En la reacción de fosforilación *in vitro*, se tomaron 50 µg del homogenato anteriormente obtenido y se lo colocó en el *buffer* de fosforilación (libre de Ca⁺² nominal, ver apéndice) y en presencia o ausencia del inhibidor específico de CaM (W7, 10 µM). El agregado exógeno de CaM se realizó sólo en los protocolos donde no estaba inhibida la misma.

Luego de preincubar la solución durante 3 min a 30°C, se dio inicio a la reacción de fosforilación con el agregado de ATP (0,1 mM) en las mezclas, en ausencia o presencia de 0,2 mM de H₂O₂. Luego de 10 min, la reacción se detuvo con el agregado de un *buffer* de siembra desnaturizante.

Se evaluó el estado de fosforilación de la CaMKII en los ensayos *in vitro* por *western blot*.

Análisis Estadístico

Los datos se presentan como media ± error estándar (ES). Para comparar dos grupos de datos se utilizó test de t de Student para muestras independientes. Para comparar más de dos grupos se utilizó ANOVA de una vía para muestras independientes seguido de un test de Student-Newman-Keuls. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados

RESULTADOS

Inducción de apoptosis por AngII: Rol de los ROS y de la CaMKII

Viabilidad celular

En una primera serie experimental se verificó el efecto ya descrito de la AngII en la disminución de la viabilidad celular, en miocitos cultivados de rata y gato adultos quiescentes y expuestos a la hormona por 24 hs. La AngII redujo el número de células viables en miocitos de rata y gato significativamente con respecto al control desde $62,28 \pm 2,4\%$ y $65,7 \pm 3,1\%$ a $38,9 \pm 2,6\%$ y $43,7 \pm 3,0\%$, (n=12-15) respectivamente en los distintos grupos, luego de 24 hs de cultivo (Figura R1 y R2A).

Como se describió en la Introducción, la AngII puede unirse a dos tipos de receptores, los receptores tipo 1 (AT1), sensibles al bloqueo farmacológico con Losartán (Los), y los AT2, sensibles al bloqueo con PD123.319 (PD). Por otra parte, ha sido descrito previamente que la muerte celular inducida por AngII en la rata, es mediada por los receptores AT1^[30]. Se desconoce, sin embargo, si en la muerte celular inducida por AngII en el gato están involucrados los mismos receptores. En la figura R1 se muestra que el efecto de la AngII sobre la viabilidad celular pudo prevenirse en miocitos de gato por el bloqueo de los receptores AT1 con AngII+Los, pero no por PD. En presencia de AngII+Los, el número de células viables fue $60,3 \pm 4,6\%$ (NS respecto al control), en tanto que en presencia de AngII+PD fue de $41,9 \pm 2,9\%$ ($p < 0,05$ versus el control, n=4).

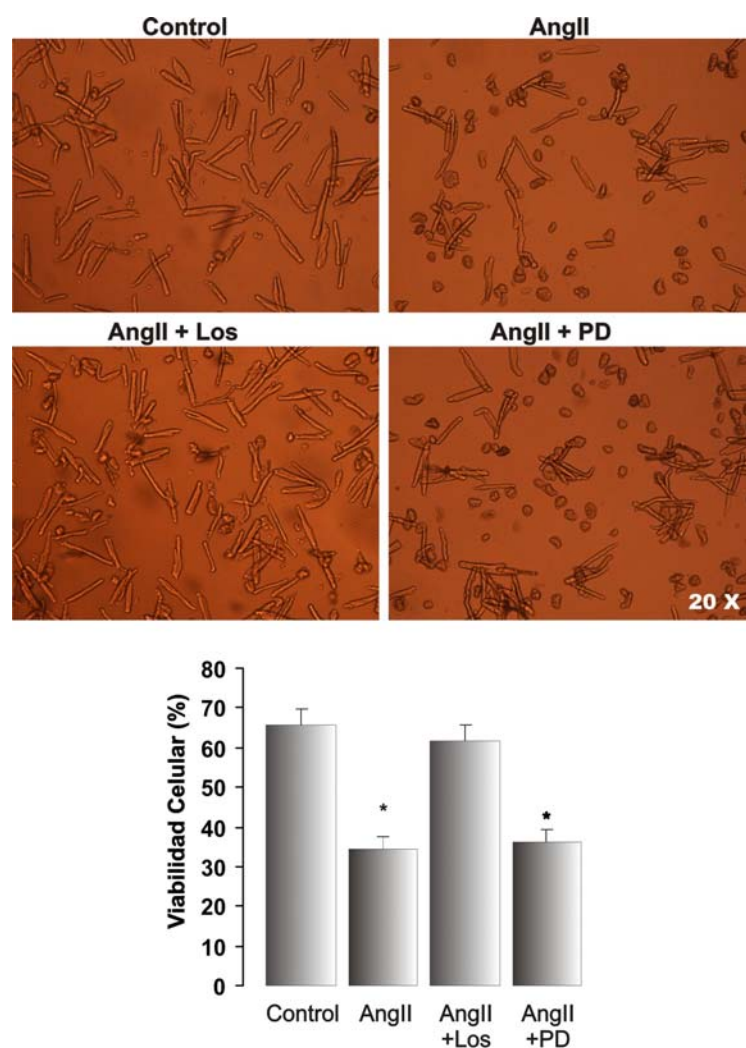


Figura R1: La AngII induce muerte celular a través del receptor AT1. En la parte superior, se muestran fotos representativas de los miocitos de gato luego de 24 hs de cultivo. Debajo, se grafican los valores promedio de viabilidad celular de las células tratadas (AngII, AngII+Los y AngII+PD). * $p < 0,05$ vs Control.

Los resultados indican entonces que efectivamente, la AngII produce muerte celular en nuestros cultivos quiescentes de rata y gato y confirman que este efecto se produce a través de los receptores AT1.

Apoptosis

A fin de corroborar si la muerte celular que induce la AngII se debía, al menos en parte, a eventos apoptóticos, se utilizaron dos métodos de marcación de apoptosis. 1. La marcación por la técnica de TUNEL, que denota la fragmentación propia del material genómico en este

proceso de muerte. 2. La detección de la activación de caspasa3, un marcador molecular de apoptosis, a través de la técnica de *western blot*. La figura R2A muestra nuevamente la disminución de la viabilidad celular producida por la AngII tanto en miocitos de rata como de gato, en tanto que las Figuras R2B y R2C muestran cómo la disminución en la viabilidad celular se correlaciona con la mayor actividad de la caspasa3 y el aumento en el número de núcleos TUNEL positivos, respectivamente, que induce la AngII. En promedio, las células TUNEL positivas aumentaron de $3,9 \pm 0,2\%$ (control) a $10,1 \pm 0,1\%$ (AngII) ($p < 0,05$). Estos resultados confirman el efecto apoptótico de la AngII para ambas especies.

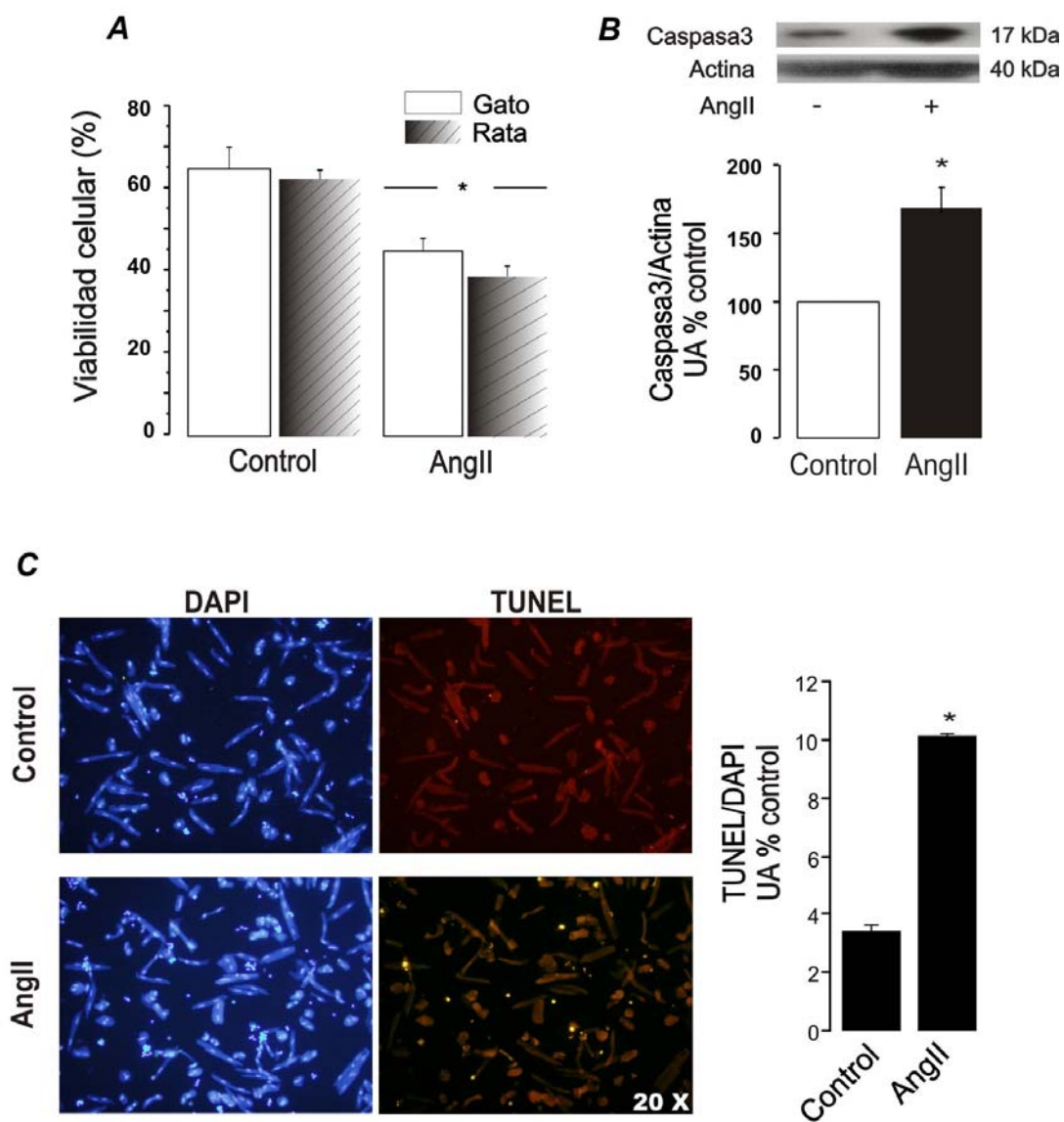


Figura R2: La AngII induce apoptosis en miocitos aislados. A, como se observó previamente, se muestran los resultados promedio de viabilidad en miocitos adultos que fueron incubados durante 24 hs en presencia de 1 μ M de AngII (n=12 para gato y n=16 para rata). B, se muestran *blots* típicos del incremento en la activación de caspasa3 inducido por AngII y debajo los valores promedio normalizados por actina (n=6). C, se muestran fotos representativas de la técnica de TUNEL y DAPI, donde se observa que la AngII induce un incremento de los núcleos TUNEL positivos (núcleos coloreados de amarillo), respecto de los núcleos totales. A la derecha se muestran los resultados promedio (n=6). * $p < 0,05$ vs Control.

ROS

Como se mencionó en la Introducción, la AngII induce producción de ROS a partir del incremento de la actividad de la NADPH oxidasa. Para evidenciar si esto ocurría en nuestras condiciones experimentales, los miocitos se cargaron con DM-H₂DCFDA, un indicador

fluorescente sensible a ROS, luego de 24 hs de cultivo quiescente, en presencia de AngII y en presencia y ausencia de un inhibidor de la NADPH oxidasa, el inhibidor de flavoproteínas DPI^[125, 126].

En la Figura R3.A se muestran imágenes típicas de estos experimentos y los resultados promedio. Se puede observar que la AngII indujo un incremento en la producción de ROS en miocitos de rata. Este efecto pudo prevenirse en presencia de 10 μ M de DPI. Estos experimentos indican que la estimulación con AngII induce la producción de ROS mediada por la actividad de la NADPH oxidasa.

A fin de dilucidar una posible relación entre el aumento de ROS y la muerte celular inducida por AngII, se cultivaron las células (miocitos de gato y rata) en presencia de la hormona y en presencia y ausencia de DPI o de un “atrapante” de ROS, el 2-mercaptopropionilglicina (MPG). Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura R3.B donde se observa que tanto el DPI como el MPG previenen la muerte celular inducida por AngII.

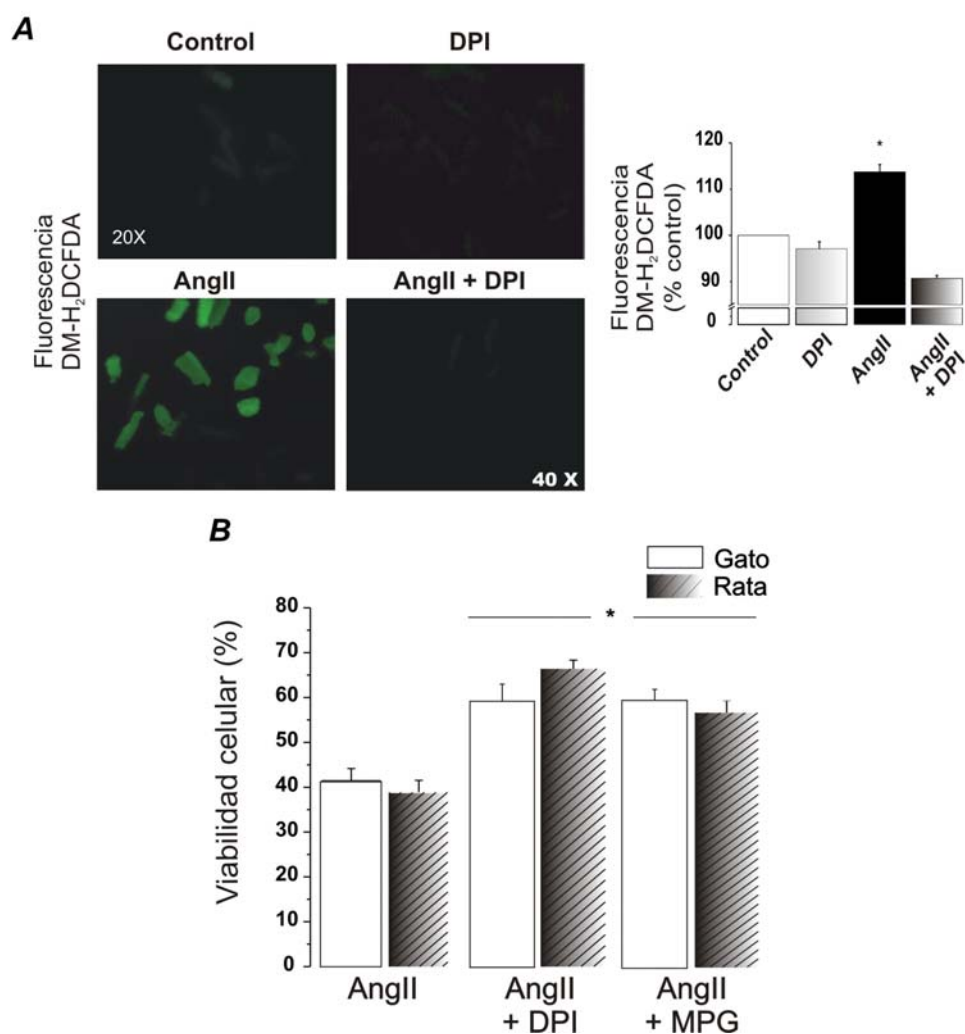


Figura R3: La AngII induce muerte celular a través de un incremento de los ROS. **A**, a la izquierda, imágenes representativas y a la derecha los resultados promedio de miocitos tratados con el indicador fluorescente de ROS, DM-H₂DCFDA. Se puede observar que los miocitos expuestos a AngII durante 24 hs producen un incremento de la fluorescencia que es prevenido con DPI (* $p < 0,05$ vs Control, DPI y AngII+DPI). **B**, resultados promedio de la viabilidad celular luego de las 24 hs de cultivo en presencia de AngII, AngII+DPI y AngII+MPG (* $p < 0,05$ vs AngII), para rata y para gato. Tanto el inhibidor de la NADPH oxidasa como el atrapante de ROS previenen la disminución en la viabilidad celular inducida por AngII.

Estos resultados indican que la AngII induce un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa (sensible a DPI), con la concomitante producción de ROS y que la prevención del incremento de los ROS se asocia a una reducción de la muerte celular inducida por la AngII. Este hecho sugiere un nexo causal entre el incremento de ROS y la disminución de la viabilidad celular inducidos por AngII.

CaMKII

En la siguiente serie experimental investigamos la posibilidad de que la CaMKII estuviera involucrada en la vía apoptótica inducida por la AngII. Para estudiar la actividad de CaMKII se utilizaron dos técnicas. La primera de ellas consistió en la detección por inmunohistoquímica de la fosforilación del residuo Thr²⁸⁶ de la CaMKII *in situ*. La segunda, en la detección por *western blot* tanto del residuo Thr²⁸⁶ de la kinasa, como la de su sustrato específico, el residuo Thr¹⁷ de PLB. Estas determinaciones se realizaron luego del período de cultivo en ausencia (control) y presencia de AngII y en presencia de AngII y de un inhibidor de la CaMKII (KN93) o un análogo inactivo (KN92, ver apéndice).

En la figura R4.A se muestran imágenes de los experimentos de inmunohistoquímica por microscopía de fluorescencia en miocitos de gato. Estas denotan la fosforilación de la CaMKII (P-CaMKII) inducida por AngII, fenómeno que se previno con 1 μ M de KN93, pero no con su análogo inactivo, KN92. Resultados similares se obtuvieron en otros dos experimentos independientes. En forma similar, el KN93 previno el aumento de P-CaMKII y de P-Thr¹⁷ de PLB inducido por AngII, cuando esta fosforilación se evaluó por *western blots* (Figura R4.B). La administración de KN93 en ausencia de AngII, no afectó significativamente la fosforilación de Thr¹⁷, usada esta última como indicador de la actividad basal de la CaMKII.

A

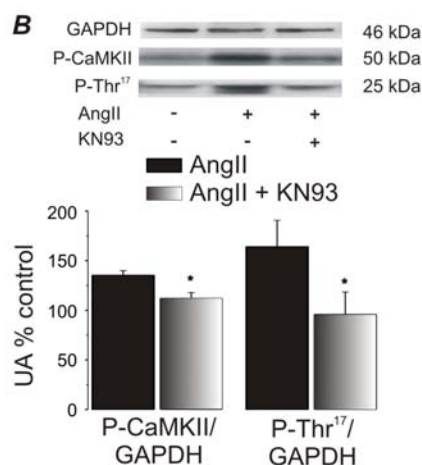
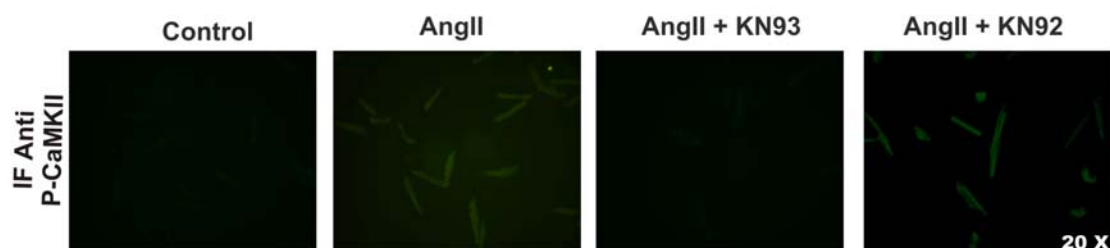


Figura R4: La CaMKII es activada luego de la estimulación con AngII. A, se puede observar en las fotos representativas de inmunohistoquímica (anticuerpo contra P-CaMKII), que la AngII induce un incremento de la fluorescencia (IF), lo que indica un aumento en la actividad de la CaMKII. Este incremento puede ser prevenido en presencia de KN93, pero no así de KN92. B, se muestran *blots* típicos, con sus valores promedio, donde la AngII induce un incremento en la fosforilación de CaMKII (P-CaMKII), así como de su sustrato la Thr¹⁷ de PLB (P-Thr¹⁷). Este incremento en las fosforilaciones puede ser prevenido en presencia de KN93 (n=9). (* $p < 0,05$ vs AngII).

Estos resultados vinculan a la activación de la CaMKII con la estimulación por AngII.

Como se mencionó en la Introducción, experimentos de otros laboratorios establecieron que los ROS pueden mantener la actividad de la CaMKII, como lo hace su autofosforilación, luego de ser activada por $Ca^{+2}/Cam^{[65]}$. Para establecer el posible papel de los ROS en la activación de CaMKII producida por AngII, se realizaron experimentos en los se midió la fluorescencia producida por el DM-H₂DCFCA por incremento de los ROS en presencia de AngII con o sin el inhibidor de CaMKII, KN93. La base racional de estos experimentos fue determinar si los ROS

activan a la CaMKII en la cascada de señales inducida por AngII, o si la producción de ROS ocurre posteriormente a la activación de la CaMKII.

En la figura R5.A se muestran imágenes representativas de los cultivos de miocitos de rata tratados con DM-H₂DCFCA, en presencia de AngII o AngII más el inhibidor de la CaMKII. Los resultados muestran que la inhibición de la CaMKII por KN93 fué incapaz de prevenir el aumento de ROS generado por AngII en miocitos de rata, indicando que la formación de ROS inducida por AngII se encuentra precediendo la activación de la CaMKII en la cascada de señales que induce la hormona.

En breve resumen, los resultados indican hasta este punto que 1. La AngII induce muerte celular por apoptosis a través de los receptores AT1 y mediada por ROS; 2. La AngII activa a la CaMKII y esta activación es precedida por el aumento de ROS. Sin embargo, aún no sabemos qué rol cumple la kinasa en la inducción de apoptosis por AngII y cómo es posible la activación de la CaMKII en miocitos quiescentes, en donde no se producen aumentos de Ca⁺² como en los que se estimulan.

Para establecer el posible rol de la CaMKII en la apoptosis inducida por AngII, se cultivaron miocitos en presencia de AngII durante 24 hs en presencia y ausencia de dos inhibidores de la kinasa químicamente no relacionados: KN93, que compite con el sitio de unión de CaMKII a Ca⁺²-CaM, y AIP, un péptido inhibitorio de mayor especificidad que el KN93 (ver apéndice) que actuaría a través de un mecanismo diferente, posiblemente por unión al dominio catalítico^[127].

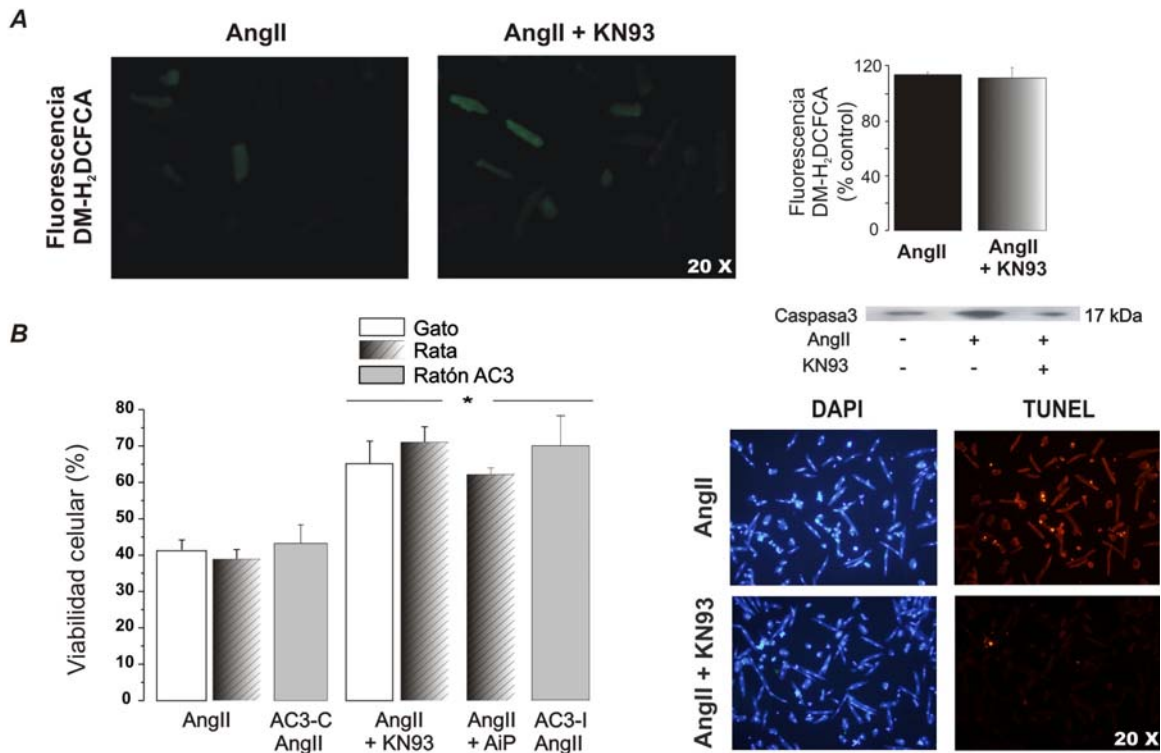


Figura R5: La inhibición de CaMKII no previene la producción de ROS pero sí la apoptosis inducida por AngII. **A**, se muestran fotos ejemplificadoras y valores promedio de fluorescencia donde el KN93 no previno el incremento de los ROS que genera el tratamiento con AngII (n=4). **B**, resultados promedio de viabilidad en miocitos cultivados de gato, rata y ratones transgénicos. La AngII induce una disminución de la misma que es prevenida en presencia de KN93, AIP o en la línea de ratones transgénicos que sobreexpresan el péptido inhibidor de la CaMKII, AC3-I (n=3 a 7 según el grupo). A la derecha se observan *blots* representativos que muestran la prevención por KN93 del aumento en la activación de caspasa3 (arriba) y de las células TUNEL positivas (núcleos amarillos/anaranjados) (debajo) inducidos por la exposición a AngII. (* $p < 0,05$ vs Ang II).

En estos experimentos se evaluaron parámetros de viabilidad celular y marcadores apoptóticos.

Se utilizaron además los ratones transgénicos previamente descritos, que expresan el péptido inhibidor, AC3-I y sus controles, AC3-C (ver apéndice). En los miocitos de estas líneas se analizó el efecto de la AngII sobre la viabilidad celular.

En la figura R5.B se muestran los resultados promedio de viabilidad celular luego de la estimulación con AngII, en los ratones transgénicos, y con AngII en ausencia y presencia de KN93 o AIP, en gato y rata. Tanto el tratamiento con los inhibidores de la CaMKII en miocitos de gato y de rata, como en la línea de ratones AC3-I se observó una prevención de la muerte celular inducida por AngII. En el panel derecho de la Figura R5.B se muestran imágenes

representativas de los experimentos donde se estudió apoptosis. Se observa que la inhibición de CaMKII previene la apoptosis, demostrada por el aumento de la actividad de caspasa3 (por *western blot*) y de las células TUNEL positivas. En promedio, los núcleos TUNEL positivos disminuyeron desde $10,1 \pm 0,1\%$ a $5,73 \pm 0,5\%$ y la actividad de caspasa3 desde $57,9 \pm 17,9\%$ a $27,5 \pm 13,9\%$ (AngII *versus* AngII+KN93, $p < 0,05$).

En su conjunto, estos resultados indican que tanto los ROS como la CaMKII son pasos necesarios en la cascada apoptótica que induce la AngII aplicada en forma sostenida.

La activación de CaMKII es inducida por la producción de ROS y ocurre sin cambios detectables en el Ca^{+2}_i

Como se mencionó anteriormente, la activación de la CaMKII es precedida por su unión a Ca^{+2} y CaM. Sin embargo, no es claro el origen del aumento de Ca^{+2} que pueda explicar la activación de CaMKII en miocitos cultivados sin estímulo eléctrico, ya que en estos miocitos no se produce el aumento de Ca^{+2} citosólico (transitorio de Ca^{+2}) que sigue al estímulo y genera el ACE. Además, como vimos antes, la activación de CaMKII por AngII se observó tanto en miocitos de gato, en los que la administración aguda de la hormona produce un aumento del Ca^{+2}_i ^[39], como en los de rata, en donde la administración aguda de AngII no modifica los niveles de Ca^{+2}_i ^[40].

A fin de dilucidar este punto, se evaluó el Ca^{+2} diastólico y la amplitud del transitorio de Ca^{+2}_i (CaT) en miocitos de rata y gato cultivados en presencia y ausencia de AngII o del agente β -adrenérgico, isoproterenol por 24 hs, y luego cargados con los indicadores fluorescentes Indo1-AM ó Fura2-AM y eléctricamente estimulados (0,5 Hz). La presencia de AngII en los cultivos de miocitos de gato no modificó el Ca^{+2} diastólico ni la amplitud del CaT cuando los miocitos de ambas especies fueron estimulados, como así tampoco el contenido de

Ca²⁺ del RS estimado por la aplicación de un pulso de cafeína (caff) que, como ya se mencionó, induce el vaciamiento de Ca²⁺ del RS y bloquea la SERCA. En contraste, en miocitos cultivados durante 24 hs con isoproterenol, una intervención que promueve apoptosis dependiente del aumento de Ca²⁺, se encontró un aumento significativo de la amplitud del CaT y del contenido de Ca²⁺ del RS. La Figura R6 muestra ejemplos típicos y resultados totales de estos experimentos.

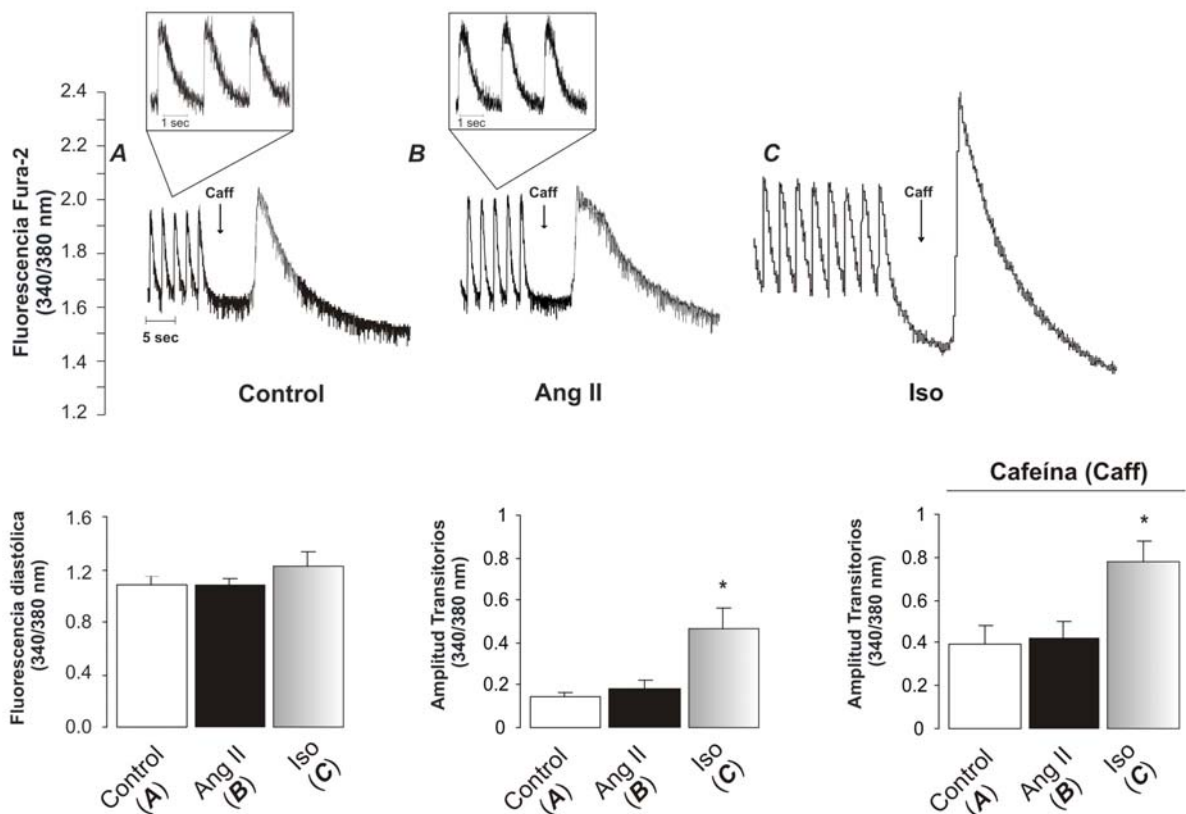


Figura R6: La estimulación con AngII no modificó el manejo del Ca²⁺. Se muestran los registros típicos del CaT y de los pulsos de cafeína (caff) en miocitos de gato adulto en condiciones control (A), tratados con AngII (B) o tratados con isoproterenol (Iso, C). Debajo se observan los valores promedio de estas intervenciones. * $p < 0,05$ vs los otros grupos (n=12 células de 4 corazones diferentes).

Por otro lado, se evaluó el Ca²⁺ basal en sístole y en diástole y la amplitud de los CaT en miocitos de rata. Los resultados demostraron que la AngII no modificó ni el Ca²⁺ diastólico, ni la amplitud del CaT, (la fluorescencia diastólica del Indo1 fue de $0,72 \pm 0,05$ y $0,70 \pm 0,05$ y la fluorescencia pico fue de $1,34 \pm 0,04$ y $1,35 \pm 0,05$, control *versus* AngII, NS en ambos casos).

Estos resultados concuerdan con resultados previos de nuestro laboratorio como lo mencionamos previamente^[40].

Estos datos permiten concluir que no existen diferencias detectables en el manejo del Ca^{+2}_i en miocitos de gato o rata, luego de 24 hs de cultivo en presencia de AngII.

Si bien no observamos alteraciones en el manejo del Ca^{+2}_i luego de la incubación con AngII, insistimos en estudiar otras posibles fuentes de Ca^{+2} que pudieran activar a la CaMKII de manera canónica. En primer término se realizaron experimentos con la finalidad de investigar la posibilidad de que un aumento transitorio de Ca^{+2} al comienzo del período de incubación con AngII, no detectable luego de 24 hs de incubación, pudiera ser responsable de la activación de la CaMKII inducida por AngII. En estos experimentos se midió el Ca^{+2} diastólico a intervalos de 10 min durante la primera hora de incubación con AngII y luego cada hora durante las 4 hs siguientes. Nuevamente no se detectaron aumentos en el Ca^{+2}_i en células tratadas con AngII comparadas con los controles en 4 experimentos en los que por lo menos se examinaron 20 células por cada tiempo observado (Figura R7.A). Estos experimentos indicaron que no hubo aumentos significativos de Ca^{+2}_i en miocitos no estimulados eléctricamente en la primeras horas de incubación sostenida con AngII.

Por otra parte y debido a que la AngII aumenta el inositol trifosfato (IP_3), es concebible que el péptido pueda producir un aumento compartamentalizado de Ca^{+2} a través de los receptores de IP_3 ^[22, 24], no detectable cuando se determina el Ca^{+2} citosólico total. Para explorar esta posibilidad, se cultivaron miocitos de rata en presencia y ausencia de 25 μM de 2-APB (2-aminoetoxidifenil borato), un inhibidor de los receptores de IP_3 ^[47, 128]. El 2-APB fue incapaz de prevenir la muerte celular inducida por AngII: la viabilidad celular fue $38,9 \pm 2,6\%$ (AngII) *versus* $36,0 \pm 3,2\%$ (2-APB+AngII, n=4). Estos resultados indicarían que un aumento compartamentalizado de Ca^{+2} producido a partir de los receptores de IP_3 no es la fuente de la activación de la CaMKII (Figura R7.B) en la vía de señalización de muerte celular estudiada.

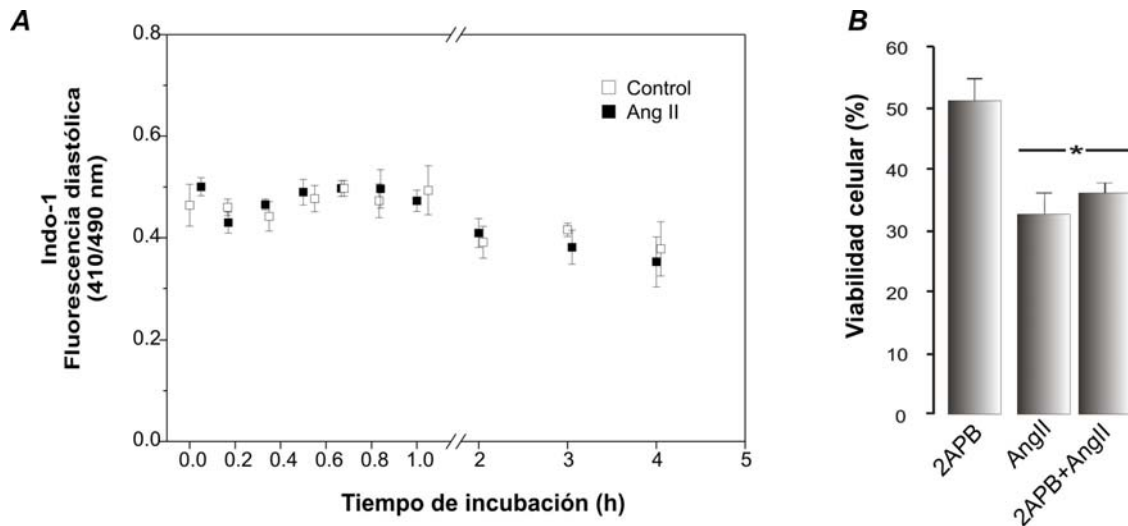


Figura R7: **A**, la AngII no produce alteraciones del Ca^{+2} diastólico. Se muestran los valores promedio de Ca^{+2} diastólico en miocitos de rata en las primeras horas de cultivo en ausencia y presencia de AngII. No se observan variaciones significativas del Ca^{+2} basal o diastólico en ninguna de las dos situaciones. **B**, la activación de la CaMKII por AngII no depende del Ca^{+2} liberado por el receptor de IP_3 . Se pueden observar los valores promedio de viabilidad celular en presencia de un inhibidor de los receptores de IP_3 , el 2 APB. * $p < 0,05$ vs 2APB.

Los resultados de estos experimentos, en donde se exploraron posibles aumentos de Ca^{+2}_i producidos por AngII en miocitos quiescentes, apoyan la conclusión que la activación de CaMKII por AngII puede ocurrir en ausencia de un aumento detectable del Ca^{+2}_i .

A fin de profundizar este punto, se realizaron experimentos en los que se investigó la posibilidad de que la AngII fuera capaz de aumentar la actividad de CaMKII y producir apoptosis en presencia de 1 μ M de BAPTA-AM (un quelante intracelular de Ca^{+2}). Para la realización de estos experimentos, se agregó BAPTA-AM al cultivo celular. Luego de 1 h, el medio de cultivo fue cambiado por uno fresco con 1 μ M de BAPTA-AM y AngII \pm KN-93. En experimentos controles se demostró que esa concentración de BAPTA-AM prevenía la muerte celular y el aumento en los niveles de Ca^{+2} inducido por exposición de las células al ionóforo de Ca^{+2} , A23128 (Figura R8.A). Además, el BAPTA previno la contracción y el CaT asociado y disminuyó la fluorescencia basal del Indo1 a valores menores a los diastólicos en miocitos de gato estimulados con AngII. Estos experimentos controles indican que el BAPTA fue

incorporado a la célula en forma apropiada y que los niveles de Ca^{+2}_i en presencia de BAPTA alcanzaron niveles subdiastólicos.

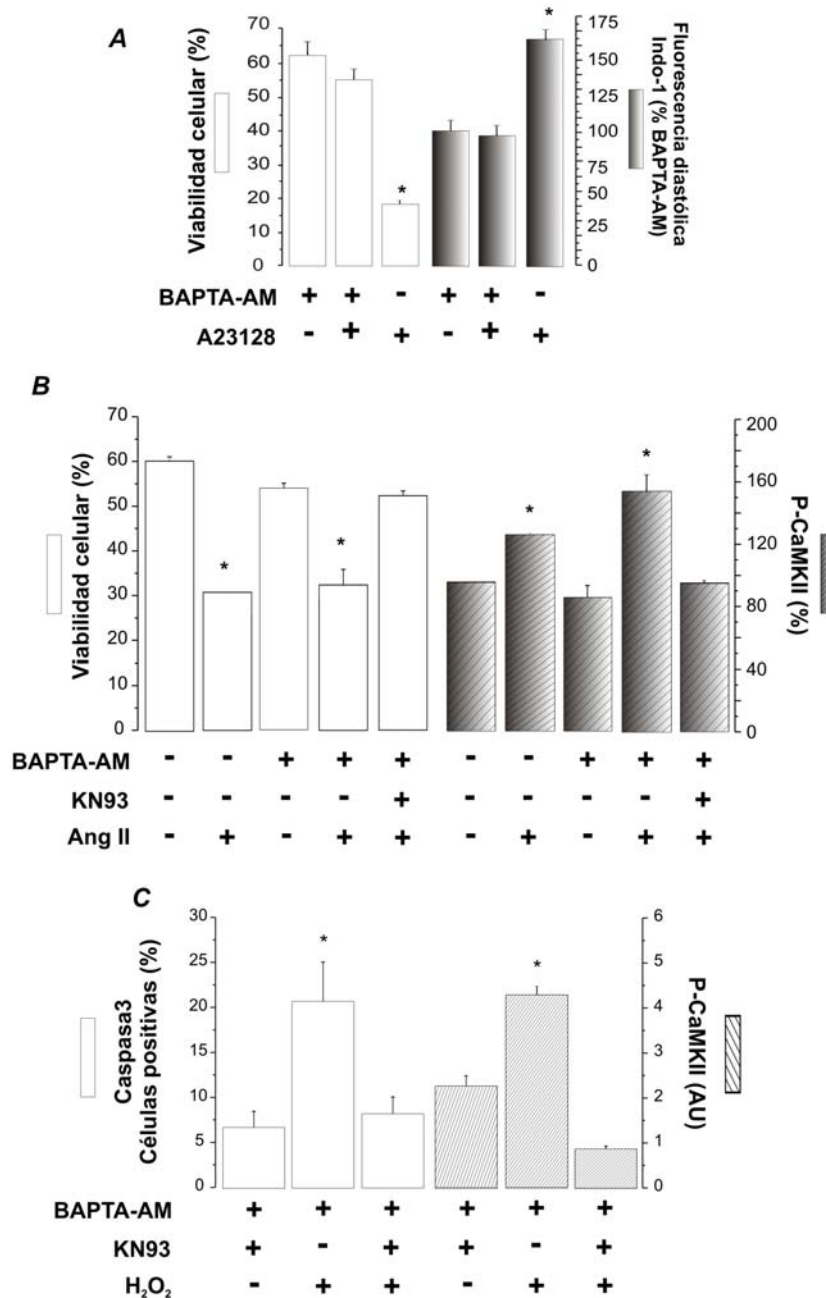


Figura R8: La AngII y el H₂O₂ inducen activación de CaMKII y disminución de la viabilidad celular en ausencia de Ca⁺² nominal. A, se muestran los valores promedio de viabilidad celular y Ca⁺² diastólico (fluorescencia de Indo1). B, se muestran los valores promedio de viabilidad celular y activación de la CaMKII (P-CaMKII), en miocitos de gato en presencia y ausencia de BAPTA-AM luego de la activación por AngII±KN93 C, valores promedio de fluorescencia por activación de CaMKII (P-CaMKII) y caspasa3 en presencia y ausencia de BAPTA-AM, tras la estimulación con H₂O₂±KN93. * $p < 0,05$ vs otros grupos, n=4 por grupo.

una

disminución en la viabilidad celular y un aumento en la actividad de la CaMKII y que dichos

efectos fueron prevenidos por KN93. Estos resultados confirman que la AngII estimula a la CaMKII en ausencia nominal de Ca^{+2} y que esta activación se asocia a una disminución en la viabilidad celular.

Debido a que la AngII aumenta los niveles de ROS, (Figura R3), se estudió si éstos podrían promover la activación de CaMKII y la apoptosis en presencia de BAPTA-AM, en miocitos incubados con 200 μ M de H_2O_2 . La Figura R8.C muestra, que tanto la proporción de P-CaMKII como la actividad de caspasa3 aumentaron en presencia de H_2O_2 , aún en ausencia nominal de Ca^{+2} , y que dichos aumentos fueron prevenidos por el co-tratamiento con KN93. Estos resultados en conjunto indican que la producción de ROS inducida por AngII puede activar a la CaMKII aún a concentraciones subdiastólicas de Ca^{+2} .

La activación de CaMKII por ROS no puede atribuirse a un efecto de los ROS sobre la CaM

Debido a que la calmodulina (CaM) es una proteína con muchos residuos metionina susceptibles de oxidación^[129, 130], se exploró si el efecto de los ROS sobre la activación de la CaMKII podía ser atribuido a una acción directa de los ROS sobre la CaM^[131]. Se realizaron experimentos en miocitos aislados y en homogenatos de corazón *in vitro* con el inhibidor de CaM, W7. En la figura R9 se puede observar que en miocitos en cultivo pre-tratados con BAPTA-AM, el W7 fue incapaz de afectar la muerte celular inducida por H_2O_2 y la actividad de CaMKII (P-CaMKII y P-Thr¹⁷). En cambio el inhibidor de CaMKII, KN93, previno ambos efectos. Es importante destacar que cuando el H_2O_2 fué administrada sola, produjo un aumento en la actividad de CaMKII (determinada por P-Thr¹⁷ de PLB), de $224 \pm 51\%$ (n=3), que se asoció con la disminución de la viabilidad celular mostrada en la figura R9.A. BAPTA-AM, KN93 y W7 no afectaron la actividad basal de CaMKII cuando estos compuestos se administraron solos.

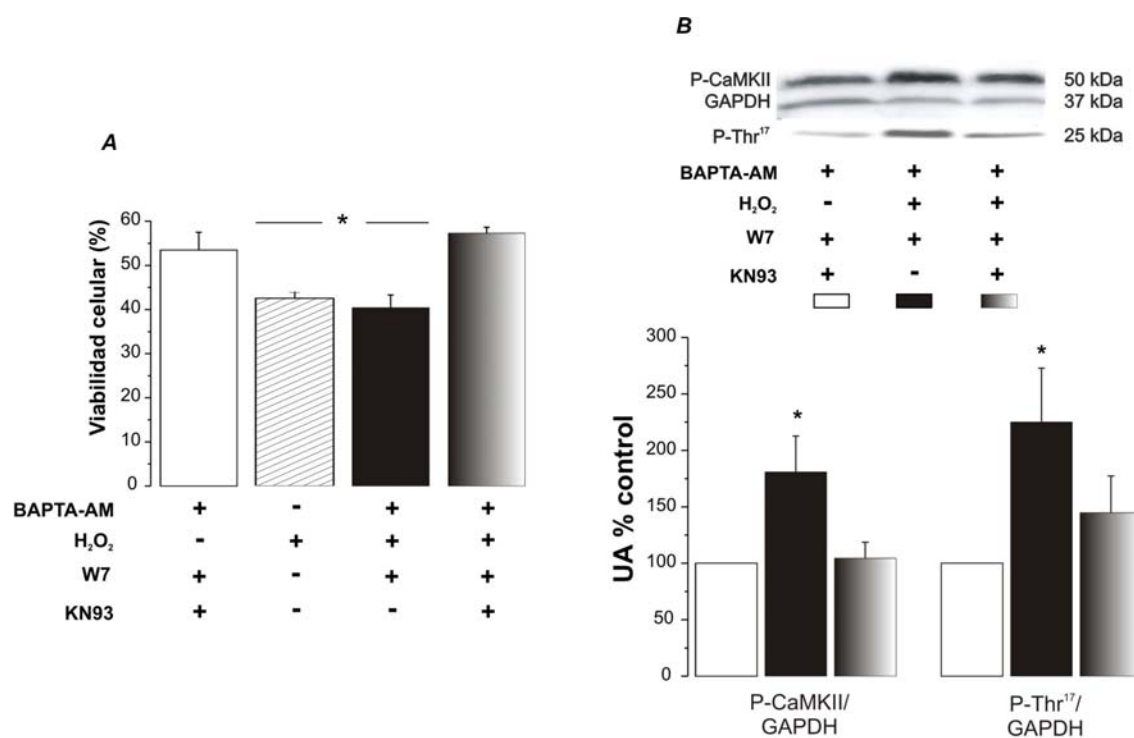


Figura R9: El H₂O₂ induce activación de la CaMKII y la muerte celular aún en presencia de BAPTA-AM y W7. A, promedios de la viabilidad celular de miocitos cultivados de gato en presencia de H₂O₂. El H₂O₂ disminuye la viabilidad celular a concentraciones de Ca²⁺ sub-diastólicas (BAPTA-AM) y en presencia de W7 administrado para producir la inhibición de CaM. B, blots típicos y resultados promedio de la activación de la CaMKII (P-CaMKII) y su sustrato, la P-Thr¹⁷ de PLB, tras la estimulación con H₂O₂ en presencia y ausencia de BAPTA-AM, W7 y KN93. * $p < 0,05$ vs otros grupos.

La Figura R10 muestra resultados similares a los que obtuvimos en miocitos, en ensayos de fosforilación *in vitro* a partir de homogenatos de corazones no estimulados y perfundidos con bajo Ca⁺², nifedipina y EDTA, para favorecer la depleción celular de Ca⁺²_i, en ausencia y presencia de 1 a 10 mmol/L de EGTA en el *buffer* de fosforilación. En estos experimentos, el H₂O₂ incrementó la activación de la CaMKII (P-CaMKII) en un medio nominalmente libre de Ca⁺² (0 Ca⁺²-EGTA) y sin el agregado exógeno de CaM, tanto en ausencia como en presencia de W7.

El hecho de que el W7 no haya tenido efecto en el aumento de la actividad de CaMKII, podría atribuirse a que la CaM, al oxidarse, resista a los efectos inhibitorios del W7. Para estudiar esta posibilidad, realizamos otros experimentos *in vitro* en donde se pudo demostrar que el W7

efectivamente disminuyó en $60,8 \pm 9,9\%$ el aumento de la P-CaMKII producido por adición de Ca^{+2} en presencia de H_2O_2 .

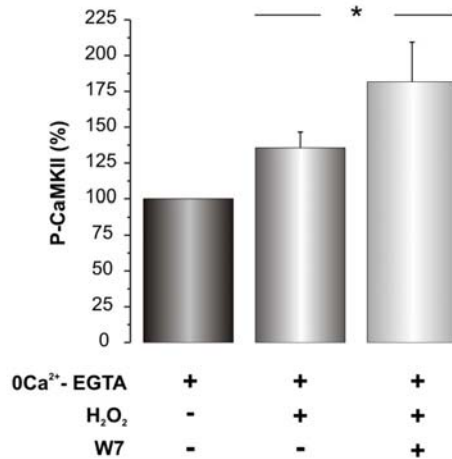


Figura R10: El H_2O_2 induce activación *in vitro* de la CaMKII aún en presencia de EGTA y W7. Se muestran los resultados promedio de los ensayos de fosforilación *in vitro* de la CaMKII tras la estimulación con H_2O_2 en presencia de EGTA y W7 a partir de homogenatos de corazón entero.* $p < 0,05$ vs Control 0Ca²⁺-EGTA.

Estos resultados en su conjunto indican que el W7 es capaz de inhibir eficientemente a la CaM, aún en presencia de H_2O_2 , evidenciando que los residuos metionina de CaM susceptibles de oxidación no están implicados en la actividad de la CaM. Los resultados sugieren además que la activación de la CaMKII podría ser mediada directamente por los ROS o que los ROS desplazarían la dependencia de la CaMKII a Ca^{+2} -CaM, a niveles extremadamente bajos, subfisiológicos, de Ca^{+2} .

La activación de la p38 MAPK interviene en la muerte celular inducida por AngII

Debido a que la p38 MAPK está vinculada con la muerte por apoptosis en diferentes modelos de injuria cardíaca^[60, 132], quisimos evaluar el posible rol de la p38 MAPK en la apoptosis inducida por AngII. Para ello se siguieron dos estrategias diferentes: (A) Se cultivaron miocitos de rata y gato con AngII más el inhibidor de la p38 MAPK, el SB202190 (SB), para evaluar la

viabilidad celular y luego la activación de la kinasa por *western blot*; (B), se sobreexpresó la p38 MAPK en miocitos de rata a través de transfección génica de adenovirus (Adv.p38). En estos últimos experimentos se sobreexpresó además a la β Gal (Adv- β Gal), la que fue utilizada como control. La evaluación de la viabilidad celular en el cultivo quiescente de miocitos de gato demostró que el incremento de la muerte celular que inducía la AngII fué prevenido con el inhibidor de la p38 MAPK, el SB (Figura R11.A). Resultados similares se obtuvieron en miocitos de rata. La figura R11.B muestra en miocitos de rata que, aunque la viabilidad de las células que sobreexpresan la p38 MAPK no fue diferente de las que sobreexpresan β -gal en condiciones controles, las células infectadas con Adv.p38 e incubadas con AngII mostraron una viabilidad significativamente reducida con respecto a las células que sobreexpresan la β -gal. Se observa además en la Figura R11.B, que luego de 24 hs, las células infectadas con el adenovirus expresaron notoriamente el gen reportero de la proteína fluorescente verde (GFP), lo que indica que el gen de interés también se sobreexpresó en la misma proporción.

Estos experimentos revelan que la p38 MAPK estaría implicada en la muerte celular inducida por AngII.

Por otro lado la figura R11.C muestra además que el aumento de la actividad de p38 MAPK inducido por AngII, fué prevenido completamente por KN93. Sin embargo el SB no afectó la actividad de la CaMKII inducida por AngII (AngII: $194,1 \pm 26,8\%$ del control, AngII+SB: $180,9 \pm 21,5\%$ del control, NS, n=6).

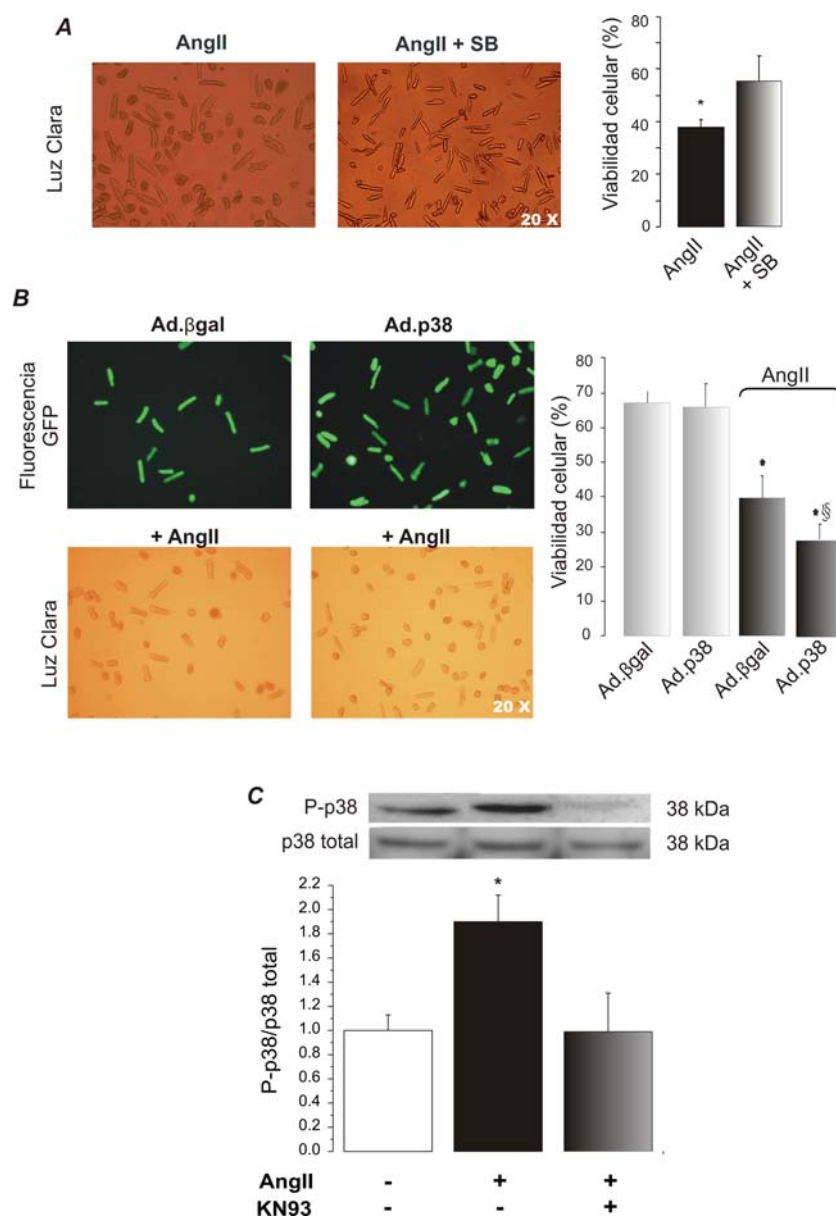


Figura R11: La p38 MAPK es activada por AngII y produce muerte celular mediada por la activación de CaMKII. **A**, se muestran imágenes representativas y los promedios de viabilidad celular en presencia de AngII o AngII + SB (n=4 por grupo). **B**, se muestran fotos típicas y valores promedio (n=3), de miocitos de rata transfectados con adenovirus conteniendo p38 MAPK vs los genes de *LacZ* (β Gal). Las fotos de fluorescencia demuestran un alto índice de transfección del gen reportero (GFP) lo que coincidiría con la expresión del gen de interés. Las células infectadas con Adv.p38 e incubadas con AngII muestran una viabilidad significativamente menor que las células que sobreexpresan la β Gal. * $p < 0,05$ vs Ad. β Gal § $p < 0,05$ vs Ad.p38. **C**, se muestran *blots* típicos de activación de la p38 MAPK (P-p38) que induce la AngII en relación a la proteína total, que es prevenida en presencia de KN93. Debajo los valores promedio de estos datos. * $p < 0,05$ vs otros grupos (n=6).

Estos resultados permiten afirmar que la p38 MAPK está implicada en la vía apoptótica que induce la AngII. Además demuestran que la activación de la CaMKII es previa a la de p38 MAPK en la cascada de señales de apoptosis que induce la hormona.

Discusión

DISCUSIÓN

Como se ha descrito a lo largo de este trabajo de tesis, la AngII se encuentra implicada en la regulación de distintos procesos fisiológicos y patológicos. En el corto plazo, se ha vinculado a la hormona con la modulación de la contractilidad y del AEC. Recientes experiencias de nuestro grupo de trabajo, demostraron que el péptido genera efectos inotrópicos positivos o negativos en diferentes especies por mecanismos subcelulares distintos. En el gato, produce un efecto inotrópico positivo causado por un incremento del Ca^{+2}_i ^[39, 47]. En la rata, un efecto inotrópico negativo, vinculado con la pérdida de la sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos y mediado por la actividad de la p38 MAPK^[40]. En el largo plazo, la administración crónica de AngII ha sido relacionada con distintos procesos deletéreos incluyendo la apoptosis de miocitos cardiacos^[30, 53, 133, 134].

Desde los estudios pioneros del grupo de Anversa el efecto apoptótico inducido por la hormona ha sido asociado con incrementos en el Ca^{+2}_i ^[30]. Kajstura *et al* evaluaron la relación entre la administración sostenida de AngII y el incremento en los eventos de muerte celular (evaluada morfológicamente y por degradación del DNA en miocitos aislados de rata). En este trabajo se demostró que la administración exógena de AngII induce un incremento de la muerte celular que puede ser prevenido quitando del medio intracelular gran parte del Ca^{+2} o bloqueando selectivamente el receptor AT1 de la hormona. Estos resultados indicaron que la señalización de la muerte celular inducida por AngII es mediada por este receptor. Desde entonces, diferentes moléculas han sido vinculadas a los efectos apoptóticos inducidos por la AngII. En fibroblastos cardíacos de rata se ha descrito que la administración de AngII induce apoptosis (fragmentación del DNA, activación de caspasas y alteración de la proporción de las proteínas Bax/bcl2), a través de la vía PLC/PKC^[135]. Por otro lado, en distintos tipos celulares propios del tejido cardiaco, el incremento de la producción de ROS (mediada por la activación de la NADPH oxidasa) por AngII, ha sido relacionado con apoptosis mediada por la activación

de ASK1, JNK/p38 MAPK y PKC^[53, 136]. Si bien estos trabajos contribuyeron a la dilucidación de las vías de señalización intracelular que inducen la muerte del miocito luego de la administración de AngII, la cascada completa que se desencadena desde la activación del receptor AT1 y culmina en apoptosis, aún no es totalmente conocida. En el presente trabajo de tesis nos propusimos investigar la intervención de CaMKII, -una molécula reconocidamente apoptótica-, en esta cascada y el mecanismo por el que esta molécula podría ser activada en presencia de AngII.

Los principales hallazgos obtenidos en busca de estos objetivos, fueron: 1. La AngII induce apoptosis a través de una secuencia concatenada de eventos que se inicia con la estimulación de los receptores AT1 y en la que intervienen los ROS, la CaMKII y la p38 MAPK (figura D1); 2. En presencia de AngII, la activación de CaMKII ocurre a concentraciones subdiastólicas de Ca^{+2} ; 3. La administración de AngII en miocitos de especies donde el efecto inotrópico de la hormona administrada en forma aguda es opuesto, induce muerte por apoptosis a través de una única vía común. Estos resultados indican que la diferencia entre especies en las vías involucradas en el efecto inotrópico de la AngII, parece estar ausente en el efecto apoptótico de la hormona y permiten sugerir la existencia de una única cascada apoptótica inducida por AngII, operativa en un amplio rango de especies, inclusive la humana. Se desconoce si la activación de p38 MAPK por CaMKII y la disminución de la viabilidad celular asociada a dicha activación involucran o no moléculas intermedias. La respuesta a este punto no surge de nuestros resultados y requiere nuevos experimentos que estudien específicamente en mayor profundidad estos pasos de la cascada de muerte celular iniciada por AngII y descrita en el presente trabajo.

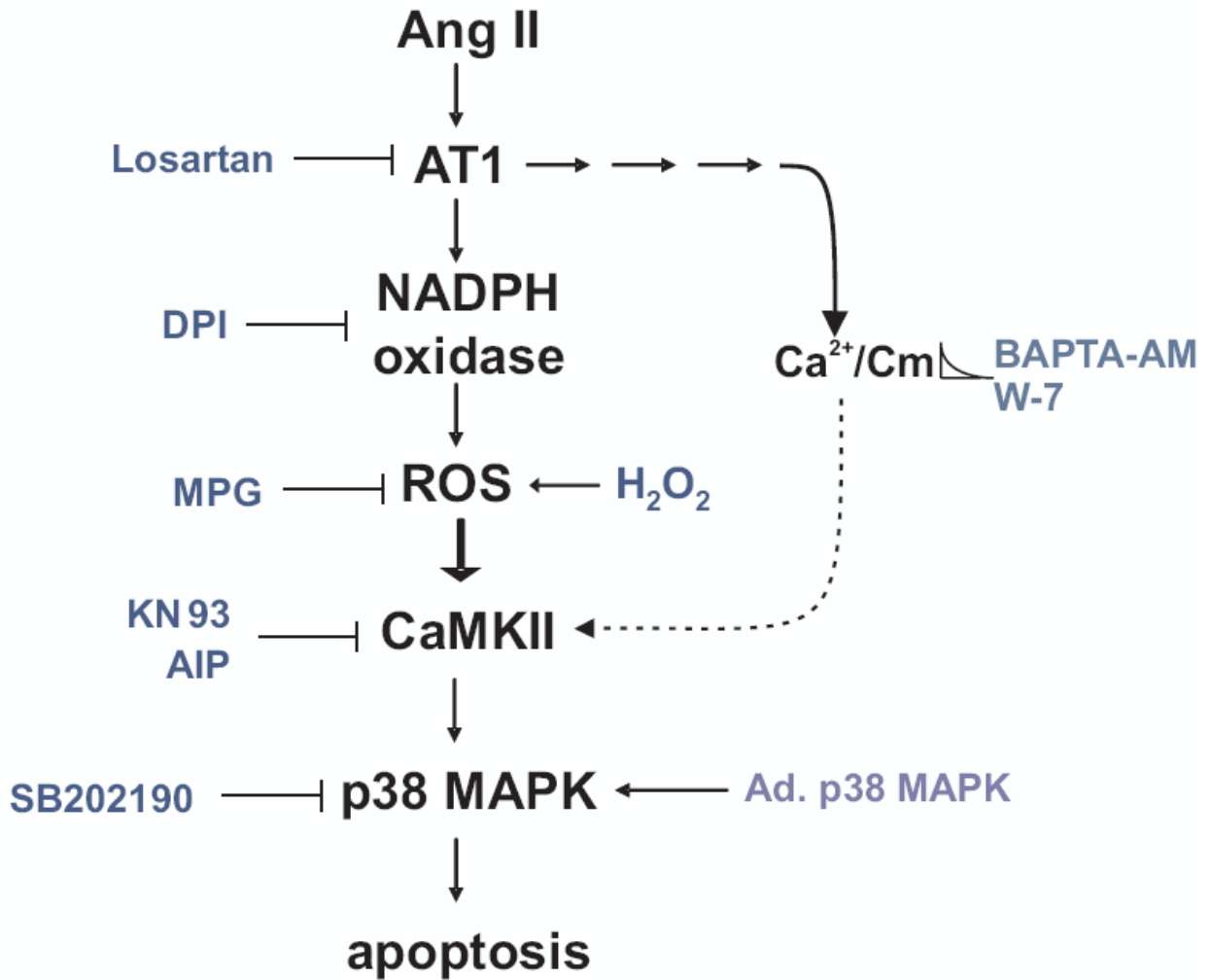


Figura D1: *Cascada de eventos que ocurren desde la estimulación del receptor AT1 de AngII hasta la inducción de apoptosis.* Luego de la activación del receptor AT1, la AngII induce un incremento de los ROS mediado, en parte, por la actividad de la NADPH oxidasa (prevenido con el tratamiento con DPI o inhibido con MPG), y emulado por H₂O₂. Los ROS alterarían la sensibilidad de la CaMKII por el Ca²⁺ permitiendo la activación de la kinasa en condiciones subdiastólicas del ion. La activación de p38 MAPK que ocurre luego de la activación de CaMKII desencadenaría la apoptosis mediada por Caspasa3.

La rama derecha de la vía de señalización representa la manera canónica de activación de la kinasa. La línea punteada indica la disminución de la dependencia de Ca²⁺/CaM en la activación de CaMKII, a valores subdiastólicos de Ca²⁺_i.

Las leyendas en celeste representan las intervenciones que permitieron inhibir (—|) ó estimular (—>) los distintos eventos de la cascada propuesta y que permitieron confirmar la participación de estas moléculas.

La AngII induce muerte celular por apoptosis a través de la activación de CaMKII mediada por ROS.

Los resultados obtenidos indican que la AngII indujo un incremento de la producción de ROS en asociación con la activación de la CaMKII. Tanto la inhibición de ROS como la prevención de la activación de CaMKII fueron capaces de inhibir la muerte celular inducida por AngII

(figuras R3 y R5). Por otra parte, el inhibidor de CaMKII, KN93, disminuyó tanto la fosforilación de la kinasa como la apoptosis, sin afectar la producción de ROS (figuras R4 y R5), indicando que el aumento en los radicales libres se produce previamente a la activación de la CaMKII. Estos resultados confirman la activación de la CaMKII por ROS, recientemente descrita en la cascada apoptótica que induce la AngII^[65, 137].

La CaMKII incrementó su actividad por medio de los ROS en condiciones libres de Ca⁺² y luego de la inhibición de la CaM

Recientemente se han publicado distintos trabajos que sugieren que la actividad de la CaMKII puede ser sostenida en forma no canónica a través de los ROS^[65, 138]. Esto ocurriría por modificaciones redox de los residuos de metionina 281-282 de la kinasa^[65]. Esta activación de la kinasa, propuesta por el grupo de Anderson, requeriría una *apertura* previa de la misma por Ca⁺²-CaM a fin de hacer accesibles los sitios metionina 281-282 para su oxidación (ver Introducción). En nuestros experimentos, los miocitos se encontraban en condiciones quiescentes, por lo que la fuente de Ca⁺² necesaria para activar inicialmente a la kinasa no era obvia. De hecho, cuando en experimentos iniciales se midió el Ca⁺²_i en ambas especies luego de 24 hs de cultivo en presencia de AngII, no se detectaron aumentos ni en el Ca⁺²_i diastólico o sistólico ni en el contenido de Ca⁺² del RS (figura R6).

Estos resultados nos llevaron a explorar en profundidad un posible aumento de Ca⁺²_i que justificase la activación de la kinasa, considerando diferentes hipótesis:

- (1) El aumento de la concentración de Ca⁺²_i podría ocurrir dentro de las primeras horas del período de cultivo. Esta posibilidad está avalada por experimentos que describen un incremento en el Ca⁺² diastólico luego de la incubación con Ang II^[30].
- (2) Puede existir un aumento compartimentalizado de Ca⁺²_i, no detectable a través de las medidas por epifluorescencia del Ca⁺² citosólico global, capaz de activar la CaMKII. Una

liberación de Ca^{+2} a través de receptores de IP_3 es un posible mecanismo por el cual la AngII puede producir un aumento restringido de Ca_i^{+2} [22].

(3) Los ROS puedan alterar la afinidad de la CaM por la CaMKII. Así por ejemplo, está descrito que la CaM puede asociarse débilmente a su dominio de unión a la quinasa, incluso antes de su unión al Ca^{+2} y que algunos procesos celulares están regulados por CaM libre de Ca^{+2} [139].

(4) La AngII no afecta los niveles basales Ca^{+2} pero, a través del aumento de los ROS, produce una inhibición de las fosfatasas que permita mantener la fosforilación de CaMKII a concentraciones basales de Ca_i^{+2} . Esta posibilidad ha sido sugerida en linfocitos[138].

(5) Pueden existir condiciones en las que los ROS pueden activar directamente a la CaMKII, sin requerir del complejo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$.

(6) Los ROS puedan re-establecer el valor de Ca^{+2} requerido para la activación de la CaMKII a valores sub-fisiológicos.

Las primeras dos hipótesis no son compatibles con los resultados obtenidos en el presente trabajo porque: (1) no se detectó un aumento significativo de los niveles de Ca^{+2} diastólicos durante las primeras 4 hs de incubación con AngII en relación a los controles (figura R7.A) y (2) la inhibición de los receptores de IP_3 no pudo evitar la muerte celular inducida por AngII (figura R7.B). Más relevante aún, la incubación de los miocitos con AngII en presencia de BAPTA-AM no pudo prevenir ni el aumento en la fosforilación de CaMKII ni la muerte celular inducida por AngII (figura R8). La presencia de 0Ca-EGTA tampoco pudo prevenir la activación de CaMKII inducida por H_2O_2 *in vitro* (figura R10). Estos resultados indican que posibles aumentos compartimentalizados y no detectados de Ca^{+2} son candidatos poco probables para explicar la activación de CaMKII por AngII.

El hallazgo de que la inhibición de CaM con W7 en presencia de BAPTA-AM no afectó la fosforilación (activación) de CaMKII inducida por H_2O_2 (Figura R10), permite excluir la

tercera posibilidad, es decir, una regulación directa de CaM por ROS. En línea con esta conclusión, trabajos recientes demostraron que la oxidación de la CaM no induce sino que disminuye la activación de la CaMKII^[131].

La cuarta hipótesis, es decir, un aumento en la actividad de CaMKII causada por inhibición de fosfatasa por ROS, capaz de aumentar la fosforilación de la kinasa, es difícil de reconciliar con el hecho de que la autofosforilación de la misma requiere un previo despliegue del dominio inhibitorio de la CaMKII por Ca^{+2} -CaM para ser activada. La inhibición de fosfatasa sólo sería capaz de aumentar la actividad de CaMKII, medida como fosforilación de la CaMKII, si la kinasa ha sido previamente activada para autofosforilarse.

De acuerdo con esto, se podría sugerir *a priori* que la AngII induce una activación de la CaMKII en miocitos aislados de diferentes especies de manera independiente de Ca^{+2} -CaM y mediada por ROS. Hasta lo que se conoce actualmente, existen al menos tres razones que atentan contra esta posibilidad. En primer lugar, los experimentos de Erickson *et al* han demostrado que la presencia de Ca^{+2}_i es un requisito previo indispensable para desplegar la unidad regulatoria de la CaMKII^[65]. En segundo lugar, a pesar de que utilizamos diferentes estrategias para disminuir el Ca^{+2}_i , es conocido que la depleción completa de Ca^{+2}_i en los sistemas vivos es prácticamente imposible. En tercer lugar, hemos podido prevenir la activación de CaMKII que induce la AngII con KN93, que inhibe a la CaMKII por compartir el sitio de unión de la kinasa con el complejo Ca^{+2} -CaM. Por lo tanto, de las posibles hipótesis consideradas para explicar la activación de CaMKII por AngII en miocitos quiescentes, pensamos la que considera que luego de un incremento de los ROS, inducido por AngII, desplazaría la dependencia de Ca^{+2} de la CaMKII, a niveles extremadamente bajos (subdiastólicos) del ion. Esta hipótesis es la que más adecua a nuestros resultados. En estas condiciones, es posible que la inhibición de fosfatasa por ROS también haya contribuido a mantener la activación de la CaMKII^[138]. Efectivamente, trabajos recientes indican la

necesidad de la inhibición de fosfatasa para la progresión de la autofosforilación de CaMKII. En este contexto, cabe mencionar que tanto en el *buffer* de fosforilación *in vitro* como en condiciones de cultivo *ex vivo*, donde se quela el Ca^{+2}_i (por EGTA o BAPTA AM, figuras R9-R10), la actividad de la fosfatasa PP2B puede disminuir (mediada por el aumento de la fosforilación del inhibidor 1) e inhibir a la PP1, una de las principales fosfatasas implicadas en la desfosforilación de la CaMKII^[140]. En base a estas consideraciones la contribución de las fosfatasas a la activación de CaMKII por AngII en nuestros experimentos, no puede excluirse por completo.

Rol de la p38 MAPK en la apoptosis

Nuestros resultados muestran, tanto a través de los experimentos en que se inhibió a la p38 MAPK como en los que se la sobreexpresó, que el rol de la p38 MAPK es crucial en la sucesión de los eventos por los que AngII induce muerte celular (Figura R11). Por otro lado, los resultados indican que la activación de la p38 MAPK es precedida por la de CaMKII en la vía de muerte celular por la AngII, lo que sugiere la posibilidad que la CaMKII active a la p38 MAPK. Existen numerosos trabajos donde se describe la regulación de la p38 MAPK por CaMKII. Estos trabajos indican que en esta regulación están involucradas otras moléculas tales como la kinasa 1 de regulación apoptótica^[141], la Janus kinasa 2^[142] y la proteína kinasa R^[143], y avalan nuestros resultados respecto a la interrelación entre ambas moléculas. También se ha descrito que la p38 MAPK podría regular el balance entre las proteínas pro-apotóticas y anti-apotóticas que determina la vía mitocondrial de muerte celular, Bax y Bcl2^[92]. Nuestros resultados vinculan a la p38 MAPK con la apoptosis que induce la estimulación con AngII y además permiten posicionarla en dicha cascada de señalización, luego de la activación de la CaMKII.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo describen una secuencia de eventos por la cual la AngII induce apoptosis en células cardíacas. En la cascada que proponemos, la AngII, luego de su unión con el receptor AT1 induce la producción de ROS (a través de la NADPH oxidasa), lo que aparece como el disparador inicial para la activación de CaMKII y el inicio del proceso de apoptosis, con la activación de la p38 MAPK y la vía apoptótica de caspasas (figura D.1). Los resultados presentados demuestran además que el incremento de los ROS y la activación de CaMKII ocurren sin la necesidad de un aumento Ca^{+2}_i y puede tener lugar a niveles extremadamente bajos, no detectables, del ion. Estos hechos revelan una novedosa forma de acción de los ROS en el mecanismo de activación de la CaMKII, es decir los ROS re-establecerían la dependencia Ca^{+2} -CaM de la CaMKII a concentraciones de Ca^{+2} por debajo de las disatólicas. Finalmente, nuestro trabajo demuestra que la administración sostenida de AngII induce apoptosis de los cardiomiocitos por una vía de señalización que se conserva en dos especies diferentes de mamíferos superiores, independientemente de las respuestas inotrópicas que suscite la hormona en condiciones de administración aguda.

Por último, los resultados permiten especular que la vía descrita podría contribuir a la disfunción contráctil del corazón en la insuficiencia cardíaca, entidad en la que tanto la AngII, y los niveles de ROS como la actividad de la CaMKII y la p38 MAPK, se encuentran incrementados.

Apéndice

APÉNDICE

Soluciones, medio de cultivo, drogas y anticuerpos.

Buffer HEPES

Compuesto	Concentración en milimoles/l (mM)
NaCl	146,2
KCl	4,69
Glucosa	11
HEPES	10
NaH ₂ PO ₂	0,35
SO ₄ Mg	1,05

Llevado a pH 7,4 con NaOH.

Concentración de Ca⁺² fisiológicos de cada especie: Gato 1,35mM;
Rata 1mM
Ratón 2,5mM.

Buffer de lisis para corazón entero

Este *buffer* permite la lisis para corazón entero, para obtener una suspensión proteica protegida de la acción de proteasas y fosfatasas propias del tejido.

Compuesto	Concentración
ClNa	150 mM
Igepal	1 %
EDTA	2 μM
Tirón	0,01 %
Tris	50 mM
DTT	2 mM
<i>Cocktel de inhibidores de fosfatasas y proteasas</i>	1,6 %

Se utilizaron 5 volúmenes de *buffer* por cada volumen de homogenato, se homogeneizaron y luego se centrifugaron las muestras a 13000 r.p.m durante 10 min para recuperar el sobrenadante con las proteínas en suspensión.

Buffer de lisis de miocitos

Este *buffer* permite la lisis de los miocitos aislados, para obtener una suspensión proteica protegida de la acción de proteasas y fosfatasas propias del tipo celular.

Compuesto	Concentración
Igepal	1 %
NaGP	20 μ M
EGTA	1 μ M
VO ₃ Na ₂	0,2 μ M
Ditiotreitol	2 μ M
Benzamidina	1 μ M
EDTA	2 μ M
Fluoruro de Na	20 μ M
Tritón	0,01 %
PMSFD	1 μ M
Leupetina	0,4 %
Peptastina	0,098 μ M

Para ello se colectan los miocitos, se los centrifuga suavemente y se colocan por cada parte del *pellet* de células, 5 partes del Buffer de lisis. Se mantiene a 4°C durante 30 min, agitando cada 10 min. Pasado este período de tiempo se centrifuga durante 15 min a 13000 r.p.m. y se recupera el sobrenadante.

Buffer de siembra desnaturizante para proteínas.

Compuesto	Concentración
Glicerol	20%
β Mercaptoetanol	2%
SDS	4%
Tris	0,13 M
Azul de Bromofenol	1 mg

Llevado a pH 6,8 con HCl. Este *buffer*, le brinda a la muestra un medio desnaturizante e incrementa su densidad comparado con el *buffer* de corrida.

Buffer de fosforilación

Compuesto	Concentración (mM)
HEPES	50
MgCl ₂	10
EGTA	1-10
Ácido Okadaico	0,1
NaF	5
PKI	1

La reacción es descrita en Materiales y Métodos.

Buffer PBS

Compuesto	Concentración (mM)
ClNa	2,6
KCl	10
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Este *buffer* permite mantener el equilibrio de iones cuando se lavan los cortes histológicos.

Buffer TBS

El *buffer* TBS esta compuesto por Tris-Base (19 mM) y NaCl (130 mM) a pH aproximado de 7,6. Puede, dependiendo del consejo del fabricante, acompañarse con un detergente (*tween20* 0,1%, Tw). Este *buffer* fue empleado en las soluciones de bloqueo, lavado y preparación de anticuerpos.

Lista de anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos según las recomendaciones de los fabricantes; se detalla en la tabla la reactividad del anticuerpo, el animal de origen, la dilución utilizada y la marca del fabricante. Se utilizó como *buffer* el TBS \pm Tw.

Anticuerpo	Animal de origen	Dilución utilizada (anti: Bufer)	Marca
pThr ¹⁷ PLB	Rabbit (conejo)	1:5000 TBS leche 1%	Badrilla
pCaMKII	Rabbit	1:1000 TBS _{tw} albúmina 1%	Chemicon
pCaMKII (IHQ)	Rabbit	1:400 TBS _{tw} albúmina 1%	Badrilla
Caspasa3	Rabbit	1:500 TBS _{tw} albúmina 1%	Chemicon
GAPDH	Rabbit	1:1000 TBS _{tw} leche 1%	Chemicon
pP38 MAPK	Rabbit	1:1000 TBS _{tw} leche 1%	Santa Cruz
P38 MAPK	Rabbit	1:1000 TBS _{tw} leche 1%	Santa Cruz
Actina	Mouse (ratón)	1:1000 TBS _{tw} leche 1%	Sigma
Anti-Mouse	Goat (cabra)	1:20000 (dependiendo del buffer)	Santa Cruz
Anti-Rabbit	Goat (cabra)	1:20000 (dependiendo del buffer)	Santa Cruz

Medio de cultivos de miocitos

El medio de cultivo es DMEM provisto por GIBCO (número de catalogo 10567-022). Fue preparado bajo las sugerencias del fabricante, con la adición de los siguientes componentes:

Compuesto	Concentración por litro de solución
Ac. Ascórbico	0,9 mg
BSA	100 mg
L-carnitina	20 mg
Creatina	33 mg
Taurina	31 mg
Penicilina/Streptomicina	500 μ l

Llevado a pH 7,4 con NaOH.

Una vez preparado y llevado a pH, se lo filtró con filtros de 0,2 μm de poro, fraccionado y congelado a -20°C hasta su uso.

Compuestos activos utilizados durante el período de cultivo.

Se han descrito los pretratamientos con las drogas que interfieren en la cascada propuesta o emulan la aparición de un producto de la vía que se pretende demostrar (figura D.1). Los compuestos fueron agregados al medio de cultivo 10 min antes de la adición de AngII 1 μM . Cultivos controles, con el agregado solamente del compuesto, fueron realizados para verificar los efectos del compuesto *per se* sobre los miocitos.

Compuesto	Concentración en milimoles/litro (mM)	Función
PD 123.319	1 μM	Bloqueante de los receptores AT ₂
Losartán (Los)	1 μM	Bloqueante de los receptores AT ₁
BAPTA AM	1 μM	Quelante intracelular de iones divalentes
EGTA	10 mM	Quelante extracelular de iones divalentes
H ₂ O ₂	0,2 mM	Donante de ROS
*KN93	1 μM	Inhibidor de CaMKII
^φ AIP	2,5 μM	Péptido inhibidor de CaMKII
Isoproterenol	10 μM	Agonista β -adrenérgico
DPI	10 μM	Inhibidor de la NADPH oxidasa
MPG	1 mM	Atrapante de ROS
2APB	25 μM	Bloqueante de los receptores IP ₃
A23128	1 μM	Ionóforo de cationes divalentes
W7	10 μM	Inhibidor de calmodulina

*El grupo de Hidaka en 1990^[144] diseñó y testeó una sulfonamida que generaba inhibición de la CaMKII en experiencias *in vitro* y en líneas celulares, el KN62. Un año después presentaron un derivado químico de la misma familia, la metoxibenzenosulfonamida o KN93. Este era un potente inhibidor de la kinasa en líneas celulares^[145]. Endifeentes trabajos se sugiere que el KN93 competiría por el sitio de unión a Ca²⁺-CaM en varias kinasas de la misma familia^[145, 146]. En el mismo trabajo proponen un analogo no activo como inhibidor, el KN92.

^φEl AIP es un péptido sintético que se une eficientemente al sitio autoinhibitorio, siendo un potente inhibidor, y muy específico, de la CaMKII que no compite por el sitio de unión para el KN93^[146].

La línea de ratones transgénicos AC3-I del grupo de Anderson^[116] expresa un péptido similar al AIP (nótese que solo varía una histidina en la quinta posición). Mientras que el péptido que expresa como control esta línea (AC3-C) de ratones es de una secuencia levemente diferente^[115, 116].

AIP: KKALRRQEAVDAL
AC3-C: KKALHAQERVDCL
AC3-I: KKALHRQEAVDAL

Referencias

REFERENCIAS

1. Kunapuli, S.P. and A. Kumar, *Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of its mRNA in rat heart*. *Circ Res*, 1987. **60**(5): p. 786-90.
2. Johnston, C.I., *Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control*. *J Hypertens Suppl*, 1992. **10**(7): p. S13-26.
3. Page, I.H. and O.M. Helmer, *Angiotonin-Activator, Renin- and Angiotonin-Inhibitor, and the Mechanism of Angiotonin Tachyphylaxis in Normal, Hypertensive, and Nephrectomized Animals*. *J Exp Med*, 1940. **71**(4): p. 495-519.
4. Page, I.H. and O.M. Helmer, *A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator*. *J Exp Med*, 1940. **71**(1): p. 29-42.
5. Braun-Menendez, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir, and J.M. Munoz, *The substance causing renal hypertension*. *J Physiol*, 1940. **98**(3): p. 283-98.
6. Page, I.H., *The Vasoconstrictor Action of Plasma from Hypertensive Patients and Dogs*. *J Exp Med*, 1940. **72**(3): p. 301-10.
7. Schwarz H, B.F., Page IH, *Synthesis of a biologically active octapeptide similar to natural isoleucine angiotonin octapeptide*. *J Am Chem Soc*, 1957: p. 5697-5703.
8. Yatabe, J., M. Yoneda, M.S. Yatabe, T. Watanabe, R.A. Felder, P.A. Jose, and H. Sanada, *Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor*. *Endocrinology*, 2011. **152**(4): p. 1582-8.
9. Ambroz, C., A.J. Clark, and K.J. Catt, *The mas oncogene enhances angiotensin-induced [Ca²⁺]_i responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1133**(1): p. 107-11.
10. Santos, R.A., M.J. Campagnole-Santos, and S.P. Andrade, *Angiotensin-(1-7): an update*. *Regul Pept*, 2000. **91**(1-3): p. 45-62.
11. Fernandes, L., Z.B. Fortes, D. Nigro, R.C. Tostes, R.A. Santos, and M.H. Catelli De Carvalho, *Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo*. *Hypertension*, 2001. **37**(2 Part 2): p. 703-9.
12. Paula, R.D., C.V. Lima, M.C. Khosla, and R.A. Santos, *Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats*. *Hypertension*, 1995. **26**(6 Pt 2): p. 1154-9.

13. Tom, B., R. de Vries, P.R. Saxena, and A.H. Danser, *Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade*. Hypertension, 2001. **38**(1): p. 95-9.
14. Ueda, S., S. Masumori-Maemoto, A. Wada, M. Ishii, K.B. Brosnihan, and S. Umemura, *Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man*. J Hypertens, 2001. **19**(11): p. 2001-9.
15. Dell'Italia, L.J., Q.C. Meng, E. Balcells, C.C. Wei, R. Palmer, G.R. Hageman, J. Durand, G.H. Hankes, and S. Oparil, *Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 253-8.
16. Whitebread S, M.M., Kember B, de Gasparo M., *Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II reseptor subtypes*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989. **163**: p. 286-291.
17. Nozawa Y, H.A., Oda N, Yamasaki Y, Matsuura N, Yamada S., Inabe K, Kimura R, Suzuki H, Hoshino T., *Angiotensin II reseptor subtypes in bovine and human ventricular myocardium*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1994. **270**: p. 566-571.
18. Scott, A.L., R.S. Chang, V.J. Lotti, and P.K. Siegl, *Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II reseptor antagonists, DUP 753 and PD 121981, in rabbit heart*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **261**(3): p. 931-5.
19. AbdAlla, S., H. Lothar, A.M. Abdel-tawab, and U. Quitterer, *The angiotensin II AT2 reseptor is an AT1 reseptor antagonist*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39721-6.
20. AbdAlla, S., H. Lothar, and U. Quitterer, *AT1-reseptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered reseptor sequestration*. Nature, 2000. **407**(6800): p. 94-8.
21. Lewin, B., *Genes VII*. 1° ed ed. Vol. 1. 2000, Oxford: Oxford University Press. 990.
22. Wu, X., T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T.A. McKinsey, J.R. Dedman, E.N. Olson, J. Chen, J.H. Brown, and D.M. Bers, *Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 675-82.
23. Mignery, G.A., T.C. Sudhof, K. Takei, and P. De Camilli, *Putative reseptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine reseptor*. Nature, 1989. **342**(6246): p. 192-5.
24. Alexander, R.W., T.A. Brock, M.A. Gimbrone, Jr., and S.E. Rittenhouse, *Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle*. Hypertension, 1985. **7**(3 Pt 1): p. 447-51.
25. Dorn, G.W., 2nd and T. Force, *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 527-37.
26. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
27. Wang, Q.J., *PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(6): p. 317-23.

28. Kobayashi, M., Y. Furukawa, and S. Chiba, *Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart*. Eur J Pharmacol, 1978. **50**(1): p. 17-25.
29. Mori, T. and A. Hashimoto, *Direct positive chronotropic action by angiotensin II in the isolated mouse atrium*. Life Sci, 2006. **79**(7): p. 637-40.
30. Kajstura, J., E. Cigola, A. Malhotra, P. Li, W. Cheng, L.G. Meggs, and P. Anversa, *Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(3): p. 859-70.
31. Kass, R.S. and M.L. Blair, *Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers*. J Mol Cell Cardiol, 1981. **13**(9): p. 797-809.
32. Ardaillou, R., *Angiotensin II receptors*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10 Suppl 11**: p. S30-9.
33. Rao, G.N., B. Lassegue, R.W. Alexander, and K.K. Griendling, *Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells*. Biochem J, 1994. **299 (Pt 1)**: p. 197-201.
34. Fabiato, A. and F. Fabiato, *Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles*. Ann N Y Acad Sci, 1978. **307**: p. 491-522.
35. Tada, M., M.A. Kirchberger, and A.M. Katz, *Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1975. **250**(7): p. 2640-7.
36. Tada, M., M.A. Kirchberger, D.I. Repke, and A.M. Katz, *The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1974. **249**(19): p. 6174-80.
37. Mundina-Weilenmann, C., L. Vittone, M. Ortale, G.C. de Cingolani, and A. Mattiazzi, *Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33561-7.
38. Moravec, C.S., M.D. Schluchter, L. Paranandi, B. Czerska, R.W. Stewart, E. Rosenkranz, and M. Bond, *Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro*. Circulation, 1990. **82**(6): p. 1973-84.
39. Vila Petroff, M.G., E.A. Aiello, J. Palomeque, M.A. Salas, and A. Mattiazzi, *Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 189-203.
40. Palomeque, J., L. Sapia, R.J. Hajjar, A. Mattiazzi, and M. Vila Petroff, *Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H96-106.
41. Lefroy, D.C., T. Crake, F. Del Monte, G. Vescovo, L. Dalla Libera, S. Harding, and P.A. Poole-Wilson, *Angiotensin II and contraction of isolated myocytes from human, guinea pig, and infarcted rat hearts*. Am J Physiol, 1996. **270**(6 Pt 2): p. H2060-9.

42. Allen, I.S., N.M. Cohen, R.S. Dhallan, S.T. Gaa, W.J. Lederer, and T.B. Rogers, *Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into the underlying biochemical mechanisms*. *Circ Res*, 1988. **62**(3): p. 524-34.
43. Ichiyanagi, O., K. Ishii, and M. Endoh, *Angiotensin II increases L-type Ca²⁺ current in gramicidin D-perforated adult rabbit ventricular myocytes: comparison with conventional patch-clamp method*. *Pflugers Arch*, 2002. **444**(1-2): p. 107-16.
44. Perez, N.G., M.C. Villa-Abrille, E.A. Aiello, R.A. Dulce, H.E. Cingolani, and M.C. Camilion de Hurtado, *A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchange by endothelin release*. *Cardiovasc Res*, 2003. **60**(3): p. 589-97.
45. Iwamoto, T., Y. Pan, S. Wakabayashi, T. Imagawa, H.I. Yamanaka, and M. Shigekawa, *Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger via protein kinase C*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(23): p. 13609-15.
46. Aiello, E.A. and H.E. Cingolani, *Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca⁽²⁺⁾ current by a Ca⁽²⁺⁾- and protein kinase C-dependent mechanism*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(4): p. H1528-36.
47. Salas, M.A., M.G. Vila-Petroff, J. Palomeque, E.A. Aiello, and A. Mattiazzi, *Positive inotropic and negative lusitropic effect of angiotensin II: intracellular mechanisms and second messengers*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(11): p. 1957-71.
48. Habuchi, Y., L.L. Lu, J. Morikawa, and M. Yoshimura, *Angiotensin II inhibition of L-type Ca²⁺ current in sinoatrial node cells of rabbits*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(3 Pt 2): p. H1053-60.
49. Liao, P., S.Q. Wang, S. Wang, M. Zheng, M. Zheng, S.J. Zhang, H. Cheng, Y. Wang, and R.P. Xiao, *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2002. **90**(2): p. 190-6.
50. Chen, Y., R. Rajashree, Q. Liu, and P. Hofmann, *Acute p38 MAPK activation decreases force development in ventricular myocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(6): p. H2578-86.
51. Cingolani, H.E., N.G. Perez, E.A. Aiello, I.L. Ennis, C.D. Garcarena, M.C. Villa-Abrille, R.A. Dulce, C.I. Caldiz, A.M. Yeves, M.V. Correa, M.B. Nolly, and G. Chiappe de Cingolani, *Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 7096-114.
52. Mudd, J.O. and D.A. Kass, *Tackling heart failure in the twenty-first century*. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 919-28.
53. Palomeque, J., L. Delbridge, and M.V. Petroff, *Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival*. *Front Biosci*, 2009. **14**: p. 5118-33.
54. Chen, Q.M. and V.C. Tu, *Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications*. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2002. **2**(1): p. 43-57.
55. Anversa, P., A. Leri, C.A. Beltrami, S. Guerra, and J. Kajstura, *Myocyte death and growth in the failing heart*. *Lab Invest*, 1998. **78**(7): p. 767-86.

56. Anversa, P., J. Kajstura, and G. Olivetti, *Myocyte death in heart failure*. *Curr Opin Cardiol*, 1996. **11**(3): p. 245-51.
57. Yamada, T., M. Horiuchi, and V.J. Dzau, *Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(1): p. 156-60.
58. Heidkamp, M.C., A.L. Bayer, J.L. Martin, and A.M. Samarel, *Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C epsilon and delta in neonatal rat ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2001. **89**(10): p. 882-90.
59. Zhu, W., A.Y. Woo, D. Yang, H. Cheng, M.T. Crow, and R.P. Xiao, *Activation of CaMKII δ is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(14): p. 10833-9.
60. Kita, T., M. Ogawa, H. Sato, K. Kasai, T. Tanaka, and N. Tanaka, *Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway on heart failure in the infant rat after burn injury*. *Int J Exp Pathol*, 2008. **89**(1): p. 55-63.
61. Schulman, H. and P. Greengard, *Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator"*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(11): p. 5432-6.
62. Braun, A.P. and H. Schulman, *The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 417-45.
63. Mishra, S., C.B. Gray, S. Miyamoto, D.M. Bers, and J.H. Brown, *Location Matters: Clarifying the Concept of Nuclear and Cytosolic CaMKII Subtypes*. *Circ Res*, 2011.
64. Schworer, C.M., R.J. Colbran, and T.R. Soderling, *Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(19): p. 8581-4.
65. Erickson, J.R., M.L. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C.V. Oddis, R.K. Bartlett, J.S. Lowe, S.E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M.C. Zimmerman, K. Zimmerman, A.J. Ham, R.M. Weiss, D.R. Spitz, M.A. Shea, R.J. Colbran, P.J. Mohler, and M.E. Anderson, *A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation*. *Cell*, 2008. **133**(3): p. 462-74.
66. Couchonnal, L.F. and M.E. Anderson, *The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease*. *Physiology (Bethesda)*, 2008. **23**: p. 151-9.
67. Griffith, L.C., *Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions*. *J Neurosci*, 2004. **24**(39): p. 8394-8.
68. Waxham, M.N. and J. Aronowski, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is phosphorylated by protein kinase C in vitro*. *Biochemistry*, 1993. **32**(11): p. 2923-30.
69. Wright, S.C., U. Schellenberger, L. Ji, H. Wang, and J.W. Larrick, *Calmodulin-dependent protein kinase II mediates signal transduction in apoptosis*. *Faseb J*, 1997. **11**(11): p. 843-9.
70. Backs, J., T. Backs, S. Neef, M.M. Kreuzer, L.H. Lehmann, D.M. Patrick, C.E. Grueter, X. Qi, J.A. Richardson, J.A. Hill, H.A. Katus, R. Bassel-Duby, L.S. Maier, and E.N. Olson, *The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac*

- hypertrophy and remodeling after pressure overload*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2342-7.
71. Zhang, R., M.S. Khoo, Y. Wu, Y. Yang, C.E. Grueter, G. Ni, E.E. Price, Jr., W. Thiel, S. Guatimosim, L.S. Song, E.C. Madu, A.N. Shah, T.A. Vishnivetskaya, J.B. Atkinson, V.V. Gurevich, G. Salama, W.J. Lederer, R.J. Colbran, and M.E. Anderson, *Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease*. Nat Med, 2005. **11**(4): p. 409-17.
 72. Lindemann, J.P. and A.M. Watanabe, *Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms*. J Biol Chem, 1985. **260**(7): p. 4516-25.
 73. Cazorla, O., A. Lucas, F. Poirier, A. Lacampagne, and F. Lezoualc'h, *The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 14144-9.
 74. Ferrero, P., M. Said, G. Sanchez, L. Vittone, C. Valverde, P. Donoso, A. Mattiazzi, and C. Mundina-Weilenmann, *Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(3): p. 281-91.
 75. Simmerman, H.K., J.H. Collins, J.L. Theibert, A.D. Wegener, and L.R. Jones, *Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains*. J Biol Chem, 1986. **261**(28): p. 13333-41.
 76. Anderson, M.E., A.P. Braun, H. Schulman, and B.A. Premack, *Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes*. Circ Res, 1994. **75**(5): p. 854-61.
 77. Wehrens, X.H., S.E. Lehnart, S.R. Reiken, and A.R. Marks, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor*. Circ Res, 2004. **94**(6): p. e61-70.
 78. Hudmon, A., H. Schulman, J. Kim, J.M. Maltez, R.W. Tsien, and G.S. Pitt, *CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation*. J Cell Biol, 2005. **171**(3): p. 537-47.
 79. Wagner, S. and L.S. Maier, *Modulation of cardiac Na(+) and Ca(2+) currents by CaM and CaMKII*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006. **17 Suppl 1**: p. S26-S33.
 80. Wagner, S., E. Hacker, E. Grandi, S.L. Weber, N. Dybkova, S. Sossalla, T. Sowa, L. Fabritz, P. Kirchhof, D.M. Bers, and L.S. Maier, *Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009. **2**(3): p. 285-94.
 81. Maier, L.S., *Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the heart*. Adv Exp Med Biol, 2012. **740**: p. 685-702.
 82. Pogwizd, S.M., K. Schlotthauer, L. Li, W. Yuan, and D.M. Bers, *Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. 1159-67.

83. Kleinbongard, P., G. Heusch, and R. Schulz, *TNF α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure*. *Pharmacol Ther.* **127**(3): p. 295-314.
84. van den Oever, I.A., H.G. Raterman, M.T. Nurmohamed, and S. Simsek, *Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus*. *Mediators Inflamm.* **2010**: p. 792393.
85. Brookes, P.S., Y. Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, and S.S. Sheu, *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(4): p. C817-33.
86. Uchida, Y., *Molecular mechanisms of regeneration in Alzheimer's disease brain*. *Geriatr Gerontol Int.* **10 Suppl 1**: p. S158-68.
87. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
88. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. *Int Rev Cytol*, 1980. **68**: p. 251-306.
89. Gremm, S., *Genetic of apoptosis*, ed. M.R. BIOS Scientific Publishers Ltd 9 Newtec Place, OX4 1RE, UK. Vol. 1. 2003, Oxford Taylor & Francis e-Library. 331.
90. Bishopric, N.H., P. Andreka, T. Slepak, and K.A. Webster, *Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte*. *Curr Opin Pharmacol*, 2001. **1**(2): p. 141-50.
91. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
92. Baines, C.P. and J.D. Molkenin, *STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis*. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. **38**(1): p. 47-62.
93. Vila-Petroff, M., M.A. Salas, M. Said, C.A. Valverde, L. Sapia, E. Portiansky, R.J. Hajjar, E.G. Kranias, C. Mundina-Weilenmann, and A. Mattiazzi, *CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(4): p. 689-98.
94. Webster, K.A., D.J. Discher, O.M. Hernandez, K. Yamashita, and N.H. Bishopric, *A glycolytic pathway to apoptosis of hypoxic cardiac myocytes. Molecular pathways of increased acid production*. *Adv Exp Med Biol*, 2000. **475**: p. 161-75.
95. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. *Biochem J*, 1999. **341 (Pt 2)**: p. 233-49.
96. Zamzami, N. and G. Kroemer, *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(1): p. 67-71.
97. Adrain, C. and S.J. Martin, *The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas*. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(6): p. 390-7.
98. Verhagen, A.M. and D.L. Vaux, *Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac*. *Apoptosis*, 2002. **7**(2): p. 163-6.
99. Bahi, N., J. Zhang, M. Llovera, M. Ballester, J.X. Comella, and D. Sanchis, *Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development*:

- essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes.* J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22943-52.
100. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 437-44.
 101. Cheng, E.H., M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis.* Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
 102. Ueda, H. and R. Fujita, *Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain.* Biol Pharm Bull, 2004. **27**(7): p. 950-5.
 103. Fleury, C., B. Mignotte, and J.L. Vayssiere, *Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling.* Biochimie, 2002. **84**(2-3): p. 131-41.
 104. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis.* Biochem J, 1997. **326** (Pt 1): p. 1-16.
 105. Clerk, A., S.M. Cole, T.E. Cullingford, J.G. Harrison, M. Jormakka, and D.M. Valks, *Regulation of cardiac myocyte cell death.* Pharmacol Ther, 2003. **97**(3): p. 223-61.
 106. Kirkegaard, T. and M. Jaattela, *Lysosomal involvement in cell death and cancer.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(4): p. 746-54.
 107. Schneider, D., E. Gerhardt, J. Bock, M.M. Muller, H. Wolburg, F. Lang, and J.B. Schulz, *Intracellular acidification by inhibition of the Na⁺/H⁺-exchanger leads to caspase-independent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis.* Cell Death Differ, 2004. **11**(7): p. 760-70.
 108. Torgerson, R.R. and M.A. McNiven, *The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing.* J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 19): p. 2911-22.
 109. Sebbagh, M., C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio, and J. Breard, *Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 346-52.
 110. Coleman, M.L., E.A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar, and M.F. Olson, *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 339-45.
 111. Counis, M.F. and A. Torriglia, *Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases.* Biochimie, 2006. **88**(12): p. 1851-8.
 112. Lieberman, J. and Z. Fan, *Nuclear war: the granzyme A-bomb.* Curr Opin Immunol, 2003. **15**(5): p. 553-9.
 113. Torriglia, A., C. Lepretre, L. Padron-Barthe, S. Chahory, and E. Martin, *Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis.* Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1490-502.
 114. Javois, L.C., *Methods in Molecular Biology.* Vol. 115. 1999: Springerlink.
 115. Khoo, M.S., P.J. Kannankeril, J. Li, R. Zhang, S. Kupersmidt, W. Zhang, J.B. Atkinson, R.J. Colbran, D.M. Roden, and M.E. Anderson, *Calmodulin kinase II activity*

- is required for normal atrioventricular nodal conduction.* Heart Rhythm, 2005. **2**(6): p. 634-40.
116. Wu, Y., L.B. MacMillan, R.B. McNeill, R.J. Colbran, and M.E. Anderson, *CaM kinase augments cardiac L-type Ca²⁺ current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias.* Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H2168-78.
 117. Bkaily, G., N. Sperelakis, and J. Doane, *A new method for preparation of isolated single adult myocytes.* Am J Physiol, 1984. **247**(6 Pt 2): p. H1018-26.
 118. Sollott, S.J., B.D. Ziman, and E.G. Lakatta, *Novel technique to load indo-1 free acid into single adult cardiac myocytes to assess cytosolic Ca²⁺.* Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 2): p. H1941-9.
 119. Haugland, R.P., *Molecular Probes: Handbook of fluorescent probes and research chemicals.* 5^a ed, ed. edition. Vol. 1. 1994, Orlando, Florida: Molecular Probes. 421.
 120. Kubista, M., B. Akerman, and B. Norden,, *Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy.* Biochemistry, 1987. **26**(14): p. 4545-53.
 121. Hirata, H., A. Takahashi, S. Kobayashi, S. Yonehara, H. Sawai, T. Okazaki, K. Yamamoto, and M. Sasada, *Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis.* J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 587-600.
 122. Sapia, L., J. Palomeque, A. Mattiazzi, and M.V. Petroff, *Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(3): p. 459-68.
 123. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
 124. Porzio, M.A. and A.M. Pearson, *Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.* Biochim Biophys Acta, 1977. **490**(1): p. 27-34.
 125. Seshiah, P.N., D.S. Weber, P. Rocic, L. Valppu, Y. Taniyama, and K.K. Griendling, *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators.* Circ Res, 2002. **91**(5): p. 406-13.
 126. Palomeque J, Valverde A.C., Salas MA, Mattiazzi A, *CaMKII Activation is Involved in Angiotensin II-Mediated Cell Death.* Circulation, 2007. **116**: p. II_114-II_115.
 127. Erickson, J.R., R. Patel, A. Ferguson, J. Bossuyt, and D.M. Bers, *Fluorescence resonance energy transfer-based sensor Camui provides new insight into mechanisms of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation in intact cardiomyocytes.* Circ Res, 2011. **109**(7): p. 729-38.
 128. Missiaen, L., G. Callewaert, H. De Smedt, and J.B. Parys, *2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells.* Cell Calcium, 2001. **29**(2): p. 111-6.

129. Chin, D. and A.R. Means, *Methionine to glutamine substitutions in the C-terminal domain of calmodulin impair the activation of three protein kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30465-71.
130. Hoshi, T. and S. Heinemann, *Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction*. J Physiol, 2001. **531**(Pt 1): p. 1-11.
131. Robison, A.J., D.G. Winder, R.J. Colbran, and R.K. Bartlett, *Oxidation of calmodulin alters activation and regulation of CaMKII*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(1): p. 97-101.
132. Su, Q., J. Chen, and Q. Fang, *Modulation of the p38MAPK pathway in failing human myocardium secondary to rheumatic heart disease*. J Heart Valve Dis, 2007. **16**(6): p. 683-9.
133. De Angelis, N., F. Fiordaliso, R. Latini, L. Calvillo, M. Funicello, M. Gobbi, T. Mennini, and S. Masson, *Appraisal of the role of angiotensin II and aldosterone in ventricular myocyte apoptosis in adult normotensive rat*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(12): p. 1655-65.
134. Domenighetti, A.A., Q. Wang, M. Egger, S.M. Richards, T. Pedrazzini, and L.M. Delbridge, *Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure*. Hypertension, 2005. **46**(2): p. 426-32.
135. Vivar, R., C. Soto, M. Copaja, F. Mateluna, P. Aranguiz, J.P. Munoz, M. Chiong, L. Garcia, A. Letelier, W.G. Thomas, S. Lavandero, and G. Diaz-Araya, *Phospholipase C/protein kinase C pathway mediates angiotensin II-dependent apoptosis in neonatal rat cardiac fibroblasts expressing AT1 receptor*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **52**(2): p. 184-90.
136. Sorescu, D. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure*. Congest Heart Fail, 2002. **8**(3): p. 132-40.
137. Palomeque J, V.C., Salas MA, Mattiazzi A. , *CaMKII activation is involved in angiotensin II-mediated cell death*. Circulation, 2007. **116**((suppl II)): p. II-114–II-115.
138. Howe, C.J., M.M. Lahair, J.A. McCubrey, and R.A. Franklin, *Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44573-81.
139. Geiser, J.R., D. van Tuinen, S.E. Brockerhoff, M.M. Neff, and T.N. Davis, *Can calmodulin function without binding calcium?* Cell, 1991. **65**(6): p. 949-59.
140. Ishida, A., Y. Shigeri, T. Taniguchi, and I. Kameshita, *Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology*. Pharmacol Ther, 2003. **100**(3): p. 291-305.
141. Takeda, K., A. Matsuzawa, H. Nishitoh, K. Tobiume, S. Kishida, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and H. Ichijo, *Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation*. EMBO Rep, 2004. **5**(2): p. 161-6.

142. Nguyen, A., P. Chen, and H. Cai, *Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells*. FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 307-13.
143. Gardner, O.S., C.W. Shiau, C.S. Chen, and L.M. Graves, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 10109-18.
144. Hidaka, H., M. Hagiwara, and H. Tokumitsu, *Novel and selective inhibitors of CaM-kinase II and other calmodulin-dependent enzymes*. Adv Exp Med Biol, 1990. **269**: p. 159-62.
145. Marley, P.D. and K.A. Thomson, *The Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors KN62 and KN93, and their inactive analogues KN04 and KN92, inhibit nicotinic activation of tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(1): p. 15-8.
146. Ishida, A., I. Kameshita, S. Okuno, T. Kitani, and H. Fujisawa, *A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(3): p. 806-12.