

**Universidad Nacional de La Plata**

**Facultad de Ciencias Médicas**



**MECANISMOS SUBCELULARES INVOLUCRADOS EN LA  
APOPTOSIS INDUCIDA POR TAQUICARDIA CRÓNICA: ROL DE  
p38MAPK Y CaMKII.**

**Tesis Doctoral**

***Sepúlveda Marisa Noemí***



**C I C**

**DR. HORACIO E. CINGOLANI**

**CONICET • UNLP**

**2015**

**Director: Dr. Martín Vila Petroff**

Prof. Adjunto de la Cátedra de Fisiología y Física Biológica

Investigador Independiente del CONICET

Director del Centro de Investigaciones Cardiovasculares

Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

**Codirector: Dr. Carlos Valverde**

Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Fisiología y Física Biológica

Investigador Asistente del CONICET

Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

Al amor de mi vida

# AGRADECIMIENTOS

Leer esto significa que la tesis por fin “ha terminado”, y este es el momento de agradecer a todas las personas que han participado activamente en la elaboración de esta tesis doctoral. Son muchas las personas que a lo largo de estos años de Doctorado han estado a mi lado animándome y dándome ilusiones para poder terminarla, y espero poder reflejar a toda esa gente mi más sincero agradecimiento por todo ello.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director Dr. Martín Vila Petroff por la oportunidad que me brindó al ofrecerme la posibilidad de realizar esta Tesis doctoral en su laboratorio. Del mismo modo, quisiera agradecer a mi codirector Dr. Carlos Valverde poniendo a mi disposición toda su experiencia y todos sus recursos. Y a todos los miembros del Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC)... que son muchos y que me han ayudado en lo que han podido, en especial a la Dra. Alicia Matiazzi por aceptar mi entrada al CIC he incorporarme al mundo de la investigación cuando sólo era una estudiante, la Dra. Cecilia Mundiña, Dra. Matilde Said y Dra. Leticia, por aceptarme en sus laboratorios.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas con las que he compartido estos años en el CIC y de alguna manera me transmitieron sus conocimientos, ya sean técnicos como intelectuales. Quisiera agradecer a las “chiquis” por su trato, apoyo y los buenos ratos pasados en estos años y por supuesto a Mónica Rando por haberme aguantado día tras día trasladando sus conocimientos y que sin querer esta relación se volvió en una amistad.

Gracias también a los integrantes de mi actual grupo de laboratorio: Malena, Luis y Juan Ignacio.

Bueno, casi estoy llegando al final, o al principio según se mire, gracias al amor de mi vida, Walter que siempre confió en que conseguiría lo que me propusiese.

Por último me gustaría dar las gracias por quererme y aguantarme estos años, a todos los miembros de mi familia.

A todas estas personas gracias.

# ÍNDICE

	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
	<b>Conceptos Generales</b>	3
1	<b>Muerte celular</b>	
	1.1 Apoptosis.	4
	1.2 Necrosis.	9
2	<b>p38MAPK</b>	11
	2.1 Estructura y función de p38MAPK.	12
	2.2 Localización celular y caracterización de p38MAPK.	
	2.3 Activación.	13
	2.4 Desactivación.	14
	2.5 Función de p38MAPK.	15
3	<b>CaMKII</b>	17
	3.1 Estructura y función.	
	3.2 Activación.	18
	3.3 Otras formas de activación.	19
	3.4 CaMKII en condiciones fisiológicas.	20
	3.5 CaMKII en condiciones patológicas.	22
4	<b>Vía de señalización de PI3K/AKT</b>	24
	4.1 Papel de PI3K en la supervivencia celular e inhibición de apoptosis.	25
	<b>HIPÓTESIS</b>	27
	<b>OBJETIVOS</b>	28
	Objetivos generales.	
	Objetivos específicos.	
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	29
1	Modelos biológicos.	
2	Corazón perfundido.	
	2.1 Protocolos experimentales en modelo de Langendorff.	
3	Preparación de tejidos.	31
4	Inmunodetección por Western blot.	32
5	Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos.	33
	5.1 Protocolos experimentales en cardiomiocitos aislados.	
6	Evaluación morfológica de la viabilidad celular.	37
7	Medidas de apoptosis y necrosis.	38
8	Infección con adenovirus.	39
	8.1 Verificación de expresión de proteínas recombinantes.	

9	Medidas de especies reactivas de oxígeno (ROS).	
10	Medidas de Ca <sup>2+</sup> citosólico.	40
11	Medidas de ondas de Ca <sup>2+</sup> .	42
12	Análisis estadístico.	43
	<b>RESULTADOS</b>	44
1	Viabilidad celular.	
2	Apoptosis.	45
3	Necrosis.	46
4	Actividad de CaMKII y p38MAPK.	47
5	Efecto de la inhibición de p38MAPK sobre la muerte celular inducida por MR.	48
6	Efecto de la inhibición de CaMKII sobre la muerte celular inducida por MR.	50
7	La sobreexpresión de CaMKII exagera la muerte celular por MR.	54
8	El MR aumenta el Ca <sup>2+</sup> y la producción de ROS intracelular.	56
9	Reducir la producción de ROS previene la muerte celular inducida por MR.	57
10	Mecanismos dependientes de CaMKII involucrados en la muerte celular por MR.	62
11	La producción de ROS inducida por MR depende de CaMKII.	66
12	Rol de la producción de ROS inducido por MR.	68
13	Mecanismos involucrados en la modulación de los RyR2 por MR.	69
14	Rol de la mitocondria en la muerte celular inducida por MR.	70
15	La inhibición de la señalización de PI3K/AKT exagera los efectos deletéreos del MR sobre la viabilidad celular de los cardiomiocitos.	72
	<b>DISCUSIÓN</b>	74
1	CaMKII media la muerte celular inducida por MR.	75
	Rol de la vía PI3K/AKT en la muerte celular inducida por MR.	80
	<b>CONCLUSIONES</b>	83
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	84

# RESUMEN

El presente trabajo de tesis realizado en un modelo celular de taquicardia crónica inducido por marcapaseo rápido (MR) tuvo como finalidad la comprobación de la hipótesis de que la taquicardia crónica a través del aumento sostenido del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular y la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) promuevan la activación de dos quinasas proapoptóticas, la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaMKII) y la proteína perteneciente a la familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), p38MAPK, que conducen a la activación de la cascada apoptótica.

Utilizando corazones enteros y cardiomiocitos de rata y ratón estimulados a baja (0,5Hz) y alta (5 y 8Hz) frecuencia en presencia y ausencia de diferentes compuestos farmacológicos, inhibidores específicos de las quinasas, demostramos que la muerte celular inducida por MR se asocia con el aumento de la activación de las quinasas, CaMKII y p38MAPK, sin embargo, solo la inhibición de CaMKII previno la muerte celular inducida por MR, concluyendo que p38MAPK no está involucrada en la muerte celular inducida por MR.

Midiendo  $\text{Ca}^{2+}$  y ROS mostramos además que el  $\text{Ca}^{2+}$ , y no así las ROS, es necesario para la activación de CaMKII durante el MR.

Por otra parte, utilizando estabilizadores del receptor de rianodina (RyR2) e inhibidores de la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) demostramos que la activación de CaMKII inducida por MR conduce a un aumento en la probabilidad de apertura de los RyR2 que resulta en la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplasmático (RS) y la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial con la consecuente apertura del mPTP y la liberación de factores que inician la cascada apoptótica.

Otro hallazgo importante y hasta ahora sin precedentes de este trabajo de tesis es que la activación de CaMKII durante el MR activa a la NADPH oxidasa resultando en un aumento en la producción de ROS intracelular.

Estos ROS oxidarían a los RyR2 aumentando así su probabilidad de apertura.

Finalmente, demostramos que la activación de la vía PI3K/AKT juega un papel protector al reducir la muerte celular inducida por MR. Los resultados obtenidos no solo aportan evidencias del rol crítico de la CaMKII en la muerte celular inducida por MR sino que además indican que su blanco de acción sería el RyR2. Se propone que la estabilización de los RyR2 podría resultar en una novedosa estrategia terapéutica para el tratamiento del remodelado adverso asociado con la taquicardia crónica.

# INTRODUCCIÓN

La Taquicardia ventricular crónica induce una serie de alteraciones patológicas que incluyen, depresión de la contractilidad, hipertrofia, fibrosis, inflamación y apoptosis. Estas alteraciones conducen a un remodelamiento cardíaco que culmina con el desarrollo de insuficiencia cardíaca congestiva (IC) (Spinale y col., 1994; Valente y col., 1998; Nakamura y col., 2002).

Actualmente es reconocido que la pérdida de cardiomiocitos producida por apoptosis es uno de los mecanismos que determinan la progresión hacia la IC (Valente y col., 1998; Kuramochi y col., 2006) y el deterioro de la función contráctil. Sin embargo, hasta el presente no han sido dilucidados los mecanismos subcelulares que determinan la elevada incidencia de apoptosis en la Taquicardia crónica.

Estudios recientes sugieren que la taquicardia crónica conduce a un aumento de los niveles intracelulares de al menos dos segundos mensajeros, potencialmente proapoptóticos,  $Ca^{2+}$  y especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la activación de diversas proteínas proapoptóticas como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), p38MAPK y la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) (Palomeque y col., 2004; Heinzl y col., 2006; Kuramochi y col., 2006). Sin embargo, aún no ha sido examinado si estas señales participan en la muerte celular inducida por taquicardia crónica.

Por otro lado, en modelos celulares de taquicardia inducida por marcapaseo rápido (MR), se ha demostrado que se activa una vía de supervivencia que involucra la cascada de la PI3K/AKT (Kuramochi y col., 2006). En este trabajo de tesis se investigó las vías de señalización y los mecanismos subcelulares involucrados en la muerte celular inducida por taquicardia crónica y se prestó especial atención al rol que cumplen el  $Ca^{2+}$ , ROS, CaMKII y p38MAPK así como la vía PI3K/AKT.

A continuación se expondrán los conceptos generales que dan sustento a la hipótesis formulada y a los objetivos propuestos en esta tesis.

# CONCEPTOS GENERALES

## 1. MUERTE CELULAR

La evolución ha dotado a los organismos pluricelulares de complejos y precisos mecanismos de control que permiten la regulación de procesos tan importantes como proliferación, diferenciación y muerte celular, gracias a los cuales los seres vivos pueden mantener el equilibrio celular interno del organismo u homeostasis de los tejidos. Durante el proceso evolutivo se han desarrollado mecanismos para la eliminación de células anormales, peligrosas u originadas en exceso, para evitar el efecto perjudicial que éstas pudieran producir en el resto del individuo. Estos mecanismos participan en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, morfogénesis, remodelación tisular o respuesta inmune.

La idea de la existencia de un proceso de muerte celular de origen fisiológico o patológico fue desarrollada hace más de 170 años por Vogt (1842). Sin embargo, hubo que esperar muchos años para la aparición del término “muerte celular programada”, originado por Lockshin (1964), que hacía referencia a la muerte sufrida por ciertas células del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Estos investigadores observaron que algunas células de éste gusano estaban programadas para morir.

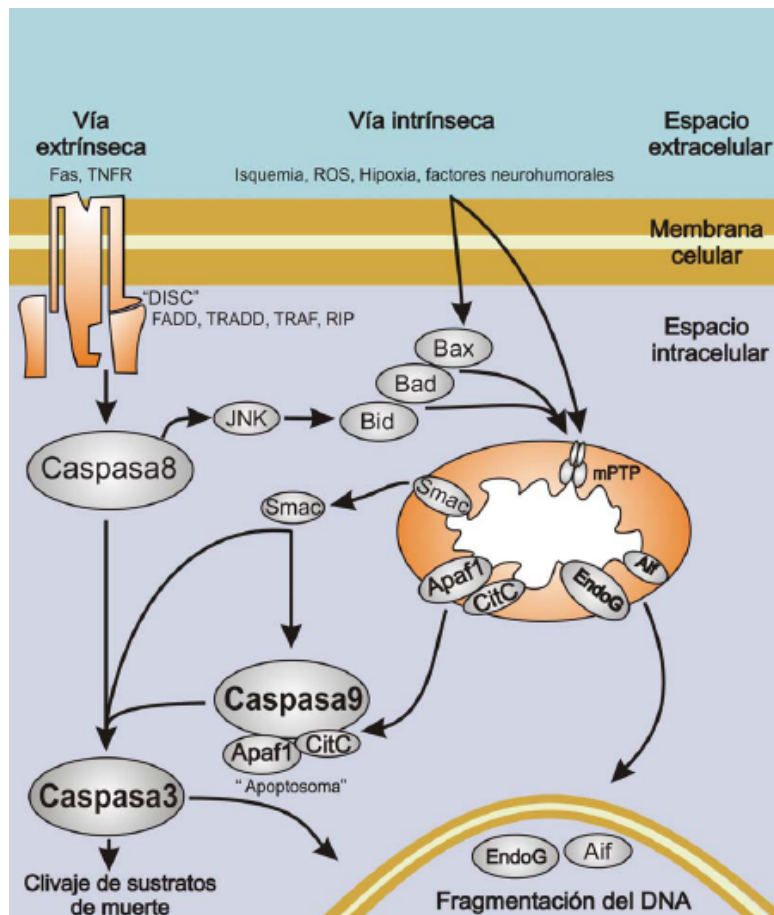
Conjuntamente con la inducción de muerte celular, existe un gran número de mecanismos que tratan de rescatar a la célula, reparando o eliminando complejos moleculares y hasta organelas defectuosas enteras, por autofagia. En caso de no poder solventar el daño, la célula entra en una vía de muerte donde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

A continuación se describirán los dos grandes mecanismos de muerte celular, apoptosis y necrosis, ya que las diferencias que exhiben estos dos mecanismos de muerte celular son bastante claras.



## 1.1 APOPTOSIS

Al igual que ha sucedido en otros campos de la medicina, en los últimos años la apoptosis ha sido implicada de manera progresiva en la patogenia de numerosas enfermedades cardiovasculares. La apoptosis es una muerte celular programada provocada por la misma célula, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento. La apoptosis se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmáticas con fragmentación nuclear (cariorrhexis) desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. La apoptosis tiene una función muy importante en los organismos, pues hace posible la autodestrucción de las células dañadas sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. Se pueden diferenciar dos grandes vías apoptóticas, 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 (Bishopric y col., 2001). Cada una de ellas posee una cascada de señalización propia aunque pueden entrecruzarse entre sí a lo largo de sus respectivos segundos mensajeros (Figura 1). 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 1:** 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 Caspasa3 y endonucleasas, que median el clivaje de elementos funcionales de la célula.

La vía apoptótica extrínseca o **Tipo I** (Figura 1) es un sistema mediado por receptor, que 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 (Ashkenazi y col., 1998), formando el complejo de señalización inductor de muerte o DISC (Baines y col., 2005). La formación de este complejo recluta al *iniciador* de la vía de las caspasas en la vía extrínseca, la Caspasa8. Posteriormente, la Caspasa8, se activa por autoproteólisis, 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 miembros de la familia del factor nuclear potenciador de

cadena liviana kappa de células B activadas (NF- $\kappa$ B) y las quinasas 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 antiapoptóticas. 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 aumenta la respuesta inflamatoria del mismo (Baines y col., 2005).

La vía apoptótica intrínseca o **Tipo II** es mediada por las mitocondrias. Hasta casi el final del siglo XX, se consideraba que la función exclusiva de las mitocondrias, era proveer energía a la célula, maximizando la producción de la misma a través de la fosforilación oxidativa. Alrededor de 1995 se entendió que las mitocondrias tenían una segunda función crucial: el control de la muerte celular. En la actualidad dicho concepto se acepta y está sustentado por múltiples evidencias experimentales.

La vía intrínseca es la preponderante en cardiomiocitos y es iniciada por estímulos como la isquemia y reperfusión (Vila Petroff y col., 2007), hipoxia (Webster y col., 2000) y estrés oxidativo (Zhu y col., 2007). Los estímulos proapoptóticos estimulan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), provocando la pérdida de potencial entre las membranas, junto con el extravasado de factores intramitocondriales hacia el citosol (Crompton y col., 1999). 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 (Crompton y col., 1999; Zamzami y col., 2001). 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 (AIF), entre otros. El CitC liberado se une con la proteína citoplasmática cofactor-1 apoptótico activador de proteasa (Apaf1) y reclutan a Caspasa9, induciendo su activación; complejo denominado Apoptosoma (Bishopric y col., 2001; Adrain y col., 2001). El Apoptosoma induce la activación de Caspasa3, el efector final de la vía de las caspasas. El complejo Smac/DIABLO facilita esta activación de caspasas (Verhagen y col., 2002) 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 ADN (Bahi y col., 2006). Por su parte, 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.

La familia MAPKs cumple un rol importante en la regulación de apoptosis mediada por las mitocondrias. En esta familia se incluyen las proteínas quinasas de regulación extracelular ERK, JNK y de nuestro interés p38 MAPK, entre otras. Se ha demostrado que la señalización de p38MAPK promueve la muerte celular (Sarkar y col., 2002; Porras y col., 2004) y su actividad aumenta en un modelo de marcapaseo rápido (Kuramochi y col., 2006). Algunas de las MAPKs interaccionan con miembros de la familia de proteínas Bcl2 en los eventos apoptóticos mediados por mitocondrias. Como inductores de la apoptosis, las MAPKs pueden inducir la activación de Bax mediada por JNK, y como respuesta antiapoptótica ERK puede activar AKT quien inhibe a Bad y estimula ARC (dominio de reclutamiento de caspasas) e IAPs (péptido inhibidor de apoptosis) (Bishopric y col., 2001).

Otra molécula involucrada en la muerte celular bajo condiciones patológicas, es la activación crónica de CaMKII que juega un rol proapoptótico (Zhang y col., 2004). De hecho, se ha demostrado que la activación de CaMKII hace de intermediario común para diversos estímulos proapoptóticos induciendo apoptosis en células cardíacas (Zhu y col., 2007).

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 ADNasas ácidas, 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 (Kirkegaard y col., 2009; Schneider y col., 2004).

Con la activación de 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 (Torgerson y col., 1998), esto genera un fenotipo propio del evento apoptótico que representa la formación de vesículas con el contenido intracelular parcialmente digerido.

En el sistema cardiovascular la apoptosis puede ser parte del proceso de renovación, pero por defecto de mitosis o exceso de muerte celular, puede constituir un proceso

patológico (Mallat y col., 1996; Colucci y col., 1996).

En el ventrículo derecho ocurre una remodelación fisiológica luego del nacimiento cuando ya no tiene que cumplir con la función hemodinámica intrauterina (Colucci y col., 1996). Una cantidad importante de células de ese ventrículo mueren de manera programada después del nacimiento. Esto suele durar apenas unos días, pero en ciertas condiciones se prolonga indefinidamente y ocurre la denominada miocardiopatía de Uhl, caracterizada por una dilatación extrema del ventrículo derecho con la consecutiva insuficiencia ventricular derecha (McKenna y col., 1994; Narula y col., 1996).

Otra enfermedad relacionada con la enfermedad de Uhl, en la que también se ha demostrado apoptosis, es la displasia arritmogénica del ventrículo derecho (McKenna y col., 1994; Mallat y col., 1996), en la que la infiltración fibrótica que sustituye al cardiomiocito apoptótico, crea el sustrato para arritmias potencialmente letales (Mallat y col., 1996).

Por otro lado, se ha visto que constantemente ocurre apoptosis miocárdica tanto en órganos diana de ratas hipertensas (Hamet y col., 1995) como durante la remodelación cardíaca que ocurre en el tejido aparentemente sano después de un infarto del miocardio (Kajstura y col., 1996).

Por otra parte, se ha demostrado que en la taquicardia crónica se activa la cascada apoptótica (Kuramochi y col., 2006) y que esta alteración junto a otras conducen a un remodelamiento cardíaco que culmina con el desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva (IC) (Spinale y col., 1994; Valente y col., 1998; Nakamura y col., 2002).

Existen múltiples factores que durante la taquicardia crónica pueden promover la apoptosis (Colucci y col., 1997), entre ellos, en un modelo de marcapaseo rápido (MR) se observó un aumento en los niveles intracelulares de al menos dos segundos mensajeros potencialmente proapoptóticos, especies reactivas de oxígeno (ROS) y  $Ca^{2+}$  (Palomeque y col., 2004; Heinzl y col., 2006), Sin embargo, aún no se ha determinado si estas señales median la muerte celular inducida por MR.

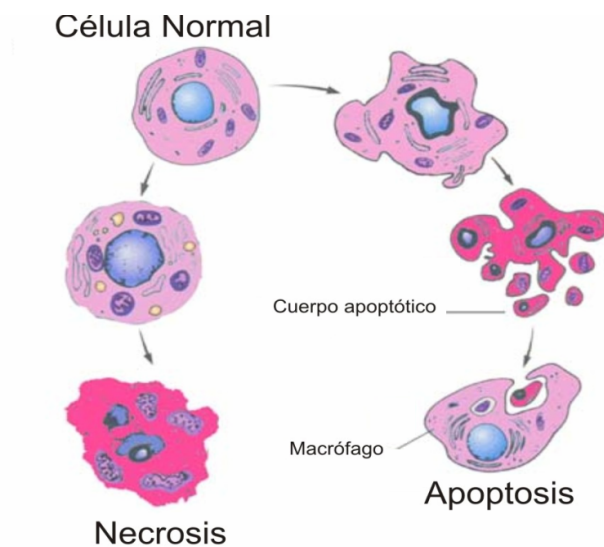
En resumen, la apoptosis es un proceso complejo y con muchos mecanismos de activación y contrarregulación, las intervenciones que se realicen para su modulación pueden estar sometidas a múltiples efectos colaterales o secundarios que las pueden hacer menos efectivas. Por ello, sólo una investigación sistemática de los mecanismos de modulación de la apoptosis permitirá definir las posibilidades reales de intervención terapéutica en las enfermedades cardiovasculares (Hajjar y col., 2000; Fernández-Solá y col., 1999).

La ejecución del presente proyecto nos permitirá determinar el papel, significado y vías de señalización involucradas en la apoptosis inducida por taquicardia crónica así como

establecer moléculas blanco para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas destinadas a prevenir el deterioro de la función contráctil asociada a patologías como la taquicardia supraventricular paroxística y el remodelamiento adverso asociado con la insuficiencia cardiaca congestiva.

## **1.2 NECROSIS**

La necrosis es un proceso de muerte celular rápida e irreversible que ocurre cuando las células son severamente dañadas. A diferencia de la apoptosis es un mecanismo que no requiere energía. Se caracteriza por el hinchamiento de la célula y sus organelas, con la consecuente ruptura de la membrana y la lisis celular. El vaciamiento del contenido citoplasmático al espacio extracelular genera una respuesta inflamatoria, que causa un daño del medio circundante y muerte de las células vecinas. En muchos estudios de isquemia y reperfusión o en muestras obtenidas de corazones humanos con infarto agudo de miocardio se ha descrito muerte celular por necrosis (Kajstura y col., 1996; Guerra y col., 1999). Sin embargo en estos modelos también se ha descrito muerte celular tanto por necrosis, como por apoptosis (James y col., 1996; Vila Petroff y col., 2007). Una hipótesis que podría explicar la coexistencia de necrosis y apoptosis luego de la isquemia/reperfusión sería que el daño producido por isquemia desencadenaría apoptosis, pero si la isquemia se prolonga y la producción de energía no es restaurada (dado que la apoptosis es un proceso que requiere ATP), se produciría un insulto mayor tal que desencadenaría necrosis, (Gill y col., 2002). Hasta el momento no se encuentran evidencia de la presencia de necrosis inducida por taquicardia crónica.



**Figura 2:** Esquema de las diferencias celulares entre los procesos de apoptosis y necrosis.

	<b>Apoptosis</b>	<b>Necrosis</b>
<b>Condensación nuclear</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>
<b>Respuesta inflamatoria</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>
<b>Fagocitosis</b>	<b>No</b>	<b>Posible</b>
<b>Edema celular</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>
<b>Volumen celular</b>	<b>Disminuido</b>	<b>Aumentado</b>
<b>Rotura del ADN</b>	<b>Ordenada</b>	<b>Al azar</b>
<b>Lisis y liberación de material citoplasmático</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>
<b>Membrana celular</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>
<b>Gasto energético</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>
<b>Activación de proteasas</b>	<b>Parcial</b>	<b>No</b>
<b>Capacidad de regresión</b>	<b>Lenta</b>	<b>Rápida</b>

**Figura 3:** Principales diferencias entre los procesos de apoptosis y necrosis celular.

## **2. p38MAPK**

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de serina-treonina (Ser/Thr) quinasas que deciden el destino de procesos celulares tan importantes como el crecimiento celular, proliferación, muerte y diferenciación en respuesta a una serie de estímulos (Pearson y col., 2001). Entre los miembros de la familia MAPK, los mitógenos y factores de crecimiento frecuentemente activan la ruta ERK1/2, mientras que el estrés y procesos inflamatorios constituyen el principal desencadenante de la cascada de JNK y p38MAPK, algunas veces referidas como “proteínas quinasas activadas por estrés”. Por tanto, median respuestas a choques osmóticos, citoquinas inflamatorias y otras agresiones frecuentemente asociadas con decisiones de supervivencia y apoptosis (Nebreda y col., 2000).

Las cascadas de señalización de las MAPKs se organizan en módulos individuales, que se inician por estímulos extracelulares a través de distintos receptores y mediadores. La activación de una MAPK se consigue a través de una cascada lineal de señalización en la cual signalosomas asociados a membrana activan una MAPK quinasa quinasa (MAP3K) que fosforilan y activan una MAPK quinasa (MAPK2). Esto se traduce en una fosforilación dual de las MAPKs en un dominio de tres aminoácidos conservado, Thr-X-Tyr, y en un incremento en la actividad catalítica de la MAPK. Las MAPKs fosforilan residuos de Ser/Thr seguidos por una prolina de sustratos nucleares y citosólicos que incluyen importantes factores de transcripción y diferentes efectores. Estos entonces impactan sobre el programa genético celular o el control de decisiones de proliferación como es el caso del módulo ERK, sobre apoptosis o diferenciación como es a menudo el caso de las rutas de JNK y p38MAPK, y sobre otras funciones citosólicas que incluyen migración celular, hipertrofia, transducción sensorial, respuestas metabólicas y muchas otras (Shi y col., 2006).

La p38MAPK es activada por MAPKKs, que incluyen MKK3-, MKK6, y JNKK1, que fosforilan con especificidad dual los motivos TGY (residuos de treonina 180 y tirosina 182). Los efectores de la familia p38MAPK incluyen factores de transcripción (ATF-2, Elk-1, CHOP/Gadd15), Max, MEF2C) y enzimas (MAPKAP quinasa). La ruta MAP3K de p38MAPK puede incluir Tak1, Ask1, y MLK (Nemoto y col., 1998).

La ruta p38MAPK juega un papel importante en apoptosis. Se ha demostrado que muchas señales apoptóticas estimulan la actividad de p38MAPK y que esta activación se correlaciona fundamentalmente con la inducción de apoptosis en varios tipos celulares. (Duckett y col., 1999; Huang y col., 1999; Sanchez-Prieto y col., 2000)



## **2.1 Estructura y función de p38MAPK**

p38MAPK pertenece a una familia de proteínas serina-treonina quinasa que fue descubierta en el año 1994 (Han y col., 1994) debido a su fosforilación en respuesta a endotoxinas y choque osmótico, y por poseer una alta homología con una proteína *HOG1* descrita en *Saccharomyces cerevisiae* (Brewster y col., 1993).

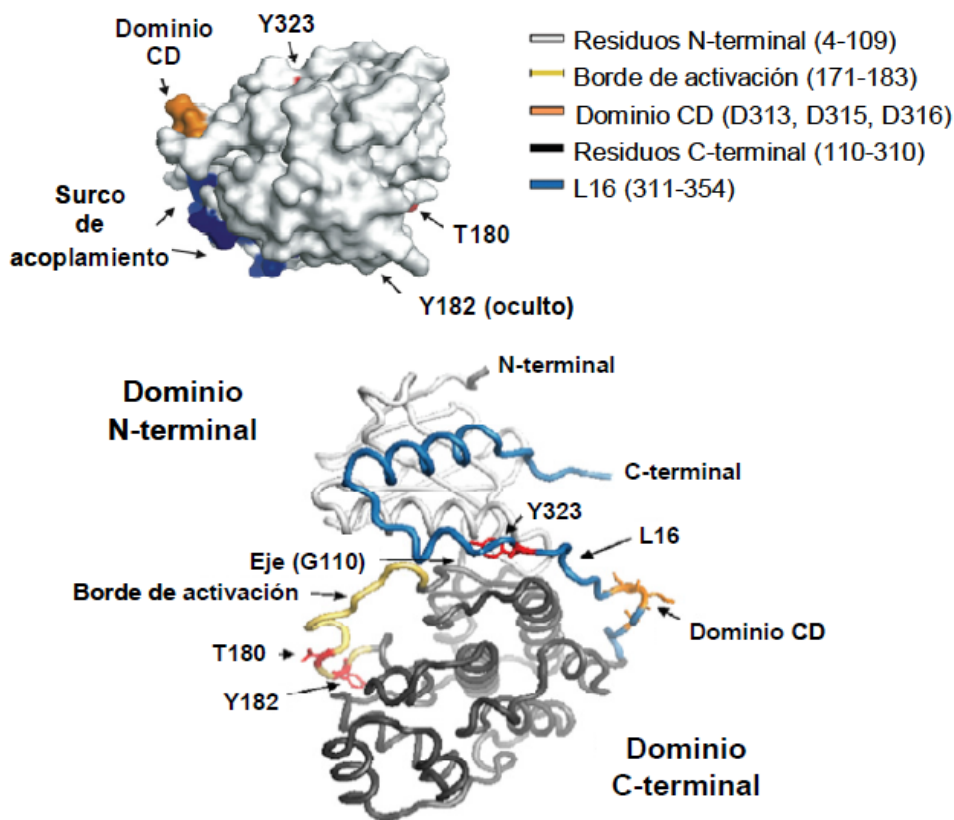
La familia de p38MAPK está compuesta por 4 isoformas. Las isoformas p38MAPK $\alpha$  (SAPK2A) y p38MAPK $\beta$  (SAPK2B) (Han y col., 1994) son los componentes mayoritarios y se expresan en todos los tejidos de una forma ubicua en el caso de modelos murinos. La isoforma p38MAPK $\gamma$  (SAPK3/ERK6) (Lechner y col., 1996; Li y col., 1996; Cuenda y col., 1998) tiene una expresión preferente en músculo y por último, la isoforma p38MAPK $\delta$  (SAPK4) se expresa mayoritariamente en pulmón y riñón (Jiang y col., 1996; Kumar y col., 1997). En el caso de la especie humana, aunque el patrón de expresión de las diferentes isoformas varía dependiendo del tejido en el que se encuentren, la expresión de las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  son ubicuas mientras que la expresión de la isoforma  $\gamma$  se da en músculo esquelético (Li y col., 1996; Court y col., 2002), corazón, pulmón, timo y testículo. Por último la expresión de la isoforma  $\delta$  se expresa en pulmón, páncreas, intestino delgado, riñón, testículo y epidermis (Kumar y col., 1997; Dashti y col., 2001).

## **2.2 Localización celular y caracterización de p38MAPK**

La localización celular de la proteína p38MAPK es un tema controvertido ya que en células quiescentes no queda claro lo que ocurre tras ser estimulada. Existen evidencias de que p38MAPK se transloca al núcleo tras su activación (Raingeaud y col., 1995), aunque hay otra serie de evidencias que demuestran que tras su activación se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Ben-Levy y col., 1998).

El estudio cristalográfico de las MAPKs ha permitido resolver la conformación del sitio catalítico, el cual descansa en un bolsillo entre dos dominios, uno constituido por los residuos del extremo N-terminal más una cadena hacia el extremo C-terminal, lazo 16 (L16) y el otro compuesto por los residuos del extremo C-terminal. Estos dominios están conectados por un eje de cadena única que está centrado alrededor de la Gly-110 en p38 $\alpha$  (Gly-113 en p38 $\gamma$ ) (Bellon y col., 1999). L16 puede estar contribuyendo al control de la relación entre los dos dominios que son relativamente rígidos. Thr-180 y Tyr-182 están localizados en un “borde de activación” flexible que guarda el sitio

activo, una fosforilación dual induce al lazo moverse hacia abajo para que el sustrato tenga mejor acceso y que los dominios N- y C-terminal giren como cuerpos rígidos sobre el eje, lo cual altera la conformación del sitio catalítico hacia un estado más activo (Canagarajah y col., 1997; Bellon y col., 1999). El dominio ácido común de acoplamiento (CD) está compuesto por tres residuos cercanos de ácido aspártico: Asp-313, Asp315 y Asp316 (Tanoue y col., 2001), que se sitúan en el L6 cerca de Tyr-323 interacciona con los dominios de acoplamiento (D) de MAPKKs, inhibidores de fosfatasa y proteínas del esqueleto y distintos sustratos que consisten en dos o más residuos básicos.



**Figura 4:** Representación del esqueleto peptídico de p38MAPK (modificado de Mittelstadt y col., 2005).

### 2.3 Activación

Dentro de las MAPKKK responsables de la activación de p38MAPK, podemos destacar MTK1, MLK2, MLK3, DLK, ASK1 y TAK1. Cuanto más subimos en la cascada de transducción de señales menor es la especificidad de la activación. Dentro de las MAPKK, la activación de p38MAPK se da gracias a dos activadores fundamentales que

van a ser MKK6 y MKK3 (Derijard y col., 1995; Raingeaud y col., 1995). Cabe resaltar que el activador MKK6 es capaz de activar todas las isoformas de p38MAPK, no así el activador MKK3 que sólo activa la isoforma  $\beta$  (Enslin y col., 1998; Hale y col., 1999). Estudios *in vitro* demuestran que aunque MKK4 activa preferentemente a JNK es capaz de contribuir a la activación de p38MAPK (Derijard y col., 1995; Doza y col., 1995; Lin y col., 1995; Brancho y col., 2003), al igual que pasa *in vivo* en algunas células inflamatorias (Moriguchi y col., 1997; Ono y col., 2000).

Recientemente se ha observado que también puede darse una activación de p38MAPK independiente de MKKs, como la que se da en respuesta a ciertos receptores de membrana como es el caso del receptor de TNF $\alpha$  (Ge y col., 2002; Ge y col., 2003).

Otras de las activaciones independientes de MKKs descrita, es la mediada por TAB1, la cual provoca una autofosforilación de p38MAPK capaz de activar a la proteína y con ella activar a sus sustratos (Ge y col., 2002; Tanno y col., 2003; Ohkusu-Tsukada y col., 2004).

Otro de los factores importantes a la hora de activar la ruta de p38MAPK, es la presencia en la célula de moléculas adaptadoras capaces de acercar las proteínas quinasas para favorecer su fosforilación.

Así mismo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden activar a p38MAPK (Wenzel y col., 2001), y de hecho p38MAPK ha sido propuesta como sensor de ROS. Por otro lado, recientes evidencias experimentales sugieren que p38MAPK puede ser activada por CaMKII (Takeda y col., 2004; Nguyen y col., 2004; Gardner y col., 2005).

## **2.4 Desactivación**

Las MAP quinasas fosfatasas (MKP) son un grupo de proteínas capaces de desactivar (retirar los grupos fosfato) a las MAPKs, estableciendo el fin de la función que venía desempeñando (Keyse y col., 1995; Watanabe y col., 2001). Cabe destacar que las fosfatasas específicas de serinas/treoninas como son PP2A y PP2C $\alpha$ , específicas de p38MAPK (Takekawa y col., 1998; Keyse y col., 2000; Tamura y col., 2000). Los mecanismos por los que las isoformas de p38MAPK son reguladas de forma diferencial, dependen de los niveles de fosfatasas y también de su especificidad (Zarubin y col., 2005).

## 2.5 Función de p38MAPK

Dada la variedad de sustratos capaces de activarse por p38MAPK no es de extrañar que esta familia esté implicada en diversas funciones celulares. La participación de p38MAPK en procesos inflamatorios fue una de las primeras funciones atribuidas a esta molécula, gracias a su implicación en la señalización de la activación de TGF- $\beta$  (Kulasekaren y col., 2009).

p38MAPK, también ha sido implicada en la regulación del ciclo celular, debido a la acción que ejerce esta proteína en los diferentes puntos de control de dicho ciclo (Ambrosino y col., 2001; Molnar y col., 1997; Wang y col., 2000).

Otra función destacada de p38MAPK está relacionada con la transmisión de señales como respuesta a diferentes agentes que dañan el ADN, como sería el caso de la utilización de agentes quimioterápicos tales como el Taxol o la Vincristina (Lee y col., 1998; Deacon y col., 2003), o la exposición a diversas radiaciones como la ionizante (Verheij y col., 1998), o la ultravioleta (Raingaud y col., 1995; Hazzalin y col., 1996; Brancho y col., 2003). Esta señalización culmina en muchos casos en un proceso de apoptosis, la cual es mediada en la mayoría de los casos por la fosforilación de p53 (Duckett y col., 1999; Huang y col., 1999; Sanchez-Prieto y col., 2000).

Parece claro que la decisión de la entrada en apoptosis en respuesta a diferentes agentes de estrés, puede estar mediada por el balance entre las rutas de ERK y p38MAPK que será el que determinará que la célula continúe viviendo o muera (Xia y col., 1995; Berra y col., 1997; Berra y col., 1998).

El uso de inhibidores de caspasas es capaz de revertir la activación de p38MAPK en apoptosis, sugiriendo su control sobre p38MAPK (Cahill y col., 1996; Fernandes-Alnemri y col., 1996; Henkart, 1996; Huang y col., 1997). Sin embargo, la sobreexpresión del dominante positivo MKK6b puede también inducir la actividad caspasa y la muerte celular infiriendo que p38MAPK puede intervenir en apoptosis tanto regulando la actividad de caspasas como siendo regulada por caspasas (Ziegler-Heitbrock y col., 1992; Cardone y col., 1997). El papel de p38MAPK es muy diferente dependiendo del tipo celular y del estímulo aplicado. Mientras que la activación de p38MAPK se ha visto que promueve la muerte celular en algunas líneas celulares, en otras aumenta la supervivencia, la proliferación, o la diferenciación (Zarubin y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que la señalización de p38MAPK promueve la muerte celular (Sarkar y col., 2002; Porras y col., 2004).

Kuramochi y colaboradores en un modelo de cardiomiocitos aislados sometidos a marcapaseo eléctrico rápido, observaron que la elevada frecuencia de estimulación

promueve apoptosis e induce la activación de MAP quinasas (MAPK) entre ellas la p38MAPK (Kuramochi y col., 2006). Consistentemente, en un modelo *in vivo* de insuficiencia cardiaca inducida por marcapaseo rápido, el grupo de Heusch y colaboradores demostraron que estaba aumentada la apoptosis y la actividad de p38MAPK (Schulz y col., 2003). A pesar de que la actividad proapoptótica de p38MAPK ha sido bien establecida (Baines y col., 2005), en estos trabajos solo se mostraba una correlación positiva entre el aumento de apoptosis y la activación de p38MAPK (Kuramochi y col., 2006; Schulz y col., 2003).

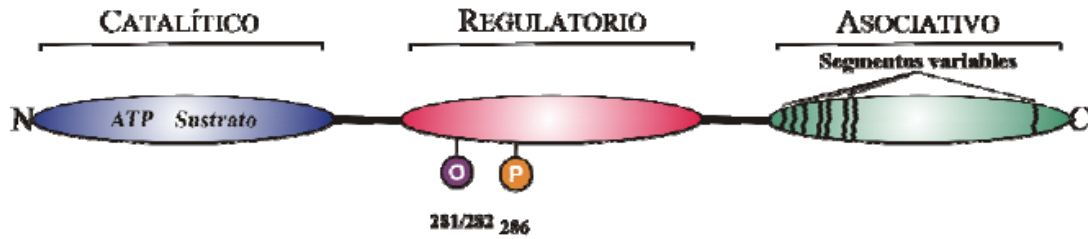
Por otra parte, Palomeque y colaboradores demostraron que la administración crónica de Angiotensina II promueve apoptosis por una vía que no involucra un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular pero requiere a CaMKII, concluyeron que la Angiotensina II aumentaba la producción de ROS, resultando en la activación crónica de CaMKII que a su vez promovía la activación de la p38MAPK que actuaba como efector final de la cascada apoptótica (Palomeque y col., 2009). Teniendo en cuenta que el marcapaseo rápido también aumenta el estrés oxidativo (Heinzel y col., 2006; Yamamoto y col., 2006) y activa a CaMKII (Wagner y col., 2011). Estos resultados sugieren que una vía similar de activación de CaMKII por ROS y la consecuente activación de p38MAPK podría estar involucrada en apoptosis inducida por taquicardia crónica. Sin embargo, si esta vía de señalización es operativa en apoptosis inducida por taquicardia crónica aún no ha sido evaluado.

### 3. *CaMKII*

#### 3.1 Estructura y función

El calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) se encuentra formando parte de numerosas vías de señalización en diferentes tipos celulares actuando como segundo mensajero. En algunos tipos celulares el  $\text{Ca}^{+2}$  induce la modulación de las quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  y calmodulina (CaMKs). Dentro de esta familia de quinasas se presentan CaMKI, CaMKIV y CaMKII (Schulman y col., 1978). Esta última es una serina-treonina quinasa de amplia distribución, codificada por cuatro genes separados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  predominan en tejido nervioso, en tanto que la isoforma  $\beta$  se presenta predominantemente en el tejido muscular esquelético y las isoformas  $\gamma$  y  $\delta$  se distribuyen en el resto de los tejidos (Schulman y col., 1978).

En el tejido cardíaco predomina la isoforma  $\delta$  (Schulman y col., 1978), la cual presenta dos variantes de corte y empalme:  $\delta_c$  que es citosólica y  $\delta_b$  nuclear (Braun y col., 1995; Mishra y col., 2011). En la mayoría de los tejidos, CaMKII existe como un oligómero de entre 8 y 12 subunidades. Cada uno de estos monómeros posee un peso de 50kD con aproximadamente 480 aminoácidos de extensión. Cada monómero está compuesto por tres dominios con funciones específicas (Figura 5): 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 calcio/calmodulina ( $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ ) y donde se encuentran los sitios susceptibles de fosforilación y oxidación, de gran importancia para el mantenimiento de la actividad de la quinasa (Shwover y col., 1986; Erickson y col., 2008), y un tercer dominio cercano al extremo C-terminal, que es un dominio de asociación variable, que permite a los monómeros de CaMKII asociarse entre sí o formar diversos complejos moleculares (Couchonnal y col., 2008). El dominio catalítico se encuentra reprimido por el dominio regulatorio ya que se asocian por plegamiento de la molécula sobre sí misma (ver Figura 6), impidiendo que el complejo  $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$  se una al sitio regulatorio.

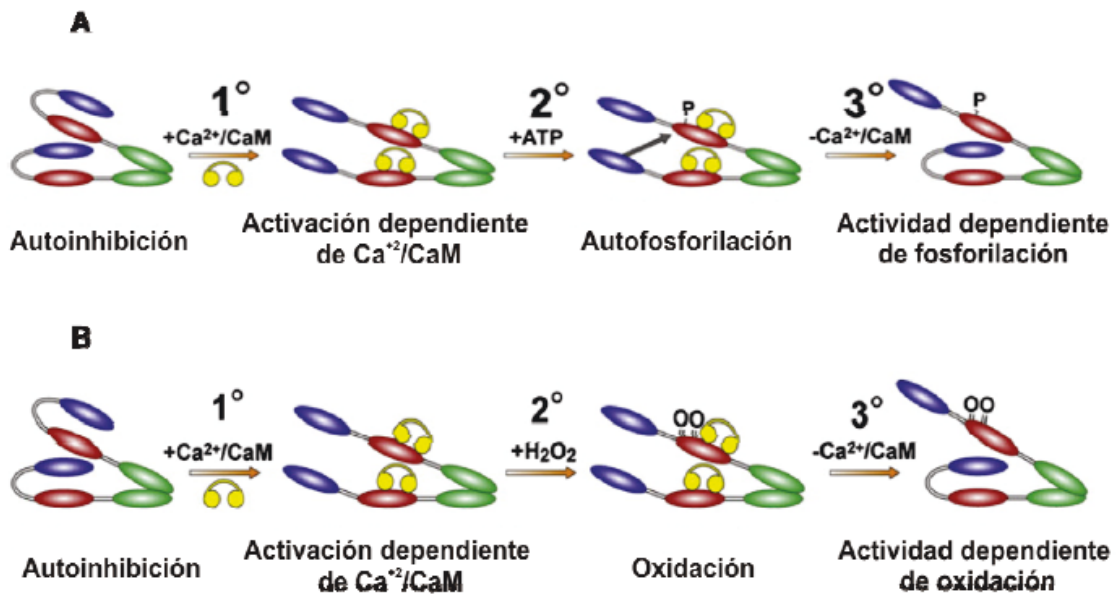


**Figura 5:** Esquema lineal representativo de la molécula CaMKII (consenso de las isoformas mencionadas). En azul, el dominio catalítico, en rojo, el regulatorio y el de asociación en verde. El sitio fosforilable se representa con una P, con O, el sitio oxidable y con líneas negras, las regiones variables por corte y empalme. (Figura modificada de Couchonnal & Anderson, *PHYSIOLOGY*, 2008).

### 3.2 Activación

El proceso de activación de CaMKII es el siguiente (ver Figura 6): el complejo de cuatro iones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular unidos a calmodulina (CaM) se fija al dominio regulatorio de CaMKII, provocando la “apertura” o despliegue de la molécula, desreprimiendo el sitio catalítico, el cual queda expuesto 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 Thr286/287 (treonina, la numeración depende 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 Thr286 aumenta la afinidad del complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  por CaMKII, unas 1000 veces (Griffith y col., 2004); además dicha fosforilación impide la reasociación con el dominio catalítico. Como resultado, la fosforilación del residuo Thr286 permite una actividad persistente de CaMKII aun después de la disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Couchonnal y col., 2008) (Figura 6A). Esta es la forma canónica de regulación de la quinasa, por activación por  $\text{Ca}^{2+}$ , autofosforilación y desfosforilación por fosfatasas (Schulman y col., 1978; Couchonnal y col., 2008), fundamentalmente la fosfatasa tipo 1 (PP1). Esta liberación del grupo fosfato en la posición Thr286 permite que la quinasa vuelva a su estado inactivo inicial por autoinhibición (Figura 6A).



**Figura 6: A** Esquema representativo de la activación canónica de un dímero de CaMKII. Luego de la unión del complejo  $Ca^{2+}$ -CaM, se produce la activación de la quinasa 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 representativo del 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 quinasa y sostiene su activación, de la misma manera que lo hace la fosforilación del sitio Thr286/287 (2° y 3°). (Figura modificada de Couchonnal & Anderson, *PHYSIOLOGY*, 2008).

### 3.3 Otras formas de activación

Un hallazgo importante respecto a la activación de la CaMKII, fue el realizado por el grupo del Dr. Anderson de la Universidad de Iowa, USA, que describieron la activación sostenida de CaMKII por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Erickson y col., 2008). Más recientemente, un estudio de nuestro laboratorio reveló que las ROS reducen la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de CaMKII permitiendo que se active aún a niveles subfisiológicos de  $Ca^{2+}$  intracelular (Palomeque y col., 2009).

Los niveles elevados de ROS causan una modificación oxidativa del par de residuos Met281/282 (metionina281/282) en el dominio regulatorio de CaMKII, bloqueando la reasociación con el dominio catalítico y preservando de esta manera la actividad de la quinasa 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 (ver Figura 5B).



Por otra parte, experimentos *in vitro* en diferentes tipos celulares demostraron la posibilidad de activación de CaMKII mediada por PKC (Waxham y col., 1993), TNF $\alpha$  y radiación ultravioleta (Wright y col., 1997) y recientemente se ha descrito una forma alternativa de activación de CaMKII mediada por óxido nítrico (Gutierrez y col., 2013; Curran y col., 2014).

En el corazón, CaMKII cumple una función fisiológica regulando el AEC pero más recientemente numerosos trabajos han destacado la relevancia de CaMKII en diversas situaciones patológicas (Grueter y col., 2007). En este contexto, ha sido demostrado que la expresión de CaMKII se halla aumentada en insuficiencia cardiaca (IC) (Hoch y col., 1999) y que su sobreexpresión experimental es capaz de inducir IC (Zhang y col., 2004). CaMKII ha surgido como una molécula inductora de arritmias, apoptosis y necrosis (Zhu y col., 2007; Said y col., 2011; Sag y col., 2009; Vila Petroff y col., 2007; Sapia y col., 2010). Además, resultados de nuestro laboratorio demuestran que CaMKII media los efectos tóxicos de los digitálicos al promover la aparición de apoptosis y arritmias (Sapia y col., 2010; Gonano y col., 2011). En el siguiente apartado detallaremos algunas de sus acciones fisiológicas y patológicas más estudiadas.

### **3.4 CaMKII en condiciones fisiológicas**

Los requerimientos fisiológicos de 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 $\delta$ ) (Bacs y col., 2009) y ratones con expresión de un péptido inhibitorio de CaMKII a nivel del miocardio, no presentan alteraciones significativas en la función ventricular basal y en los diferentes parámetros del acoplamiento exitocontráctil (AEC) (Zhang y col., 2005). Estos hallazgos no indican sin embargo la ausencia de efectos de CaMKII en condiciones basales, ya que en dichas condiciones es posible detectar activación de la quinasa (fosforilación del residuo Thr286). En cambio es posible visualizar claramente el efecto de CaMKII sobre distintos parámetros del AEC, una vez que la quinasa ha sido activada.

CaMKII se activa en respuesta a señales generadas a través de los receptores acoplados a proteína-G (GPCR): **1.** Receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, receptores de endotelina y Angiotensina II, que inducen el acoplamiento de los GPCR a la proteína Gq. Este efecto podría ocurrir a través de la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos perinucleares sensibles a IP3 (inositol trifosfato) (Wu y col., 2006) o por un aumento de

Ca<sup>2+</sup> intracelular a través de los canales de Ca<sup>2+</sup> o del intercambiador sodio/calcio (NCX) (Iwamoto y col, 1996). **2.** Receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) acoplados a GPCR estimuladora, Gs. La activación de estos receptores forma AMP cíclico (AMPc) (derivado de la adenilato ciclasa), activan a PKA que resulta en un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular que activa a CaMKII (Mundiña-Weilenmann y col., 1996; Lindemann y col., 1985). La estimulación  $\beta$  (ej. Isoproterenol), produce además la activación de CaMKII indirectamente, a través del factor de intercambio de nucleótido de guanina, (Epac), una proteína directamente activada por AMPc (Cazorla y col., 2009). **3.** CaMKII ha sido propuesta como moduladora del efecto inotrópico positivo y relajante que se producen al aumentar de forma aguda la frecuencia de estimulación, fenómeno de la escalera positiva (Valverde y col., 2005; De Santiago y col., 2002).

La activación de CaMKII modula a través de la fosforilación, varias proteínas involucradas en el manejo del Ca<sup>2+</sup> intracelular y el AEC, incluyendo a los canales de calcio (receptores de rianodina, RyR) (Ferrero y col., 2007), fosfolamban (PLB) (Mundiña-Weilenmann y col., 1996; Lindemann y col., 1985; Simmerman y col., 1986), y los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Anderson y col., 1994), con múltiples consecuencias funcionales.

El RyR, es fosforilado por CaMKII fundamentalmente en el sitio Ser2814 (serina2814) (Ferrero y col., 2007; Wehrens y col., 2004). Aunque el significado funcional de este sitio es discutido, se ha demostrado que la fosforilación del sitio Ser2814 por CaMKII durante la estimulación  $\beta$ -adrenérgica favorece la liberación de Ca<sup>2+</sup> por el retículo sarcoplasmático (RS), contribuyendo por lo tanto al efecto inotrópico positivo de esta estimulación (Ferrero y col., 2007). Por otra parte, CaMKII puede fosforilar a PLB en el sitio treonina 17 (Thr17). Esta proteína en su estado desfosforilado inhibe a la bomba de Ca<sup>2+</sup> del RS (SERCA) y cuando se fosforila se libera dicha inhibición aumentando la velocidad de retoma de Ca<sup>2+</sup> por la bomba de esta manera, la fosforilación de PLB contribuye al efecto relajante de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica y por lo tanto al aumento de Ca<sup>2+</sup> en el RS y al efecto inotrópico positivo de la estimulación simpática (Mundiña-Weilenmann y col., 1996). Respecto a los canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo L, CaMKII activa a la *I<sub>Ca</sub>* (corriente de facilitación de Ca<sup>2+</sup>). Funcionalmente esta facilitación consiste en una escalera positiva de *I<sub>Ca</sub>*, en la que la amplitud de la misma aumenta y la inactivación se enlentece a lo largo de una serie de pulsos de estimulación (Anderson y col., 1994; Hudmon y col., 2005). Es decir, la actividad de CaMKII es importante en la regulación de actividades fisiológicas mediadas por Ca<sup>2+</sup>, como por ejemplo la respuesta de lucha y huida frente a la estimulación simpática. Además de los ya mencionados canales de Ca<sup>2+</sup>, CaMKII puede fosforilar otros canales tales como los canales de sodio (Wagner y col., 2006) y de potasio (Wagner y col., 2009). El

impacto integrado de estas acciones de CaMKII sobre las propiedades del potencial de acción (tales como configuración, duración, etc), resulta complejo. Por ejemplo, la activación de CaMKII aumenta la  $I_{Ca}$  y la corriente tardía de sodio, acciones que tienden a prolongar la duración del potencial de acción; pero además también aumenta ciertas corrientes de potasio que tienden a acortar la duración del mismo. Los cambios dependientes de CaMKII pueden impactar en el potencial de acción del cardiomiocito y producir arritmias.

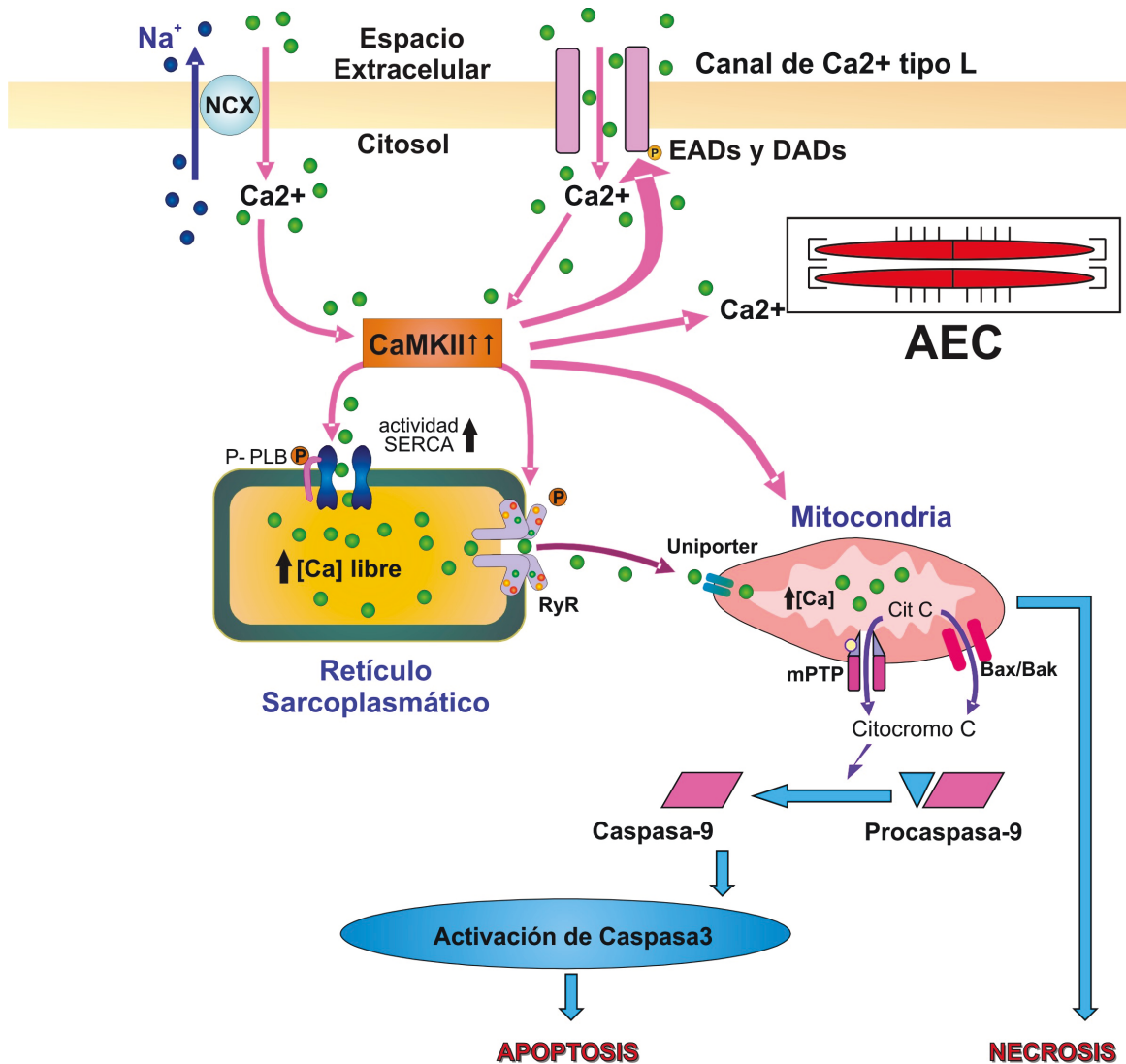
En las últimas décadas el conocimiento sobre la función de CaMKII a nivel cardiaco ha progresado enormemente, resultando en un mejor entendimiento de su estructura, función y papel fisiológico (Maier y col., 2007). El gran interés en CaMKII deriva de que su actividad depende, al menos en parte, de los cambios en el  $Ca^{2+}$  intracelular, de modo que los aumentos de  $Ca^{2+}$  intracelular que ocurren durante el aumento de la frecuencia de estimulación promoverían su activación. Así, CaMKII ha sido propuesta como moduladora del efecto inotrópico positivo y relajante que se producen al aumentar de forma aguda la frecuencia de estimulación (Valverde y col., 2005; De Santiago y col., 2002). Este fenómeno, llamado fenómeno de la escalera positiva es uno de los mecanismos fundamentales que contribuyen a la regulación de la contracción y relajación miocárdica en adición al control neuroendócrino.

### **3.5 CaMKII en situaciones patológicas**

En condiciones patológicas CaMKII aparece como una importante señal de enfermedad. La actividad de CaMKII está aumentada en la enfermedad cardiaca donde puede contribuir, a través de una alteración en el AEC al desarrollar arritmias, hipertrofia patológica y muerte celular en diferentes situaciones tales como la insuficiencia cardiaca, isquemia/reperfusión y estimulación con Angiotensina II (Maier y col., 2012).

Por ejemplo, el aumento en la fosforilación por CaMKII de los canales de RyR del retículo sarcoplasmático (RS) aumenta la liberación de  $Ca^{2+}$  durante la diástole (“chispas” de calcio) que puede inducir una liberación de  $Ca^{2+}$  desde los canales vecinos generando una onda de calcio. Este  $Ca^{2+}$  se extruye por el NCX aumentando la entrada de  $Na^{+}$  (sodio) y originando una despolarización de la membrana celular (despolarización tardía, DADs), que si llega al umbral, provoca un latido prematuro (Couchonnal y col., 2008; Maier y col., 2012; Pogwizd y col., 2001) (Figura 7). 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 cardiaca y de apoptosis/necrosis, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  perdido del RS podría sobrecargar a la mitocondria gatillando así la cascada apoptótica (Salas y col., 2010; Di Carlo y col., 2014).



**Figura 7:** Esquema representativo del efecto de la sobreactivación de CaMKII en condiciones patológicas y su efecto sobre las proteínas blanco de la quinasa.

Cuando el ritmo de la frecuencia se incrementa, aumenta la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, lo que podría activar a CaMKII (Kushnir y col., 2010). Esta activación de CaMKII inducida por MR podría aumentar aún más la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la fosforilación de varias proteínas de manejo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Si la activación de CaMKII se mantiene, podría dar lugar a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  al RS y una

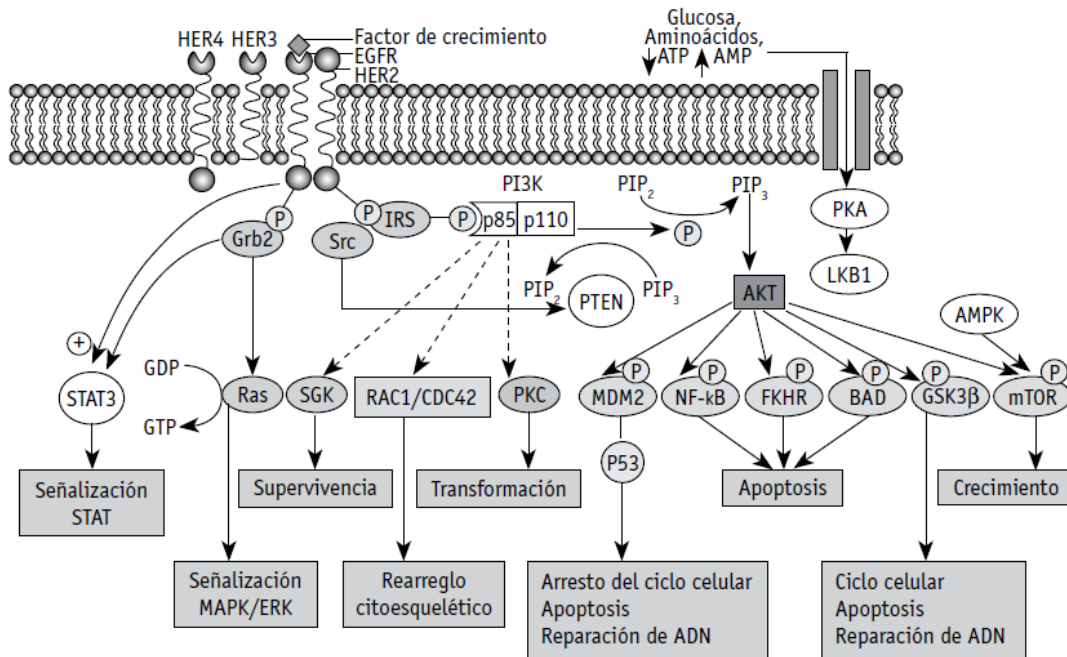
consecuente pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser perjudicial y desencadenar la activación de la cascada apoptótica. Durante la taquicardia crónica o el MR sostenido, se generan ROS intracelular, que también pueden activar a CaMKII, favoreciendo así el proceso apoptótico.

Por otro lado, las ROS también puede contribuir a la apoptosis independientemente de su efecto sobre la actividad de CaMKII.

En el presente estudio de tesis hemos probado la hipótesis de que el MR promueve la activación de CaMKII y la producción de ROS, lo que conduce a la activación de la cascada apoptótica y la muerte celular cardiaca.

#### **4. Vía de señalización de PI3K/AKT**

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular (Hiles y col., 1992). La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, los cuales se autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforilara la subunidad p85 de la PI3K (Figura 8). La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína AKT. La AKT tiene múltiples blancos, responsables de los efectos biológicos asociados con la activación de la vía (Hiles y col., 1992; Fruman y col., 1998; Jiménez y col., 1998).



**Figura 8:** Esquema de la vía de señalización PI3K. ERK; quinasa regulada por señales extracelulares. FKHR; forkhead. GDP; ganosita difosfato. IRS; sustrato receptor de insulina. GSK3; quinasa sintasa de glucógeno. MAPK; proteína quinasa activada por mitógeno. NFκB; factor nuclear κB. PIP2; fosfatidil inositol 3, 4 difosfato. PIP3; fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato. PKC; proteína quinasa C. STAT; traductor de señal y activador de la transcripción (Figura modificada de Hennessy y col.; 2005).

#### 4.1 Papel de PI3K en la supervivencia celular e inhibición de apoptosis

La señalización por AKT inactiva varios factores proapoptóticos como BAD, procaspasa-9 y factores de transcripción FKHR (Forkhead) (Figura 8) (Chen y col., 2001; Wang y col., 2002). Otros factores de transcripción que incrementan la expresión de genes antiapoptóticos son activados por AKT, incluyendo CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMP-cíclico), mediante fosforilación directa, NF-KB e HIF-1α. La activación del factor de transcripción NF-KB, a través de AKT, se genera inicialmente mediante la fosforilación y consecuente activación de IKKαβ (quinasa inhibidora de NF-KB), que fosforila y marca a IκB (inhibidor de NFκB) para ser degradado mediante el sistema ubiquitina-proteosoma, dejando libre a NF-KB, favoreciendo tanto su translocación al núcleo, como su actividad de transcriptor de genes antiapoptóticos. Otro efecto de AKT, para favorecer la supervivencia celular, es la inactivación del gen supresor de tumor, p53; lo cual se da por la habilidad de AKT para fosforilar y activar directamente a MDM2, una proteína que regula negativamente a p53. La fosforilación de muchos efectores por AKT regula su localización y, por tanto, su actividad, al

generar sitios de ligando para proteínas 14-3-3, importantes en la regulación de la localización celular y en la degradación de diversas moléculas (Brunet y col., 1999; Cahill y col., 2001).

En los cardiomiocitos, la vía de señalización PI3K/AKT está involucrada en la supervivencia de la célula en respuesta a diferentes estímulos como son: isquemia-reperfusión, estrés oxidativo, hipoxia y la estimulación  $\beta$ -adrenérgica para proteger contra la apoptosis. La taquicardia crónica también induce la activación de la vía protectora PI3K/AKT (Kuramochi y col., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que la activación sostenida de CaMKII es perjudicial en todas estas situaciones (Couchonnal y col., 2008).

Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio indican que el digitálico, Ouabaina induce apoptosis (por una vía que requiere CaMKII) y simultáneamente activa una cascada protectora mediada por PI3K/AKT (Sapia y col., 2010). Estos antecedentes sugieren que CaMKII podría ser el mediador molecular de la apoptosis inducida por taquicardia crónica y que la activación simultánea de la vía PI3K/AKT podría ser un mecanismo de protección endógeno que impide que el daño inducido por una elevación sostenida de la frecuencia cardíaca sea aún mayor.

# HIPÓTESIS

Los antecedentes hasta aquí descritos sugieren que la taquicardia crónica induce la activación de diversas señales proapoptóticas, entre ellas,  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS, CaMKII y p38MAPK. Sin embargo, aún no se ha examinado si estas moléculas participan en la cascada apoptótica y de ser así, si forman parte de una vía común que conduce a la muerte celular asociada con taquicardia crónica que contribuye al remodelamiento adverso asociado con esta entidad patológica.

Por tanto en este trabajo se pondrá a prueba la siguiente hipótesis:

*La taquicardia crónica, a través de un aumento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  y ROS, promueve una activación sostenida de CaMKII y p38MAPK que conducen a la apoptosis al promover la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).*



# OBJETIVOS

## Objetivos generales

\* Ratificar la inducción de apoptosis por marcapaseo rápido (**MR**) en nuestros preparados experimentales, a través de parámetros morfológicos, inmunohistoquímicos y bioquímicos.

\*Determinar si CaMKII y p38MAPK participan en la vía apoptótica inducida por MR y en ese caso, investigar la cascada de señales intracelulares involucradas, realizando ensayos con inhibidores farmacológicos específicos de los posibles mediadores intracelulares, en combinación con medidas de Ca<sup>2+</sup> intracelular y ROS.

\*Determinar los blancos moleculares de CaMKII y p38MAPK, a través de los cuales la vía apoptótica se hace efectiva.

\*Determinar el impacto de la vía PI3K/AKT sobre la muerte celular inducida por MR.

## Objetivos específicos

Determinar:

- 1) Si la elevación sostenida de la frecuencia de estimulación, en miocitos aislados, disminuye la viabilidad celular al promover apoptosis y/o necrosis.
- 2) Si la elevación sostenida de la frecuencia de estimulación está asociada con un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular y ROS que conducen a la activación de CaMKII y p38MAPK.
- 3) Si la inhibición de CaMKII y p38MAPK reduce, y si su sobreexpresión aumenta, la apoptosis inducida por aumentos sostenidos de la frecuencia de estimulación.
- 4) Los mecanismos subcelulares involucrados en la apoptosis inducida por MR.
- 5) Si la activación simultánea de la vía PI3K/AKT protege de la apoptosis inducida por marcapaseo rápido.

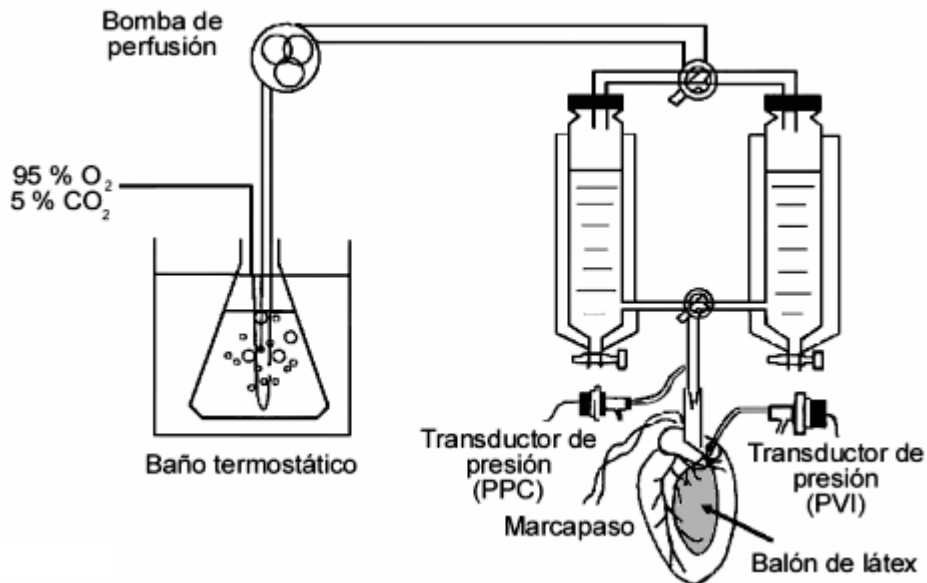
# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. *MODELOS BIOLÓGICOS*

Los experimentos fueron llevados a cabo respetando las normativas generales para uso de animales de laboratorio estipuladas en la "Guide for the Care and Use of Animals, NIH Publication N°85-23, 1996". Como modelos biológicos se utilizaron dos especies: rata y ratón. Los experimentos en este trabajo se realizaron en ratas macho Wistar (200-300g) y ratones machos (25-30g) silvestres, transgénicos y mutantes. Las cepas de ratones que se utilizaron fueron: los S2814a donde el sitio de fosforilación CaMKII- dependiente del RyR2 (sitio Ser 2814) está mutado a Alanina y su control la cepa C57 silvestre; y los ratones transgénicos AC3. Esta línea comprende los ratones AC3-I, 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 de aminoácidos original ha sido cambiada al azar para generar un péptido inactivo, los AC3-C. Una pareja de cada ratón AC3 fué gentilmente donada por el Dr. Mark Anderson, de la Universidad de Iowa, Iowa, EE.UU, y los S2814a por el Dr. Xander Wehrens, de la Universidad de Houston, Texas, EE.UU. Las líneas se continuaron en el bioterio de nuestra facultad.

## 2. *CORAZÓN PERFUNDIDO*

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Se les practicó una toracotomía, se aisló la aorta y se cortaron las conexiones cardíacas liberando al corazón de grasa y tejido conectivo, extirpándolo del animal. La aorta se ligó con hilo de lino a una cánula colocada en un sistema de perfusión tipo Langendorff (Figura 9). Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor a 50 seg para evitar el deterioro del preparado. El corazón fue perfundido con una solución de Ringer compuesta por: NaCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,35 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 20 mM y glucosa 11,1 mM, la cual fue termostaticada a 37 °C y equilibrada con una mezcla gaseosa de 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>, para obtener un valor de pH de aproximadamente 7,40, y una presión constante de perfusión de 70-80 mmHg. (Vila Petroff y col., 2007)



**Figura 9:** Esquema representativo del modelo tipo Langendorff.

Luego de un breve período de estabilización, se produjo el bloqueo aurículo-ventricular dañando con una aguja el tejido conductivo del septum auricular. La estimulación eléctrica se realizó a través de dos electrodos que fueron colocados en la pared ventricular derecha a una frecuencia de 0,5Hz (valor que referimos a continuación como baja frecuencia); y 5Hz y 8Hz (referidos como alta frecuencia).

Se utilizó un inhibidor de la quinasa CaMKII (KN93), un barredor de la producción de ROS (MPG), y un inhibidor del canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo L (Nifedipina) durante el período de estimulación. Luego de 1 hora de estimulación a las distintas frecuencias, ya sea en presencia o ausencia de los distintos inhibidores, los corazones se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para los ensayos bioquímicos.

## **2.1 Protocolos experimentales en el modelo de Langendorff:**

- **0,5 Hz:** período de estabilización 15 min. y 60 min marcapaseo a 0,5 Hz (30 lat/min).
- **5 Hz:** período de estabilización 15 min. y 60 min. marcapaseo a 5 Hz (300 lat/min)
- **8 Hz:** período de estabilización 15 min. y 60 min. marcapaseo a 8 Hz (480 lat/min)

- **0,5 Hz + KN93 2.5  $\mu\text{M}$  (inhibidor específico de CaMKII):** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + KN93.
- **5 Hz + KN93 2.5  $\mu\text{M}$ :** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 5 Hz + KN93.
- **8 Hz + KN93 2.5  $\mu\text{M}$ :** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 8 Hz + KN93.
  
- **0,5 Hz + MPG 2 mM (barredor de ROS):** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + MPG.
- **5 Hz + MPG 2 mM:** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 5 Hz + MPG.
- **8 Hz + MPG 2 mM:** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 8 Hz + MPG.
  
- **0,5 Hz + Nifedipina 1  $\mu\text{M}$  (inhibidor de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L):** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Nifedipina.
- **5 Hz + Nifedipina 1  $\mu\text{M}$ :** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Nifedipina.
- **8 Hz + Nifedipina 1  $\mu\text{M}$ :** período de estabilización de 15 min. en ausencia de la droga y 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Nifedipina.

### 3. PREPARACIÓN DE TEJIDOS

Finalizado cada uno de los protocolos experimentales, los corazones se retiraron del sistema de perfusión de Langendorff. La porción ventricular fue homogenizada en la proporción de 1 g de tejido en 5 ml de buffer compuesto por Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, NaF 0,5 M, EDTA 0,1 M, EGTA 0,1 M,  $\beta$  Mercaptoetanol 0,10%, Tritón 10%, Ortovanadato de sodio 1 mM, Pirofosfato 0,1M, agua bidestilada, Pepstatina 1 mg/ml, Cocktail inhibidor de proteasas 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El tejido fue homogeneizado durante 1 minuto a una temperatura entre 0 y 2  $^{\circ}\text{C}$  con el homogenizador Polytron. El homogenato fue centrifugado 15 minutos a 3000 rpm a 4  $^{\circ}\text{C}$ , recuperándose el sobrenadante de los cuales una alícuota fue utilizada para la determinación de

proteínas por el método colorímetro de Bradford (BioRad) por espectrofotometría a 595 nm (Bradford y col., 1976), usando albúmina de suero bovino como estándar. El remanente del sobrenadante fue almacenado a -80 °C hasta su posterior uso.

#### 4. INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT

Las muestras fueron mezcladas con un *buffer* de carga desnaturizante para facilitar la siembra en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles de poliacrilamida se utilizaron al 10 y 15% (Porzio y col., 1977), 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 un campo eléctrico constante de 100 Volts por una hora. Esto permitió la separación por tamaño 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 fluoruro de polivinilideno (PVDF, Inmobilon Millipore), aplicando para ello un campo eléctrico de 60 Volts durante una hora. 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.

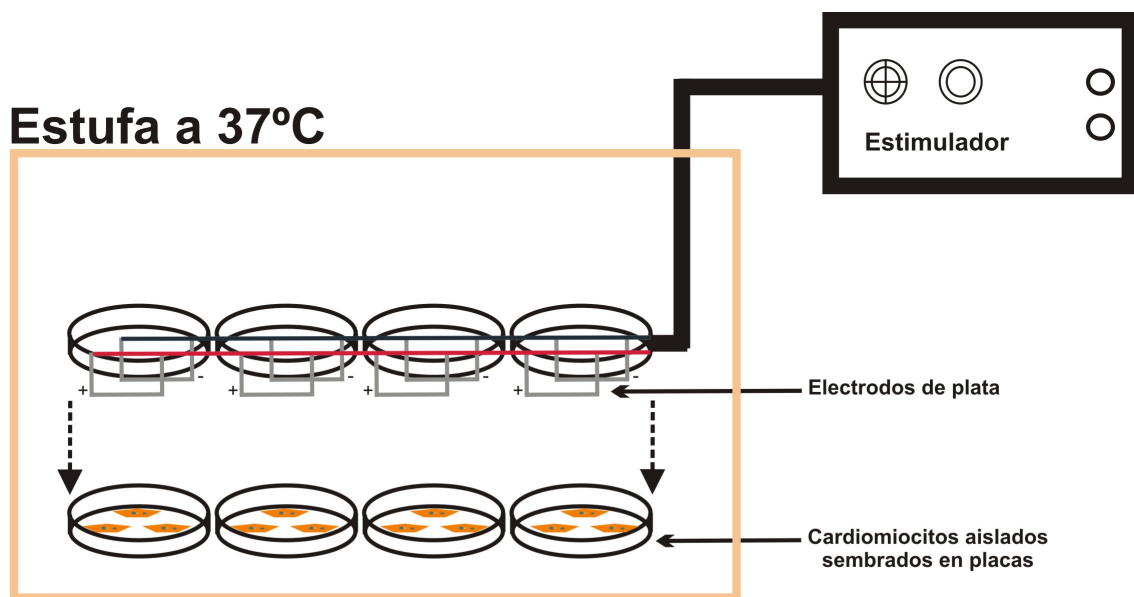
Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal específico toda la noche a 4 °C, que reconoce el antígeno específico en la membrana: contra el estado fosforilado del residuo Thr286 de CaMKII (1:1000, Abcam, EE.UU), y Tyr189 de p38MAPK (1:1000, Cell Signaling Technology, EE.UU), anti-p38MAPK total (1:1000, Cell Signaling Technology, EE.UU) , la fracción activada de Caspasa3 (1:500, Millipore, EE.UU), anti-GAPDH (1:1000, Millipore, EE.UU), anti-Bax (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) , anti-Bcl2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) y anti-pAKT (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU). Las fracciones proteicas de interés con el anticuerpo específico unido, fueron detectadas con un anticuerpo secundario específico, 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 con un equipo Chemidoc XRS (BIORAD, EE.UU), que captura y digitaliza las imágenes. Con el uso del programa *Scion Image* (NIH, EE.UU) se realizó la

densitometría de las bandas de interés (expresado en unidades arbitrarias, UA), y cada proteína se normalizó respecto a la cuantificación de la proteína total, o respecto a una proteína de expresión constitutiva (gliceraldehído fosfato deshidrogenada, GAPDH). Todos los tratamientos se expresaron como porcentaje del control.

## **5. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS**

Los cardiomiocitos fueron aislados según la técnica descrita previamente (Palomeque y col., 2006). 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 en forma retrógrada a 37 °C, a una presión constante de perfusión de 70-80 mmHg con una solución de buffer HEPES con la concentración de Ca<sup>2+</sup> correspondiente a cada especie (Rata 1 mM; Ratón 2,5 mM). Todas las soluciones fueron ajustadas a pH 7,4 y burbujeadas continuamente con O<sub>2</sub> al 100%. Después de un período de estabilización de 4 minutos, la solución de perfusión fue cambiada por una libre de Ca<sup>2+</sup> durante 6 minutos. 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<sup>2+</sup> del medio y se ha descrito que bajos niveles del ion reducen la adhesión entre las células (Bkaily y col., 1984). Los corazones se perfundieron luego con una solución de HEPES con CaCl<sub>2</sub> 50 μM y colagenasa 300 U/ml, proteasa 0,1 mg/ml y albúmina del suero bovino al 1% (BSA). Estas enzimas, junto con la BSA, permiten una digestión suave de la matriz proteica celular para poder disgregar los cardiomiocitos. 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 CaCl<sub>2</sub>. Después de cada lavado, los cardiomiocitos se dejaron sedimentar por 10 minutos. Este proceso permitió la recalcificación paulatina de los mismos. Las células se mantuvieron en la solución de HEPES con el Ca<sup>2+</sup> correspondiente a cada especie y a temperatura ambiente (22-24 °C), hasta el momento de ser usados (Gonano y col.; 2011). Los cardiomiocitos fueron sembrados a una densidad de aproximadamente 2x10<sup>4</sup> células/ml en placas individuales de 35x10 mm y luego se marcapasearon con un sistema de electrodos de plata conectados a un estimulador a 37 °C (Figura 10) de acuerdo con los diferentes protocolos

experimentales que se detallan a continuación.



**Figura 10:** Esquema representativo del modelo de estimulación de cardiomiocitos aislados. Los cardiomiocitos aislados se siembran en placas de petri individuales contenidos en una solución buffer HEPES a una concentración de  $Ca^{2+}$  1 mM, luego se colocan las tapas individuales adaptadas con electrodos de plata conectados a un estimulador eléctrico y son marcapaseados durante 1 hora a diferentes frecuencias (0,5, 5 y 8Hz). El experimento se realiza dentro de una estufa a una temperatura constante de 37 °C.

### **5.1 Protocolos experimentales en cardiomiocitos aislados:**

- **0,5 Hz:** 60 min. marcapaseo a 0.5 Hz.
- **5 Hz:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz.
- **8 Hz:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz.
  
- **0,5 Hz + KN93 2.5  $\mu$ M (inhibidor específico de CaMKII):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + KN93.
- **5 Hz + KN93 2.5  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + KN93.
- **8 Hz + KN93 2.5  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + KN93.
  
- **0,5 Hz + KN92 2.5  $\mu$ M (análogo inactivo del KN93):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + KN92.

- **5 Hz + KN92 2.5  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + KN92.
- **8 Hz + KN92 2.5  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + KN92.
  
- **0,5 Hz + AIP 1  $\mu$ M (péptido inhibidor de CaMKII):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + AIP.
- **5 Hz + AIP 1  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + AIP.
- **8 Hz + AIP 1  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + AIP.
  
- **0,5 Hz + SB202190 10  $\mu$ M (inhibidor específico de p38MAPK):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + SB202190.
- **5 Hz + SB202190 10  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + SB202190.
- **8 Hz + SB202190 10  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + SB202190.
  
- **0,5 Hz + MPG 2 mM (barredor de ROS):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + MPG.
- **5 Hz + MPG 2 mM:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + MPG.
- **8 Hz + MPG 2 mM:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + MPG.
  
- **0,5 Hz + Nifedipina 100 nM (bloqueante del canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Nifedipina.
- **5 Hz + Nifedipina 100 nM:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Nifedipina.
- **8 Hz + Nifedipina 100 nM:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Nifedipina.
  
- **0,5 Hz + Tetracaína 25  $\mu$ M (estabilizador del RyR2):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Tetracaína.
- **5 Hz + Tetracaína 25  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Tetracaína.
- **8 Hz + Tetracaína 25  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Tetracaína.
  
- **0,5 Hz + Carvedilol 1  $\mu$ M ( $\beta$ -bloqueante con reconocido efecto estabilizador del canal de Rianodina):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Carvedilol.
- **5 Hz + Carvedilol 1  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Carvedilol.
- **8 Hz + Carvedilol 1  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Carvedilol.
  
- **0,5 Hz + VKII86 1  $\mu$ M (estabilizador del canal de Rianodina con mínimo efecto  $\beta$ -bloqueante):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + VKII86.
- **5 Hz + VKII86 1  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + VKII86.
- **8 Hz + VKII86 1  $\mu$ M:** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + VKII86.



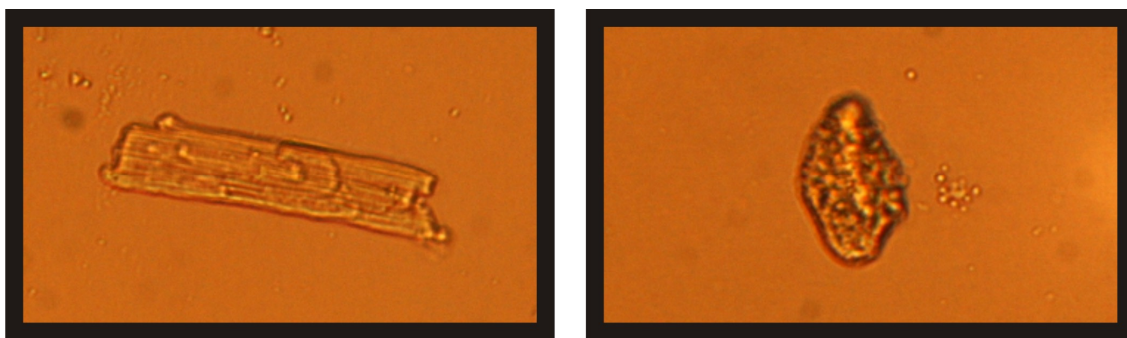
- **0,5 Hz + Apocinina 300  $\mu\text{M}$  (inhibidor de la NADPHox):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Apocinina.
- **5 Hz + Apocinina 300  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Apocinina.
- **8 Hz + Apocinina 300  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Apocinina.
  
- **0,5 Hz + Ácido Bongkrecico 10  $\mu\text{M}$  (inhibidor específico del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, mPTP):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Ác Bong.
- **5 Hz + Ácido Bongkrecico 10  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Ác. Bong.
- **8 Hz + Ácido Bongkrecico 10  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Ác. Bong.
  
- **0,5 Hz + Ruthenium Red 5  $\mu\text{M}$  (inhibidor del uniporter mitocondrial):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Ruthenium Red.
- **5 Hz + Ruthenium Red 5  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Ruthenium Red.
- **8 Hz + Ruthenium Red 5  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Ruthenium Red.
  
- **0,5 Hz + Wortmanina 2  $\mu\text{M}$  (inhibidor de PI3K):** 60 min. marcapaseo a 0,5 Hz + Wortmanina.
- **5 Hz + Wortmanina 2  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 5 Hz + Wortmanina.
- **8 Hz + Wortmanina 2  $\mu\text{M}$ :** 60 min. marcapaseo a 8 Hz + Wortmanina.

Para cultivo, los cardiomiocitos fueron sembrados a una densidad de aproximadamente  $2 \times 10^4$  células/ml en placas previamente tratadas con laminina por 1 hora para favorecer la adherencia de las células a la base de las mismas. Una vez adheridas las células, se procedió a cambiar la solución de HEPES por medio de cultivo fresco (DMEM, GIBCO número de catálogo 10567-022), con el agregado o no de los compuestos farmacológicos y/o vectores virales, de acuerdo a los distintos protocolos que se detallan en la sección Resultados. Las células fueron incubadas en una estufa con una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% por un período de 24 horas. Transcurrido este tiempo, los cardiomiocitos se destinaron a los diferentes estudios.

## 6. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LA VIABILIDAD CELULAR

Luego de 1 hora de marcapaseo rápido de los cardiomiocitos aislados o de 24 horas 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 o igual a 3 fue considerada viable), como fue previamente descrito (Vila Petroff y col., 2007). En la figura 11 se puede observar la estructura de un cardiomiocito viable, con sus estriaciones propias y bordes definidos, y por el otro, un cardiomiocito muerto que ha perdido la relación de área y las típicas estriaciones, observándose en forma circular. En muchos de ellos se observa además la membrana con vesículas, una característica típica de apoptosis como ya se ha descrito en la introducción.

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



**Figura 11:** Se muestran imágenes representativas de cardiomiocitos de rata vivo (izquierda) y muerto (derecha), a 40X de aumento.

## 7. MEDIDAS DE APOPTOSIS Y NECROSIS

La muerte celular por apoptosis se midió a través de la actividad de Caspasa3 y a través del cociente Bax/Bcl2.

Como se mencionó anteriormente la Caspasa3 es una de las cisteínas proteasas más frecuentemente activada durante los procesos apoptóticos y se vincula su actividad con este fenómeno, ya que es una efectora final de la cascada apoptótica (Kothakota y col., 1997). La actividad de la misma fue determinada utilizando un anticuerpo específico que detecta la fracción activada de Caspasa3 (1:500, Millipore, USA) y normalizadas por una proteína de expresión constitutiva (GAPDH).

Como se mencionó en la introducción el cociente Bax/Bcl2 constituye un punto de regulación en la apoptosis. La familia de proteínas Bcl2 posee proteínas proapoptóticas, como Bax y otras, y antiapoptóticas Bcl2 entre otras, esta familia de proteínas funciona principalmente protegiendo la integridad de la membrana mitocondrial y controla la liberación de las proteínas proapoptóticas, como el Citocromo C (CitC).

La relación entre proteínas pro y antiapoptóticas, tal como Bax/Bcl2 determina la respuesta a una señal de muerte. Cuando esta relación aumenta, es indicativo de activación del proceso de apoptosis. El análisis del grado de expresión de estas proteínas se detectó a través de los anticuerpos específicos anti-Bax (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-Bcl2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA).

Para medir muerte celular por necrosis se utilizó la prueba de exclusión del colorante azul de tripán para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul de tripán, mientras que las células muertas no lo hacen. En este ensayo, una suspensión de células se mezcla simplemente con el tinte azul de tripán durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente, la incubación no debe ser superior a 30 minutos ya que, puede causar una disminución en la viabilidad celular debido a la toxicidad del tripán. Luego las células se examinan visualmente en un microscopio óptico con luz transmitida para determinar si las células ocupan o excluyen colorante. En el protocolo presentado aquí, una célula viable tendrá un citoplasma claro mientras que una célula no viable tendrá un citoplasma azul (Strober, 2001).

## **8. INFECCIÓN CON ADENOVIRUS**

Se utilizaron adenovirus recombinantes, portadores del gen CaMKII<sub>δC</sub> y de la proteína fluorescente verde (GFP) (Ad.CaMKII.GFP), y en presencia del adenovirus portador del gen de la β-galactosidasa también asociado a GFP (Ad.βgal.GFP). Los adenovirus, provistos por el Dr. Roger Hajjar del Mount Sinai Medical Center, New York, fueron contruidos siguiendo el método de He y colaboradores (He y col., 1998; Luo y col., 2007). Una vez aislados, los cardiomiocitos fueron cultivados durante 24 horas en presencia de Ad.CaMKII.GFP a una multiplicidad de infección (MOI, que representa el número medio de partículas de virus que infecta a cada célula) de 100. (Gonano y col., 2011)

### **8.1 Verificación de expresión de proteínas recombinantes**

Para verificar la eficiencia de infección de los adenovirus recombinantes, se visualizó la GFP en microscopio de fluorescencia excitando a las células a una longitud de onda de 480 nm y visualizando la luz verde emitida a 530 nm. De esta manera, las células que se visualizan verdes por la expresión de la proteína fluorescente verde GFP, son las que coexpresan la proteína de interés.

## **9. MEDIDA DE ESPECIES REACTIVAS DE O<sub>2</sub> (ROS)**

La producción intracelular de **Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)** fue estudiada por microscopía de epifluorescencia en un microscopio confocal (Microscopio Zeiss 410) en cardiomiocitos aislados de rata Wistar macho de 3 meses de edad, pre-incubados con 5 μM del indicador fluorescente, 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (CM-H2DCFDA, Invitrogen/Molecular Probes) por 30 minutos a 37 °C. Los cardiomiocitos se excitaron con luz de un láser de argón de 488 nm mientras eran perfundidos y marcapaseados a 0,5, 5 y 8Hz; y la fluorescencia emitida se registró a 510-560 nm. Dado que la excitación lumínica oxida al indicador sensible a ROS, la señal desarrolla un aumento constante bajo exposición continua. Por ello las células son excitadas con la menor intensidad de láser disponible y se toman imágenes cada 180 segundos, estimando la producción de ROS en base a la pendiente del aumento en la señal fluorescente.

## 10. MEDIDAS DE $Ca^{2+}$ CITOSÓLICO

Con el propósito de monitorear en tiempo real los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico se realizaron experimentos funcionales por microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos aislados de rata Wistar macho de 3 meses. Estas células son incubadas durante 12 minutos a temperatura ambiente con el indicador sensible a  $Ca^{2+}$  Fura-2 en una concentración de 10  $\mu$ M. Los experimentos en los que se registran cambios rápidos en la concentración de iones intracelulares requieren tiempos de carga cortos (10-30 minutos), baja concentración del indicador, temperatura ambiente y alta densidad celular. La combinación de estos factores permite obtener la máxima concentración de moléculas internalizadas dentro de las células.

Luego del período de incubación las células son centrifugadas a baja velocidad durante 1 minuto y luego resuspendidas en solución Hepes libre de indicador, lo cual descarta aquellas moléculas del mismo que no ingresaron al compartimento intracelular.

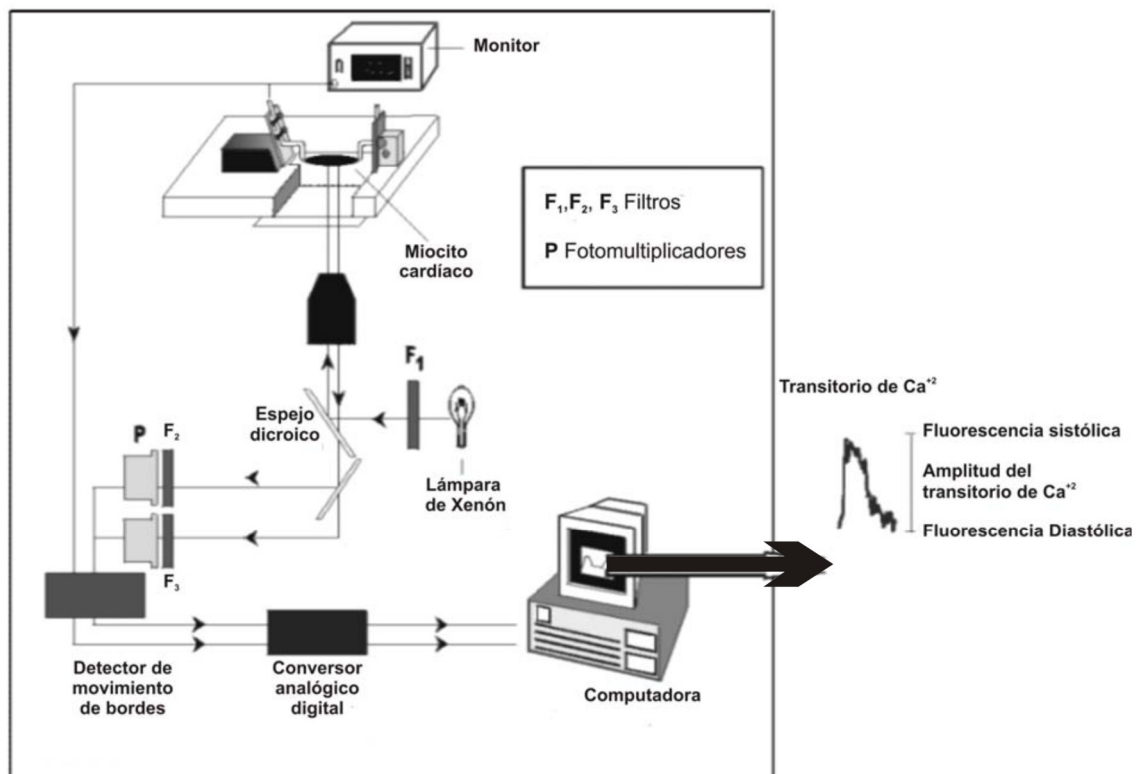
El Fura-2 se utiliza en su forma permeante éster de acetoximetilo (AM), que hace que se comporte como una molécula hidrofóbica capaz de atravesar con facilidad la membrana plasmática. Una vez dentro del citosol, las esterasas intracelulares hidrolizan la unión éster liberando la porción AM y la forma ácida activa del fluoróforo, que quedará retenida en el interior celular. Por esta razón las células no son utilizadas durante los 30 minutos posteriores a la incubación con el indicador, para permitir la desesterificación intracelular del mismo y trabajar luego con células que contengan una concentración intracelular estable de Fura-2 (Palomeque y col., 2009).

Las células ya cargadas fueron colocadas sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200) adaptado para la técnica de epifluorescencia. Las mismas fueron perfundidas con solución HEPES pH 7,4 a un flujo constante de 1 ml/minuto y estimuladas eléctricamente por campo con ondas cuadradas de 10 milisegundos (mseg) de duración y una intensidad de 30 voltios enviado a través de dos electrodos de platino colocados a cada lado de la cámara de perfusión a una frecuencia de 0,5, 5 y 8 Hz.

Para obtener una señal fluorescente sensible a  $Ca^{2+}$  citosólico, las células fueron iluminadas mediante una lámpara de Xenón filtrando el haz de luz para excitar a dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm) en forma alternada. La fluorescencia emitida por las células fue registrada a  $> 510$  nm registrada por un fotomultiplicador. La excitación alternada con dos longitudes de onda permite calcular un cociente entre la señal emitida por el indicador cuando es excitado con luz de 340 nm de longitud de onda (en estas condiciones su emisión varía según se encuentre o no interactuando

con moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y la señal emitida cuando es excitado con luz de 380nm de longitud de onda (en esta condición la intensidad de señal emitida es independiente de la interacción entre moléculas de fluoróforo y  $\text{Ca}^{2+}$ ). La obtención de este cociente permite normalizar la señal fluorescente adquirida por la cantidad de moléculas de fluoróforo que se encuentran en condiciones de emitir señal fluorescente a lo largo del experimento, evitando artefactos derivados del apagamiento (“*quenching*”) del fluoróforo o su salida de la célula. El cociente de fluorescencia emitida será considerada una medida del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Gonano y col., 2011). La figura 12 muestra un esquema de los componentes que conforman el equipo utilizado para las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

El contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplasmático (RS) es estimado a partir de la amplitud del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenido mediante la aplicación de un pulso de cafeína. Esta maniobra consiste en la aplicación rápida de 15 mM/L de cafeína, lo cual provoca la liberación completa de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  contenidas dentro del RS (Bers 2001; Gonano y col., 2011).



**Figura 12:** Esquema que muestra la disposición del instrumental utilizado para la determinación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por epifluorescencia.

## **11. MEDIDAS DE ONDAS DE Ca<sup>2+</sup>**

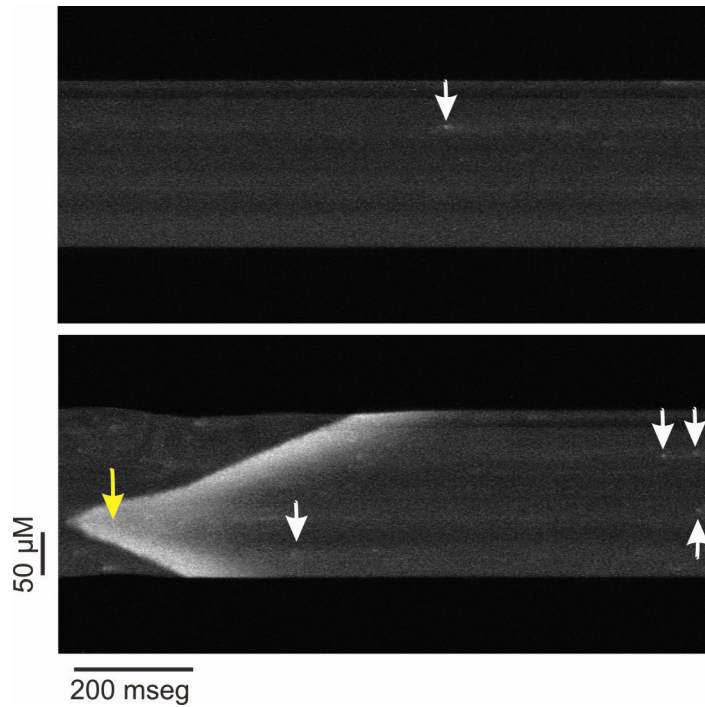
La microscopía confocal ha revelado que el Ca<sup>2+</sup> es liberado del RS en “cuantos” que se denominan “chispas” o en inglés “sparks” (Figura 13). Las “chispas” de Ca<sup>2+</sup> ocurren durante la diástole, a muy baja frecuencia y en ausencia de I<sub>Ca</sub> que las dispare. Pero varios miles de chispas pueden ser sincronizadas por la I<sub>Ca</sub> durante la despolarización y a través de las invaginaciones sarcolemas (túbulos en T), y el Ca<sup>2+</sup> liberado se suma temporal y espacialmente para dar lugar al aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico global (transitorio de Ca<sup>2+</sup>) (Guatimosin et al, 2002). La fuga de Ca<sup>2+</sup> por el retículo sarcoplasmático (RS) resulta en ondas espontáneas de Ca<sup>2+</sup> (“Ca<sup>2+</sup> waves”).

Para estudiar la liberación de Ca<sup>2+</sup> espontáneo por el RS en forma de ondas de Ca<sup>2+</sup> utilizamos un microscopio confocal (Zeiss 410) en el que trabajamos con células cargadas con 10 μM de Fluo-3 durante 10 minutos.

Para obtener la imagen de fluorescencia la célula fue excitada con luz de un láser de argón a 488 nM y la luz emitida en el rango 510-560 nM fue registrada por un fotomultiplicador.

En estos experimentos se realizan un barrido longitudinal de la célula que permite obtener la resolución espacial y temporal de la liberación de Ca<sup>2+</sup> por la célula.

Como se puede observar en la figura 13 esta técnica permite detectar la frecuencia de ondas de Ca<sup>2+</sup>. La ocurrencia de ondas de Ca<sup>2+</sup> se registra durante 60 segundos luego de 1 hora de estimulación a las diferentes frecuencias (0,5, 5 y 8Hz).



**Figura 13:** Medidas confocales de “chispas” de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Las imágenes se obtuvieron realizando un escaneo en línea a lo largo del eje longitudinal del cardiomiocito. Se observan dos escaneos sucesivos en los que no se aplicó un estímulo eléctrico. Se puede observar que en la imagen superior se registra un solo evento espontáneo (flecha blanca), en tanto que la imagen del panel inferior se registran varios eventos espontáneos, “chispas” (flechas blancas), que son provocadas por la liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS y son de menor amplitud que las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (flecha amarilla).

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Para establecer las diferencias significativas entre dos grupos experimentales se utilizó la prueba de T-Student. Para la comparación de más de dos grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas a  $P \leq 0,05$ .



# RESULTADOS

## *\* Inducción de apoptosis y necrosis por marcapaseo rápido (MR)*

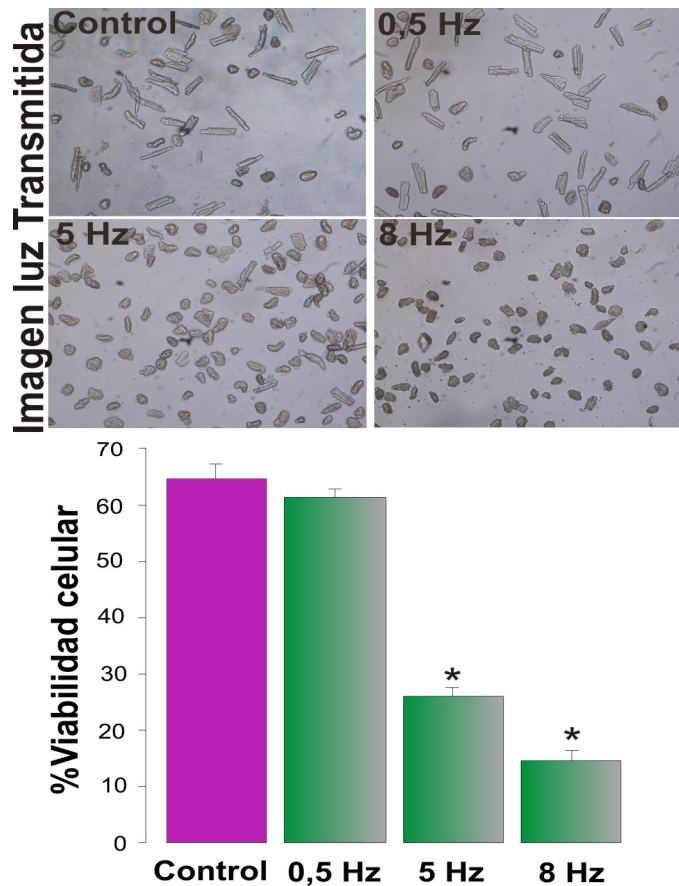
### Viabilidad celular

En una primera etapa nos centramos en caracterizar el efecto del MR (entendiéndose de aquí en adelante que cada vez que se refiere a MR será a altas frecuencias, 5 y 8Hz) sobre la viabilidad celular. En la figura 14 se observan imágenes representativas y resultados promedios de cardiomiocitos aislados, mantenidos durante 1 hora sin marcapasear (Control) o marcapaseados durante 1 hora a 0,5, 5 y 8Hz.

Como se puede observar en las imágenes típicas y en los resultados promedio, marcapasear a los cardiomiocitos a baja frecuencia (0,5Hz) no afecta a la viabilidad celular respecto a la de aquellos mantenidos sin estimular.

En cambio, marcapasear a los cardiomiocitos a alta frecuencia (5 y 8Hz), reduce significativamente la viabilidad celular a un  $25 \pm 3\%$  y  $13 \pm 2\%$ , respectivamente (N= 16  $P < 0,05$ ).

Se obtuvieron resultados similares cuando los cardiomiocitos se cultivaron y mantuvieron marcapaseados durante 24 horas. Por este motivo los siguientes experimentos se realizaron con el protocolo de 1 hora de marcapaseo a baja y alta frecuencia.



**Figura 14:** Imágenes representativas típicas y resultados promedio mostrando que la frecuencia de estimulación alta (5 y 8Hz) reduce la viabilidad celular. \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz y Control sin estímulo eléctrico.

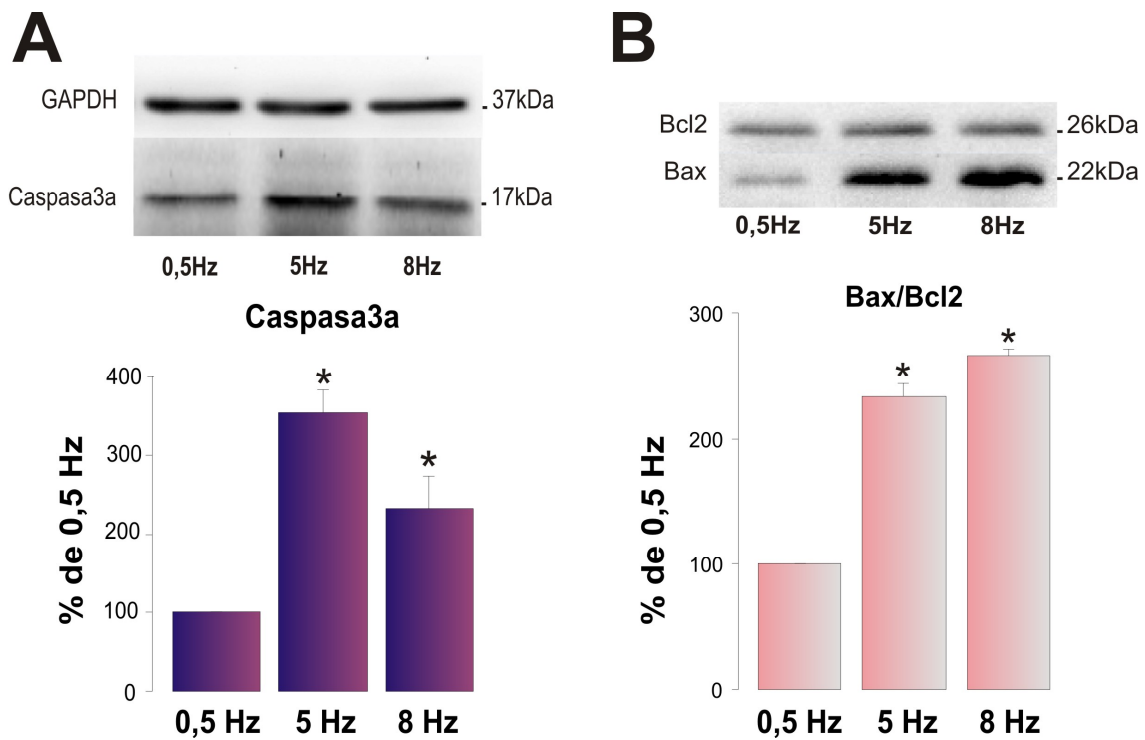
## Apoptosis

Para determinar si la muerte celular inducida por el MR mostrada en la figura 14, era al menos en parte debido a la apoptosis, evaluamos esta vía de muerte celular usando distintos métodos. Dado que la activación de caspasas es un paso crítico en apoptosis, se determinó la actividad de Caspasa3 en las muestras de los corazones de rata Wistar macho de 3 meses, perfundidos con el método de Langendorff y estimulados durante 1 hora a 0,5Hz modelo de baja frecuencia y, a 5 y 8Hz alta frecuencias.

Como se puede observar en la figura 15, el aumento de la frecuencia de estimulación se asocia con un aumento de la actividad de Caspasa3a, indicativo de apoptosis (Figura 15A).

Por otra parte, cuando se midió la relación entre las proteínas proapoptóticas (Bax) y antiapoptóticas (Bcl2) como otro índice de apoptosis, se observó que el cociente Bax/Bcl2 aumentó significativamente al aumentar la frecuencia de estimulación (Figura

15B). Estos resultados confirman que el MR disminuye la viabilidad al menos en parte al promover apoptosis.



**Figura 15:** Western blots típicos y resultados promedios mostrando el efecto del aumento de frecuencia sobre: A) la activación de Caspasa3a y B) la relación de proteínas pro- y antiapoptóticas Bax y Bcl2 (Bax/Bcl2). \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz N= 5 por cada grupo.

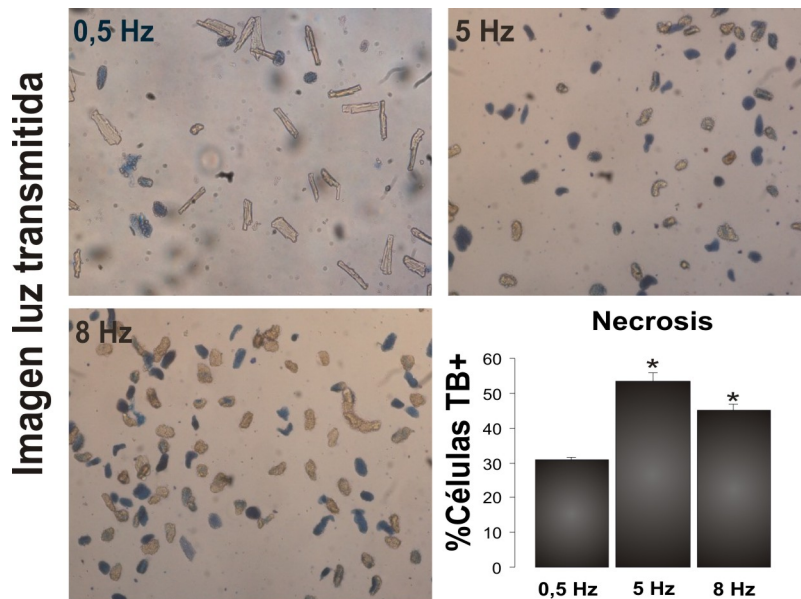
## Necrosis

Por otro lado, también se evaluó en nuestro modelo de MR si la necrosis juega un papel en la muerte celular.

Para ello se utilizó el colorante azul de tripán, considerándose células muertas por necrosis a aquellas que incorporaron el colorante y se observan de color azul.

Como se muestra en la figura 15, a 0,5Hz un  $30 \pm 2\%$  de células son azul de tripán positivas y esta incorporación del colorante aumenta significativamente en las células mantenidas en altas frecuencias,  $54 \pm 3\%$  a 5Hz y  $47 \pm 3\%$  a 8Hz (N= 9  $P < 0,05$ ), respectivamente.

Estos resultados sugieren que la necrosis es también en parte responsable de la muerte celular inducida por MR.

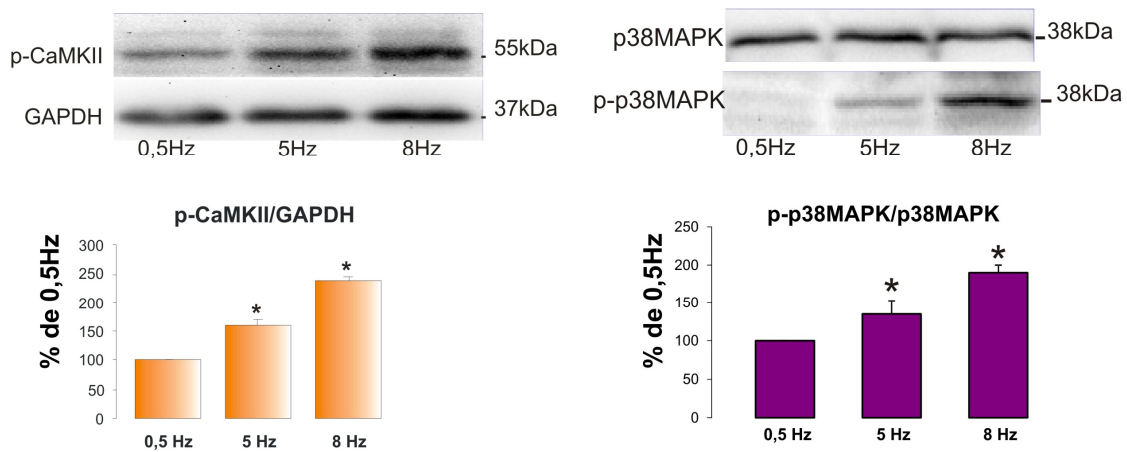


**Figura 16:** Fotos representativas y resultados totales del porcentaje de células positivas al colorante azul de tripán (TB+) indicando que en el MR la necrosis también es responsable de la muerte celular. \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz, N= 9 por cada grupo experimental.

### \* Rol de CaMKII y p38MAPK en la vía apoptótica inducida por MR

#### Actividad de CaMKII y p38MAPK

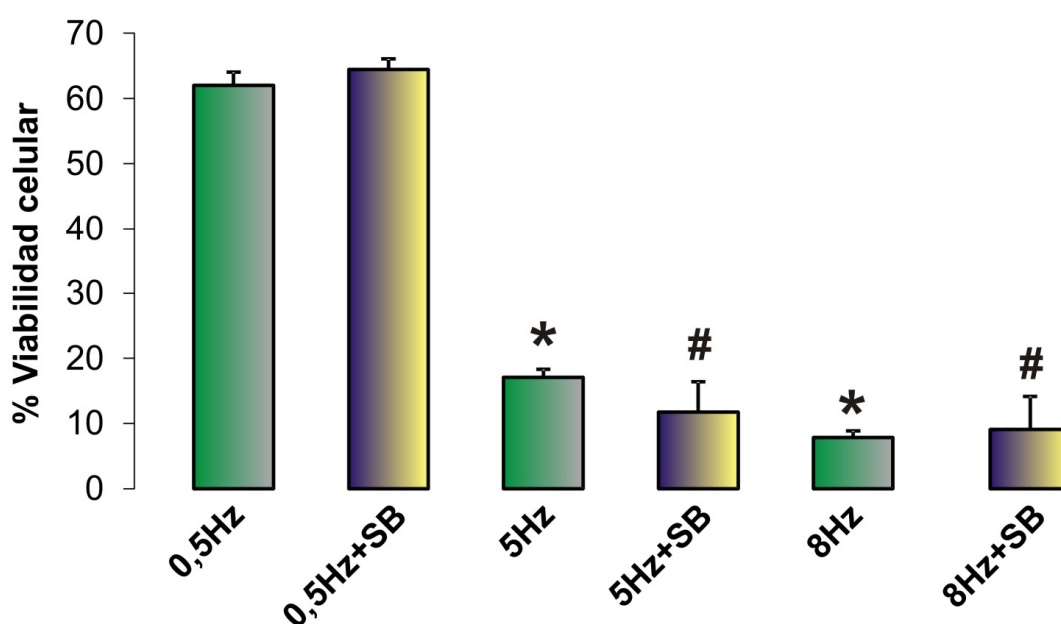
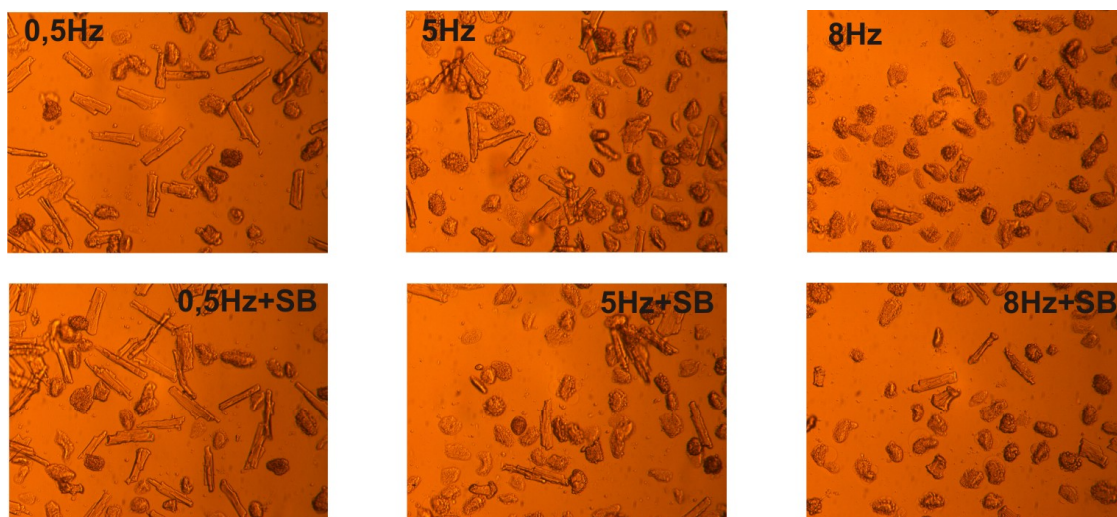
A continuación examinamos si el MR estaba asociado con activación de las quinasas: CaMKII y p38MAPK. En la Figura 17 se observan los ejemplos típicos y los resultados promedios de Western blots en los que evaluamos el efecto del MR sobre la actividad de CaMKII y p38MAPK. Como se puede observar la alta frecuencia (5 y 8Hz) promueve la activación de estas quinasas.



**Figura 17:** Relación de p-CaMKII/GAPDH y p-p38MAPK/p38MAPK, expresado como porcentaje de 0,5Hz, en corazones marcapseados a 0,5, 5 y 8 Hz N=5 para cada grupo, \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz.

### **Efecto de la inhibición de p38MAPK sobre la muerte celular inducida por MR**

Debido a que p38MAPK está vinculada con la muerte por apoptosis en diferentes modelos de injuria cardíaca (Kita y col., 2008; Su y col., 2007; Kuramochi y col., 2006), y que en nuestros resultados la actividad de p38MAPK aumentó significativamente a altas frecuencias (5 y 8Hz) quisimos evaluar el posible rol de p38MAPK en la muerte celular inducida por MR. Para ello utilizamos cardiomiocitos aislados de rata Wistar macho de 3 meses de edad en presencia 10  $\mu$ M del inhibidor de p38MAPK, el SB202190 (SB), y evaluamos viabilidad celular.



**Figura 18:** Imágenes representativas y promedios de viabilidad celular en presencia y ausencia del inhibidor de p38MAPK, SB202190 \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz, #  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz+SB (N= 5 por grupo).

La evaluación de la viabilidad celular de los cardiomiocitos aislados y marcapaseados a las diferentes frecuencias mencionadas anteriormente en presencia y ausencia de SB202190 demostró que la muerte celular inducida por MR no es prevenida al inhibir la p38MAPK (Figura 18).

Estos resultados sugieren que p38MAPK no estaría implicada en la muerte celular inducida por MR.

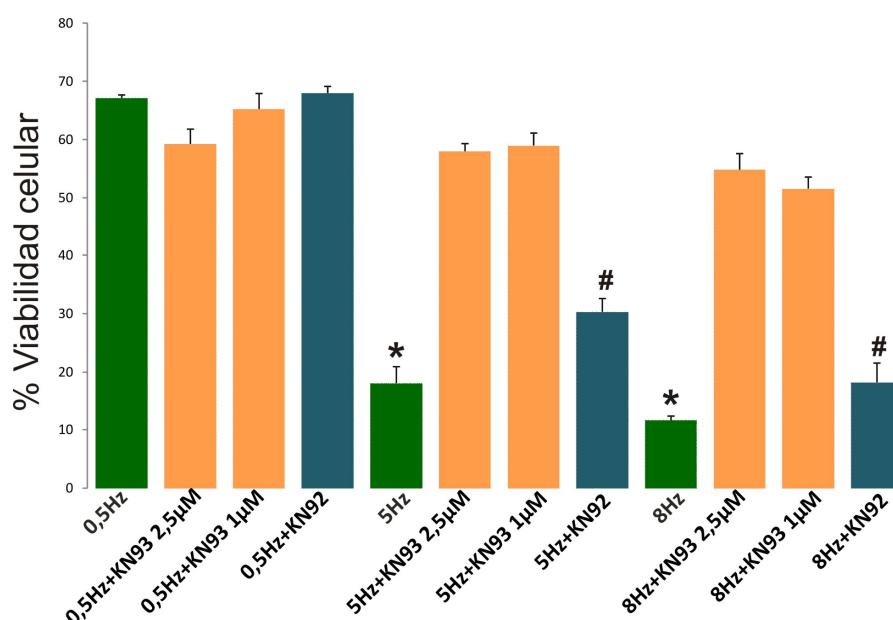
## Efecto de la inhibición de CaMKII sobre la muerte celular inducida por MR

Nuestro laboratorio y otros han demostrado que CaMKII es un intermediario común de la apoptosis inducida por diversas injurias (Palomeque y col., 2009; Zhu y col., 2007; Sapia y col., 2010; Vila Petroff y col., 2007).

Para evaluar el papel de CaMKII en la muerte celular inducida por MR, evaluamos si existe una relación entre la activación de CaMKII y la muerte celular inducida por MR, mediante la utilización de inhibidores farmacológicos de la quinasa, como el KN93 y el péptido inhibidor AIP, un inhibidor estructuralmente distinto del KN93.

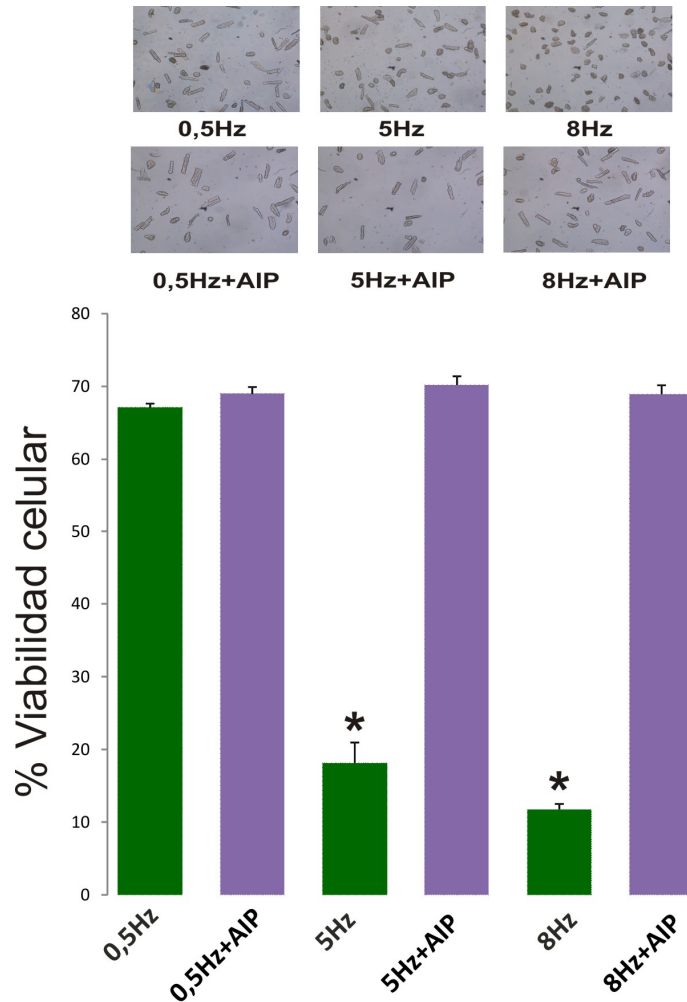
Para descartar efectos inespecíficos del KN93 también evaluamos viabilidad celular a las distintas frecuencias de estimulación en presencia de su análogo inactivo el KN92.

En la figura 19 se presentan los resultados promedio que muestran que los cardiomiocitos aislados preincubados con KN93 y marcapaseados a altas frecuencias durante 1 hora, están protegidos de la muerte celular inducida por MR. Incluso se puede observar que una dosis más baja de KN93 (1  $\mu$ M) también fue capaz de prevenir la muerte celular inducida por MR. Por otro lado, los cardiomiocitos estimulados a alta frecuencia en presencia del KN92 no fueron protegidos de la muerte celular inducida por MR.



**Figura 19:** Resultados promedio que muestran que el KN93 (2,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) inhibidor farmacológico específico de CaMKII previene la muerte celular inducida por MR, en cambio el KN92 (análogo inactivo de KN93) no protegió a las células de la muerte celular inducida por MR. N= 7 por cada grupo \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz; #  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz+KN92.

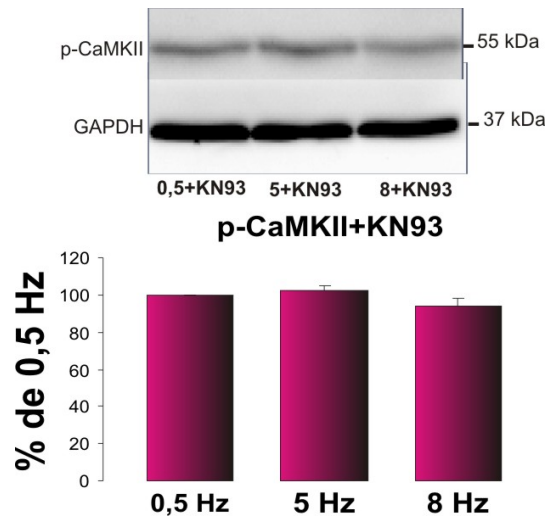
Del mismo modo, como se observa en las imágenes típicas y en los resultados promedios mostrados en la figura 20, el AIP también fue capaz de prevenir la muerte celular inducida por MR.



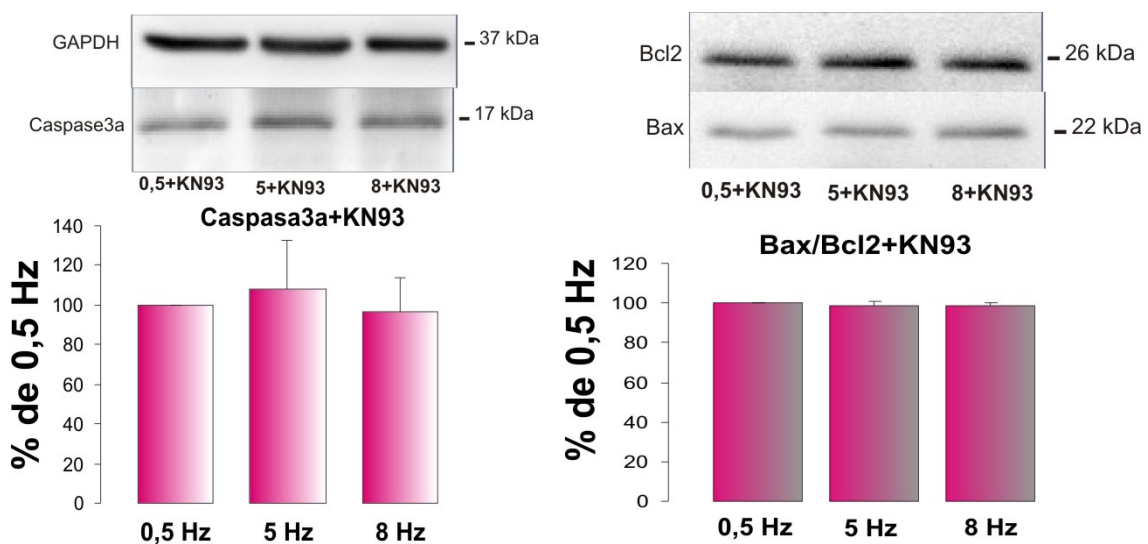
**Figura 20:** Imágenes típicas y resultados promedios mostrando que los cardiomiocitos marcapaseados a las diferentes frecuencias en presencia del inhibidor farmacológico, AIP específico de CaMKII previene la muerte celular inducida por MR. N= 7 por cada grupo \* P < 0,05 con respecto a 0,5Hz; # P < 0,05 con respecto a 0,5Hz+AIP.

Para verificar si CaMKII promueve la muerte celular al inducir la apoptosis durante el MR, evaluamos si su inhibición afecta la relación de las proteínas involucradas en la cascada apoptótica. Las figuras 21 y 22 muestran imágenes representativas y resultados promedio del efecto del KN93 sobre la actividad de CaMKII, Caspasa3a y la relación Bax/Bcl2. Como se puede observar, la presencia del KN93 previene el aumento de la actividad de CaMKII y posee un efecto protector debido a que previene el aumento de los índices apoptóticos inducidos por MR.





**Figura 21:** El KN93 previene el aumento de la actividad de CaMKII inducido por el MR. N= 5 por cada grupo.

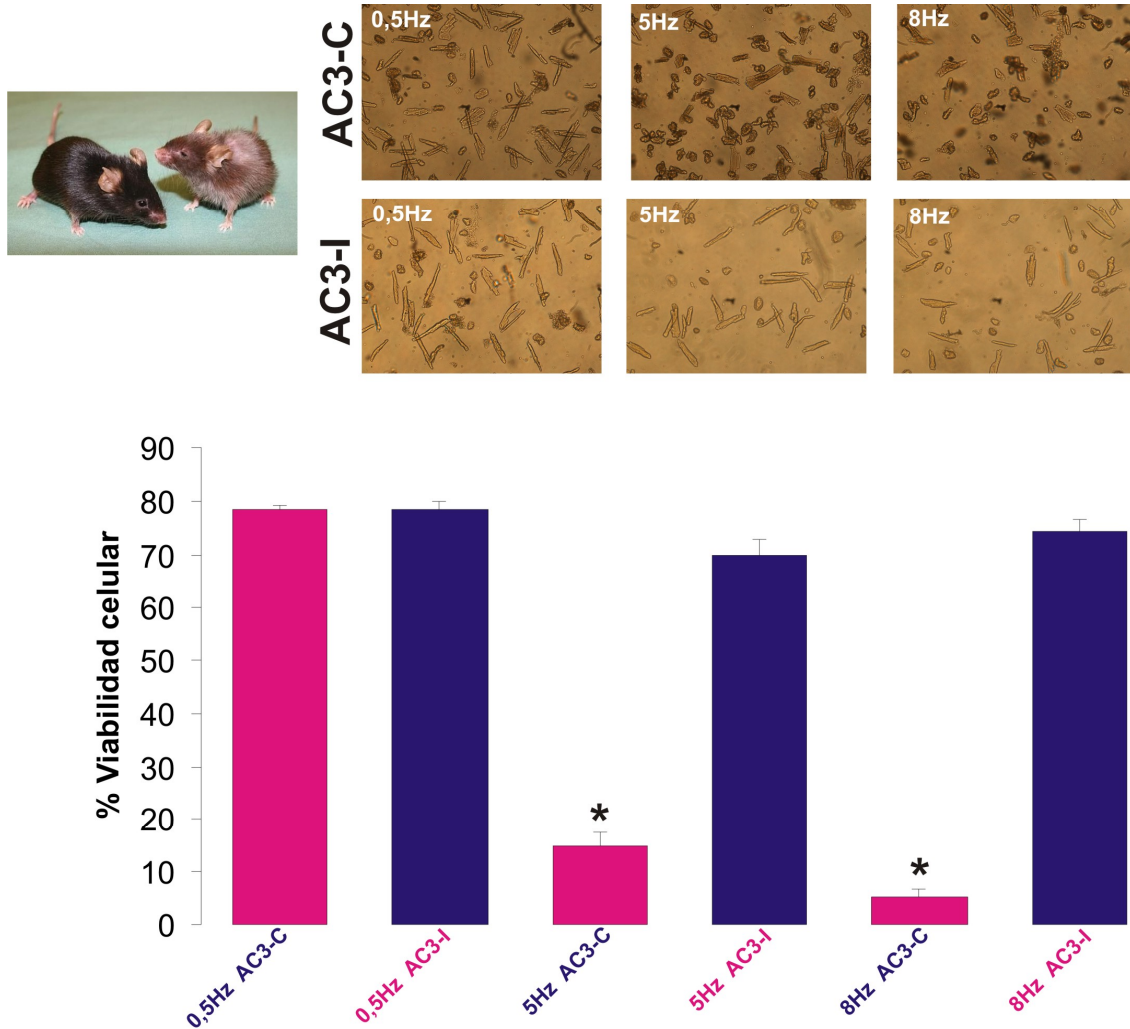


**Figura 22:** Efecto protector del KN93 debido a su capacidad para prevenir la apoptosis inducida al aumentar la frecuencia de estimulación (5 y 8Hz). N=5 por cada grupo experimental.

Para confirmar la participación de CaMKII en la muerte celular inducida por MR por un método no farmacológico se utilizaron cardiomiocitos aislados de ratones transgénicos machos de 3 meses de edad, los AC3-I que expresan un péptido inhibidor para CaMKII y su control negativo el AC3-C que expresan un péptido análogo inactivo.

La figura 23 muestra imágenes representativas y resultados promedios de cardiomiocitos aislados y marcapaseados a las diferentes frecuencias (0,5, 5 y 8Hz). Los

cardiomiocitos de ratones transgénico AC3-I a altas frecuencias de estimulación (5 y 8Hz) estaban protegidos contra los efectos nocivos del MR en comparación a los cardiomiocitos que expresan el péptido de control (AC3-C).



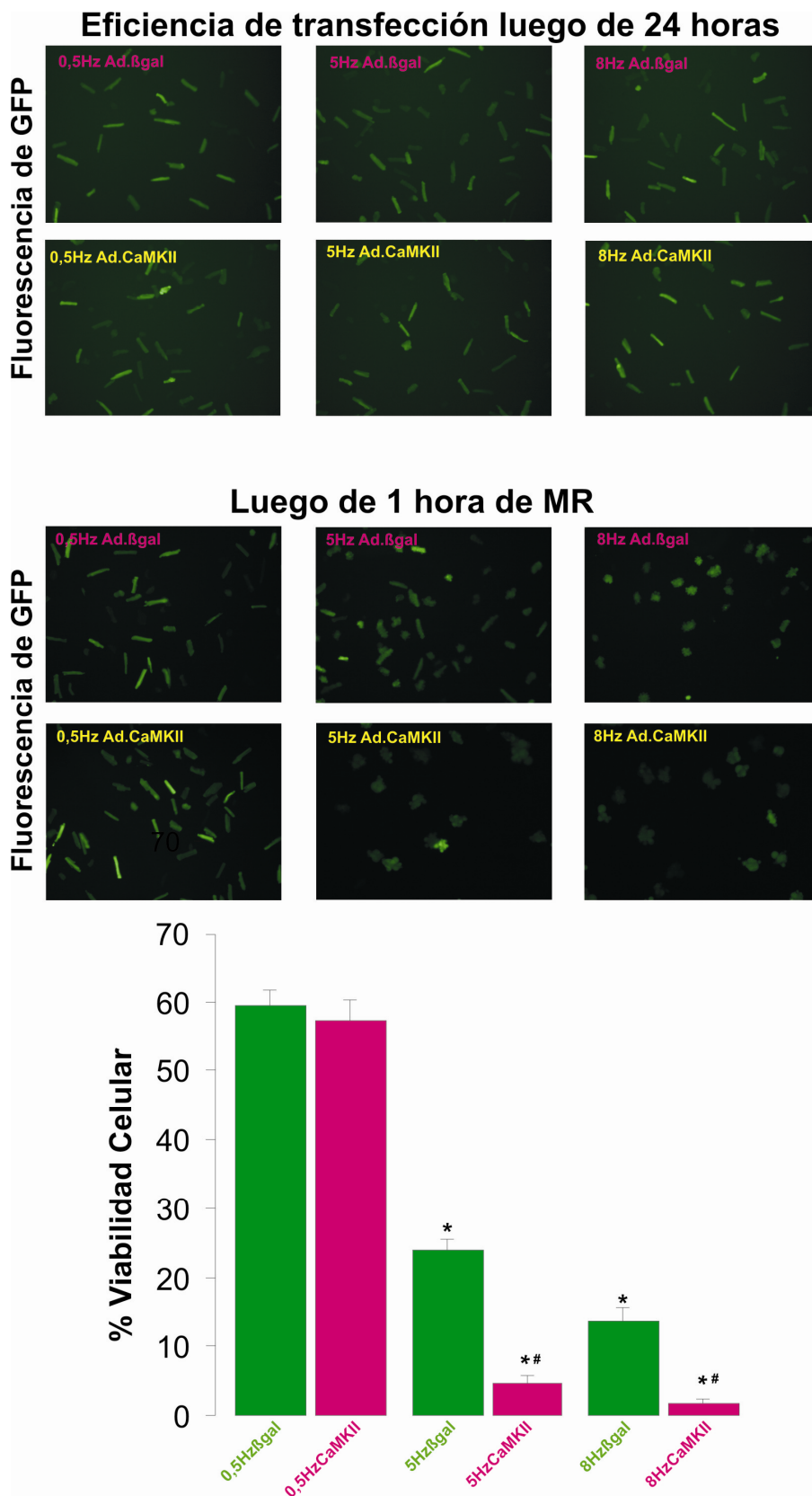
**Figura 23:** Efecto del MR sobre la viabilidad celular en cardiomiocitos aislados de ratones transgénicos AC3-C y AC3-I. Los cardiomiocitos que expresan el péptido inhibidor para CaMKII (AC3-I) fueron protegidos contra los efectos deletéreos del MR a altas frecuencias (5 y 8Hz). N= 7 para cada grupo \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz AC3-C.

Los resultados muestran que la inhibición farmacológica de CaMKII así como la utilización de ratones transgénicos que expresan un péptido inhibidor específico para CaMKII previenen la muerte celular inducida por MR. Sugiriendo que CaMKII está directamente involucrada en la muerte celular inducida por MR.

## ***\*Efecto de la sobreexpresión de CaMKII sobre la muerte celular inducida por MR***

### **La sobreexpresión de CaMKII exacerba la muerte celular por MR**

Para confirmar el rol de la CaMKII en la muerte celular inducida por el MR, se sobreexpresó la CaMKII (Ad.CaMKII) y la  $\beta$ -galactosidasa (Ad. $\beta$ gal) utilizando transferencia génica mediada por adenovirus. Para ello, una vez aislados, los cardiomiocitos de rata Wistar macho de 3 meses fueron cultivados durante 24 horas ya sea en presencia del adenovirus portador del gen CaMKII $_{\delta c}$  y de la proteína fluorescente verde GFP (Ad.CaMKII.GFP) o en presencia del adenovirus portador del gen de la  $\beta$ -galactosidasa también asociado a GFP. Una vez confirmada la sobreexpresión de estas proteínas a través de la visualización de proteína fluorescente verde (GFP), las células Ad.CaMKII y Ad. $\beta$ gal fueron marcapaseadas a diferentes frecuencias (0,5, 5 y 8Hz) durante 1 hora. En condiciones de CaMKII sobreexpresada, el MR a altas frecuencias (5 y 8Hz) indujo un mayor efecto deletéreo. Como se observa en la figura 24, el número de células muertas a altas frecuencias de marcapaseo (5 y 8Hz) fue significativamente mayor en cultivos en los que se sobreexpresó la CaMKII con respecto a aquellas en las que se sobreexpresó la  $\beta$ -galactosidasa, corroborando el rol fundamental de CaMKII en la ruta de señalización hacia la muerte celular inducida por MR.



**Figura 24:** Estrategia de transferencia génica mediada por adenovirus. Fotografías representativas y resultados promedio de cardiomiocitos transfectados con Ad.CaMKII o Ad.βgal. Las fotografías de panel superior muestran la fluorescencia de GFP, que indica la eficiencia de transfección. Las fotografías del panel inferior representan el efecto del MR en la viabilidad celular en cardiomiocitos con sobreexpresión

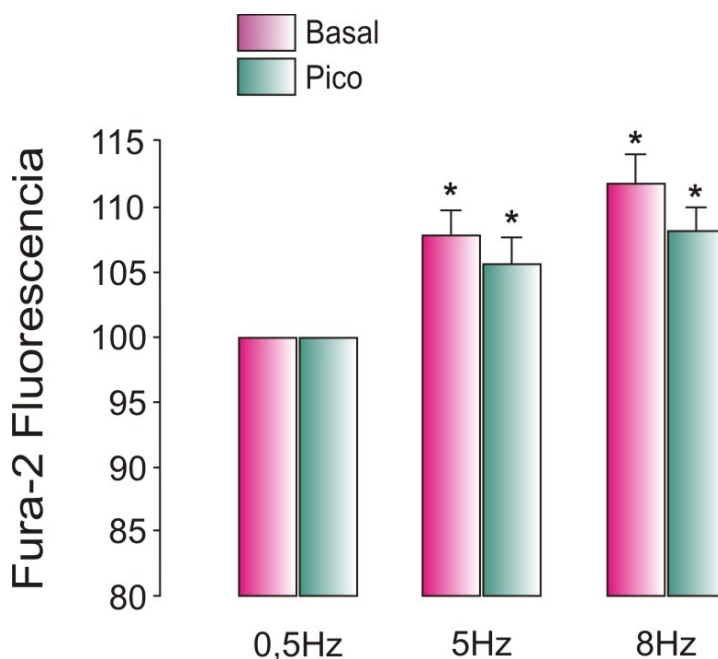
de CaMKII o de  $\beta$ gal. El gráfico de barras muestra los resultados promedio de estos experimentos indicando que las células que sobreexpresaron CaMKII fueron más susceptibles al efecto deletéreo del MR que las células que sobreexpresaron  $\beta$ gal \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz  $\beta$ gal y #  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz en células que sobreexpresan CaMKI,  $N= 7$  por cada grupo.

### **\*Asociación entre aumentos de Ca<sup>2+</sup> intracelular, ROS y actividad de CaMKII inducida por MR**

#### **El MR aumenta el Ca<sup>2+</sup> y la producción de ROS intracelular**

Debido a que CaMKII se activa por aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, y recientemente se ha demostrado que también puede ser modulada por oxidación dependiente de ROS, decidimos medir en cardiomiocitos aislados de rata Wistar macho de 3 meses de edad y marcapaseados a las diferentes frecuencias (0,5, 5 y 8Hz), el Ca<sup>2+</sup> intracelular y la producción de ROS intracelular.

En primer lugar, se evaluó el Ca<sup>2+</sup> intracelular en los cardiomiocitos que fueron cargados con el indicador fluorescente Fura2-AM y estimulados eléctricamente a 0,5, 5 y 8Hz. En la figura 25, se puede observar que el MR aumentó significativamente tanto el Ca<sup>2+</sup> diastólico como el sistólico con respecto a la baja frecuencia de estimulación (0,5Hz).



**Figura 25:** La figura representa los resultados promedio demostrando que el MR aumenta significativamente el Ca<sup>2+</sup> tanto diastólico (barras rosas) como sistólico (barras verdes), en comparación a 0,5Hz.  $N= 5$  \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz,  $N= 6$ .

En segundo lugar, en la figura 26 se observan imágenes representativas del efecto del MR sobre la producción de ROS intracelular evaluado con el indicador fluorescente CM-H2DCFDA. Las imágenes muestran que la alta frecuencia (5Hz) promueve un aumento significativo en la producción de ROS intracelular. Tomados en conjunto, los resultados mostrados en la figura 25 y 26 indican que el MR puede producir los estímulos necesarios para la activación de CaMKII.



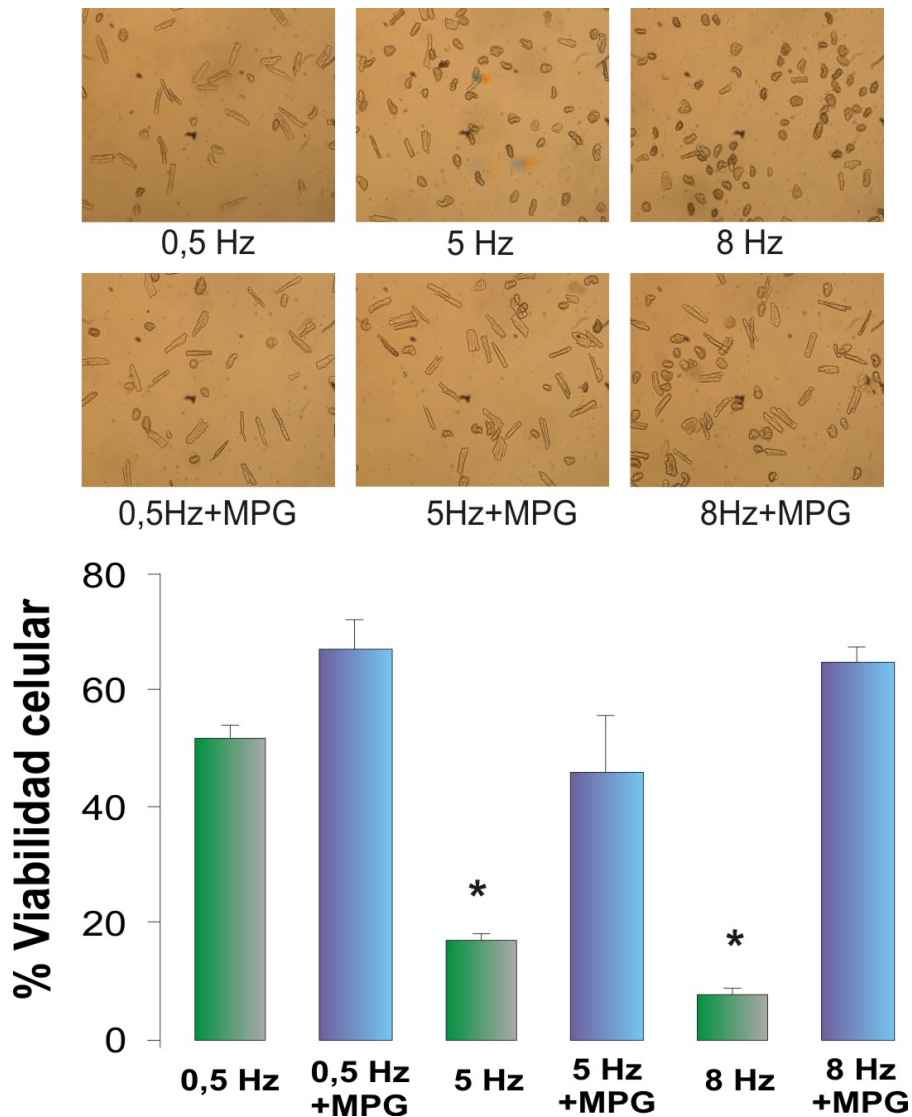
**Figura 26:** Fotos representativas y resultados totales del efecto de la alta frecuencia (solo mostrados a 5Hz) sobre la producción de ROS, evaluado con el indicador fluorescente CM-H2DCFDA. N= 5 \* P < 0,05 con respecto a 0,5Hz.

### Reducir la producción de ROS previene la muerte celular inducida por MR

Dado que nuestros resultados muestran que el MR aumenta la producción de ROS intracelular y que estudios recientes indican que CaMKII puede ser activada por oxidación (Erickson y col., 2008; Palomeque y col., 2009) a continuación examinamos si el aumento de ROS está involucrado en la reducción de la viabilidad inducida por MR.

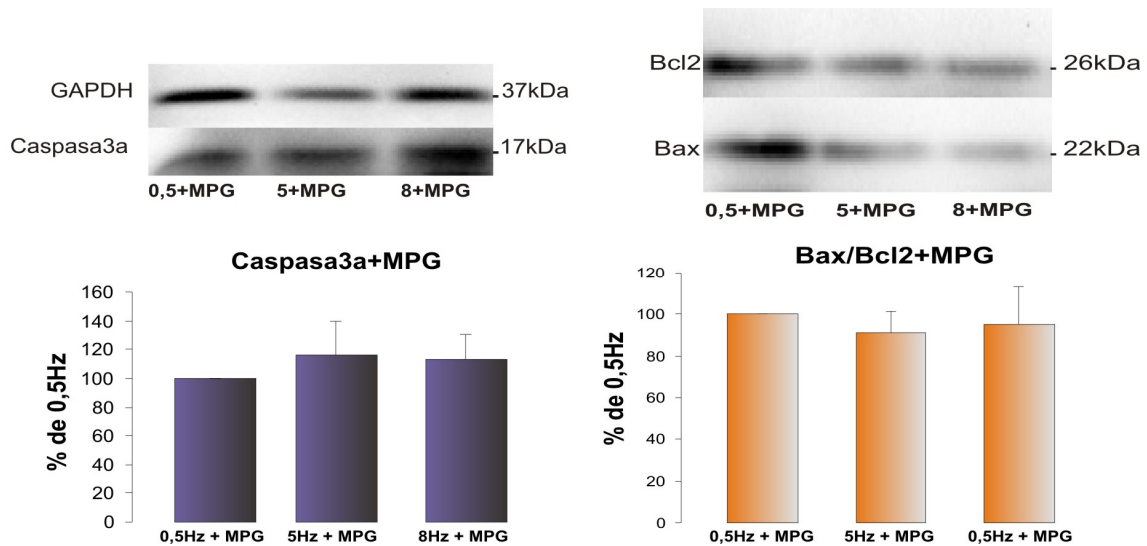
La figura 27 muestra el efecto del MR sobre la viabilidad celular en ausencia y presencia del barrador de ROS, MPG a una concentración de 2 mM.

Como se puede observar, el MPG previno la muerte celular inducida por MR.



**Figura 27:** Fotos representativas y resultados promedio representativas del efecto del MPG a elevadas frecuencias de estimulación. El MPG previene, al menos en parte, la muerte celular inducida por MR. N= 7 \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz.

Consistentemente el MR, en presencia de MPG, no se asocia con un aumento de los índices de apoptosis, Caspasa3a y la relación del cociente Bax/Bcl2 (Figura 28). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la inhibición de la producción de ROS previene la muerte por apoptosis inducida por MR.



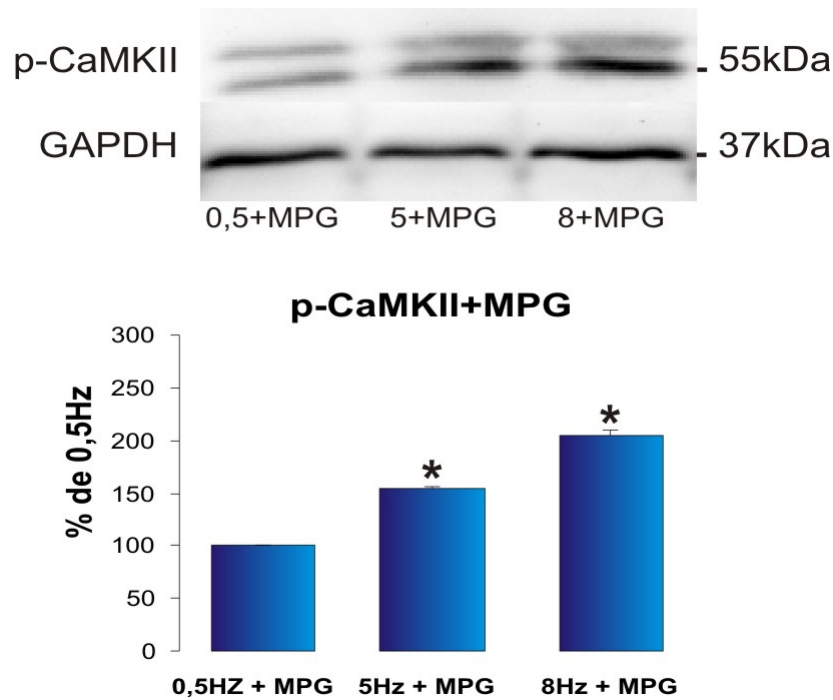
**Figura 28:** Los resultados promedio demuestran que en presencia del eliminador de ROS, MPG no hay diferencias significativas con respecto a la actividad de las proteínas involucradas en la cascada apoptótica. *N= 5 por cada grupo experimental.*

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el MR al aumentar la producción de ROS intracelular, podría conducir en la oxidación y activación de CaMKII que a su vez desencadenaría la cascada apoptótica.

Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, evaluamos si la producción de ROS inducido por MR activa a CaMKII.

Para ello, se evaluó la actividad de CaMKII en presencia del barredor de ROS, MPG.



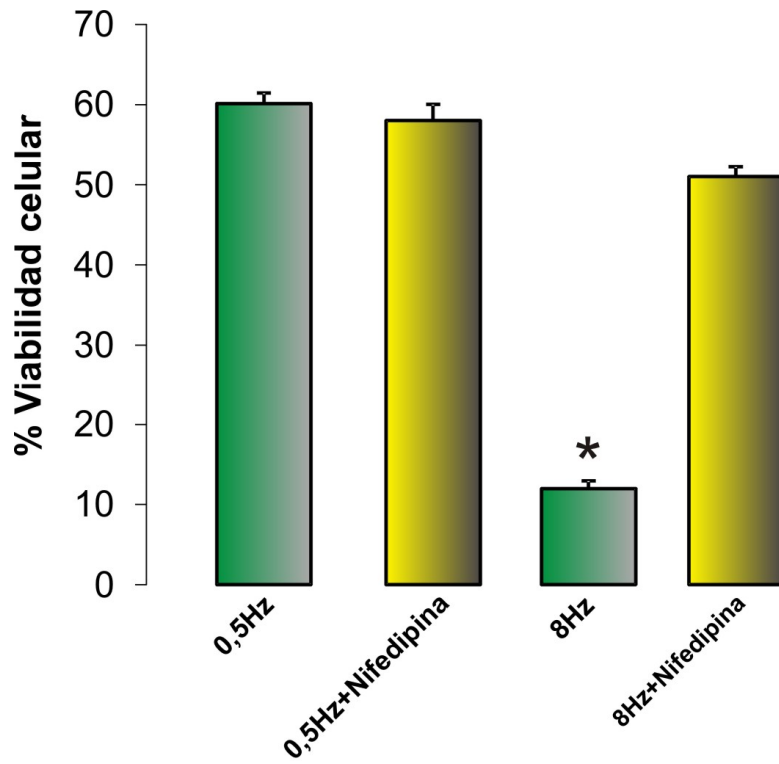


**Figura 29:** Blots representativos y resultados promedio muestran el efecto del MR sobre la actividad de CaMKII en presencia de 2 mM del barredor de ROS, MPG.  $N = 5$  \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz+MPG.

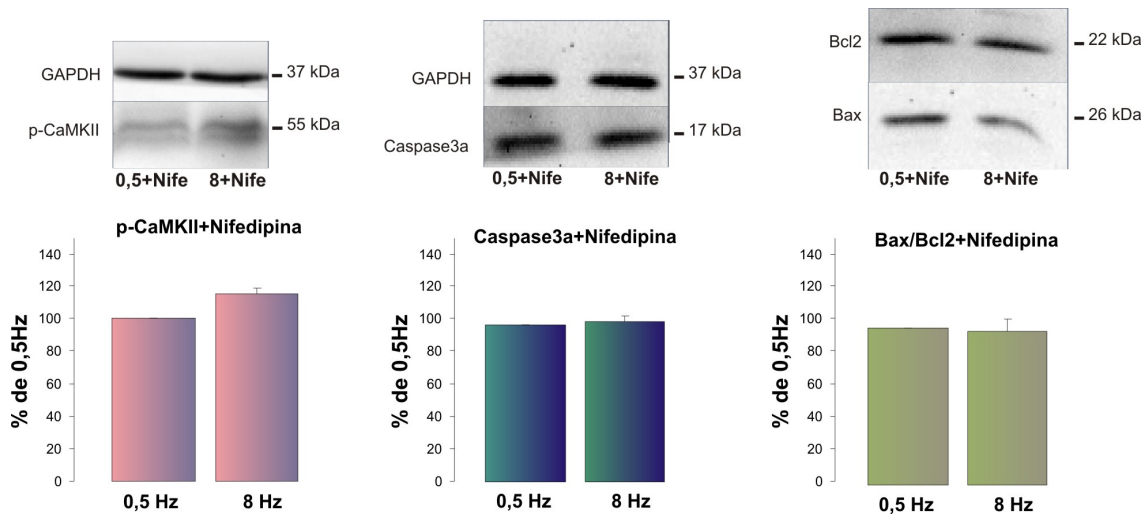
La figura 29 muestra bandas típicas y resultados promedios que indican que la activación de CaMKII inducida por MR se mantiene en presencia del barredor de ROS, MPG. Estos resultados indican que el aumento de ROS inducido por MR no se requeriría para la activación de CaMKII.

Descartada la activación de CaMKII por oxidación decidimos realizar experimentos para confirmar si la activación de CaMKII durante el MR se debía a su modo de activación clásica, un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular. Para ello y teniendo en cuenta que al aumentar la frecuencia de estimulación aumenta el ingreso de  $Ca^{2+}$  a la célula a través de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, examinamos el efecto del bloqueo de los canales tipo L con 100 nM de Nifedipina sobre reducción de la viabilidad celular, la activación de CaMKII y el aumento de los índices apoptóticos inducidos por MR.

La figura 30 nos muestra que la presencia de Nifedipina en cardiomiocitos aislados y marcapaseados a las diferentes frecuencias previene la muerte celular inducida por la alta frecuencia (8Hz), por otro lado, en la figura 31 se observa que en corazones perfundidos y marcapaseados a las diferentes frecuencias en presencia de Nifedipina a una concentración 1  $\mu$ M, tanto la actividad de CaMKII como de las proteínas involucradas en la cascada apoptótica (Caspasa3a y la relación Bax/Bcl2) no presentan diferencias significativas entre la baja frecuencia 0,5Hz con respecto a la alta frecuencia 8Hz.



**Figura 30:** Efecto de la inhibición de Ca<sup>2+</sup> sobre la viabilidad celular luego de un aumento en la frecuencia de estimulación. N=5 \* P < 0,05 con respecto a 0,5Hz.



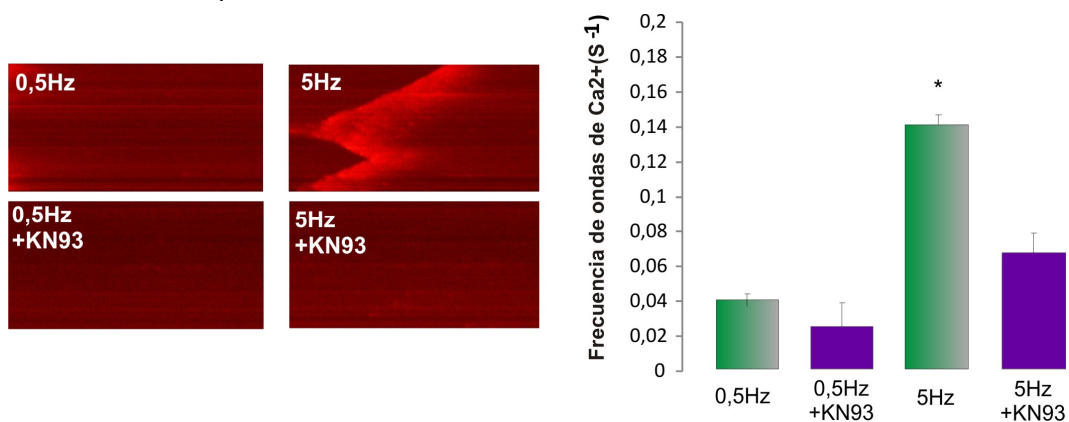
**Figura 31:** Resultados promedios muestran que no hay diferencias significativas en la actividad de CaMKII y de las proteínas involucradas en la cascada apoptótica (Caspasa3a y la relación Bax/Bcl2) en presencia de Nifedipina a baja frecuencia 0,5Hz con respecto a alta frecuencia 8Hz N= 5 por cada grupo.

Estos resultados sugieren que la activación de CaMKII durante el MR es mediada por un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

## Mecanismos dependientes de CaMKII involucrados en la muerte celular inducida por MR

En los cardiomiocitos los receptores de rianodina tipo 2 (**RyR2**) son cruciales para el manejo fisiológico del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Sin embargo, nuestro y otros laboratorios han demostrado recientemente que el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  alterado y la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del RyR2 pueden ser determinantes en la apoptosis de los cardiomiocitos en diferentes condiciones patológicas (George y col., 2007; Zhang y col., 2010; Salas y col., 2010). La pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS a través del RyR puede propagarse y resultar en una liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS denominada onda de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  “wave”). Estas ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden conducir a la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis o necrosis, ya que se ha descrito que el  $\text{Ca}^{2+}$  perdido del RS podría ingresar a la mitocondria, sobrecargándola de  $\text{Ca}^{2+}$  y gatillando así la cascada apoptótica (Salas y col., 2010; Di Carlo y col., 2014).

Para examinar si un mecanismo similar de inducción de apoptosis podría estar mediando la muerte celular inducida por MR, utilizamos microscopía confocal para obtener imágenes de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  indicadoras de la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. (Curran y col., 2010). Luego de marcapasear a los cardiomiocitos de ratas a 0,5Hz (baja frecuencia) y 5Hz (alta frecuencia), se detuvo la estimulación y se midió las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  durante 60 segundos. La figura 32 muestra imágenes representativas de fluorescencia y resultados promedio indicando que la frecuencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta al aumentar el MR. Por otro lado, se muestra además que el aumento de la frecuencia de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por MR puede ser prevenido en presencia del inhibidor de CaMKII, KN93, lo que indica que estos eventos dependen de la activación de esta quinasa.



**Figura 32:** Imágenes típicas de microscopía confocal de la línea de escaneo y resultados promedios a la derecha, muestran que el MR aumenta significativamente la frecuencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  a altas frecuencias (5Hz) y que este efecto se inhibe en presencia de KN93. \*  $P < 0,05$   $N = 5$ .

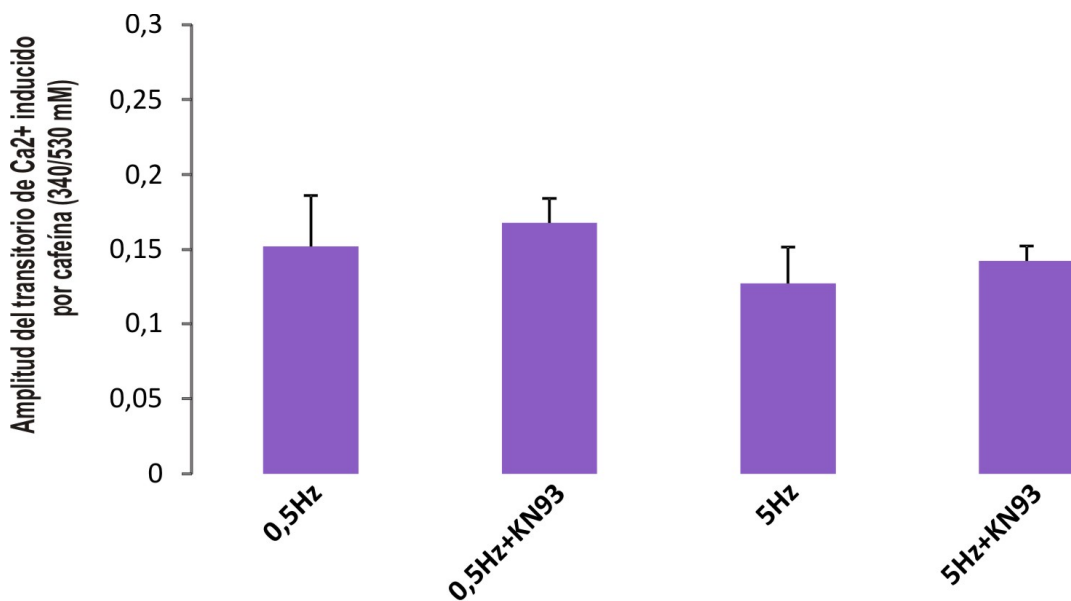
Al menos dos factores pueden aumentar la posibilidad de ocurrencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , 1) un aumento de la carga del RS y 2) un aumento en la probabilidad de apertura del RyR2.

Es conocido que CaMKII puede influir sobre ambos factores dado que puede fosforilar tanto a PLB (fosfolambam) como a los RyR2. Es importante aclarar que la velocidad a la que SERCA2a ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico), secuestra  $\text{Ca}^{2+}$  activamente desde el citosol hacia el RS es controlada por PLB, SERCA2a es normalmente inhibida por PLB, pero cuando PLB se fosforila aumenta el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el RS.

Teniendo en cuenta estas posibilidades, evaluamos si CaMKII promueve el aumento de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por MR por aumentar la carga del RS, por aumentar la probabilidad de apertura del RyR o por ambos mecanismos.

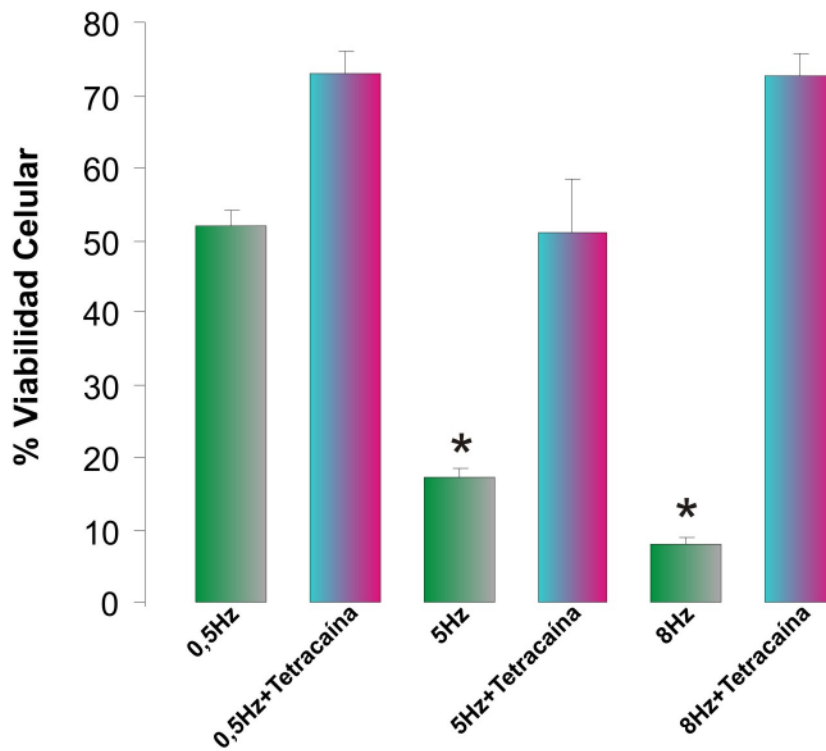
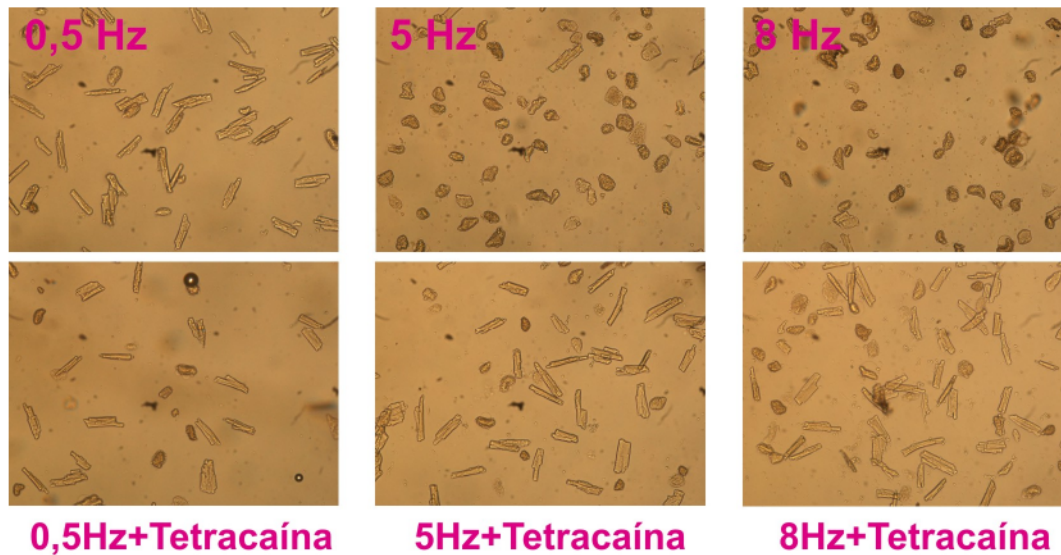
Para evaluar el efecto de CaMKII sobre el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS examinamos la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por cafeína. La cafeína en altas concentraciones (15 mM o más) provoca la liberación de todo el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS y su aplicación es una técnica de uso habitual para estimar el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Bers 2001; Gonano y col., 2011).

Consistentemente con otros estudios (Bers y col., 1996) como se puede observar en la figura 33 aumentar la frecuencia de estimulación de 0,5Hz a 5Hz en presencia y ausencia del inhibidor de CaMKII, KN93 no afecta la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por cafeína indicando que en cardiomiocitos de rata, el MR no aumenta el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS.



**Figura 33:** Resultados promedios muestran que no hay diferencias significativas en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS a alta frecuencia de estimulación (5Hz) en presencia y ausencia del inhibidor KN93, N= 5.

Estos resultados sugieren que el aumento de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por MR y dependiente de CaMKII sería entonces debido a un aumento en la probabilidad de apertura del RyR2 inducido por CaMKII. Para confirmar si los RyR2 están involucrados en la muerte celular inducida por MR examinamos si la estabilización farmacológica de los RyR2 reduce la muerte celular inducida por la alta frecuencia. Para estabilizar a los RyR2 usamos una baja concentración del anestésico local, Tetracaína, que reduce la probabilidad de apertura de este canal (Venetucci y col., 2006). La figura 34 muestra que la incubación con 25  $\mu\text{M}$  de Tetracaína previene la muerte celular inducida por MR. Estos resultados indican que los RyR2, posiblemente a través del aumento en la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, estarían funcionalmente implicados en la muerte celular inducida por MR.

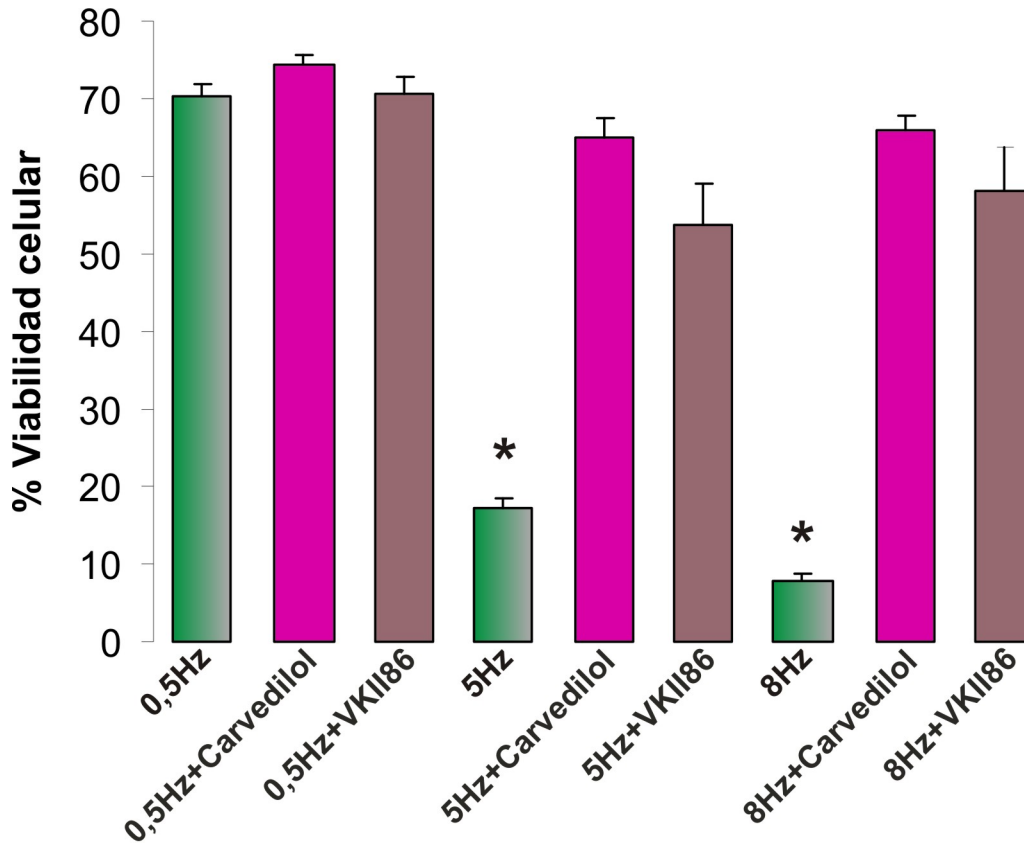


**Figura 34:** Imágenes representativas mostrando que la Tetracaína previene la muerte celular inducida por MR. N= 7 por cada grupo\* P < 0,05 con respecto a 0,5 Hz.

Para confirmar los resultados obtenidos con Tetracaína, utilizamos otros dos compuestos conocidos por modular la probabilidad de apertura del RyR2, el  $\beta$ -bloqueante, Carvedilol y su análogo, VKI186, que presenta un mínimo efecto  $\beta$ -bloqueante (Zhou y col., 2011).

En la figura 35 se observan los resultados promedio del tratamiento con los

estabilizadores del RyR2, Carvedilol y VKI186. Como se puede observar, ambos compuestos previenen la muerte celular inducida por MR. Estos resultados confirman que los RyR2 están funcionalmente involucrados en la muerte celular inducida por MR.



**Figura 35:** Los resultados promedio muestran que la muerte celular inducida por MR se puede prevenir mediante los estabilizadores del RyR2, Carvedilol (1  $\mu$ M) o su análogo VKI186 (1  $\mu$ M) N= 8 por cada grupo \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5 Hz.

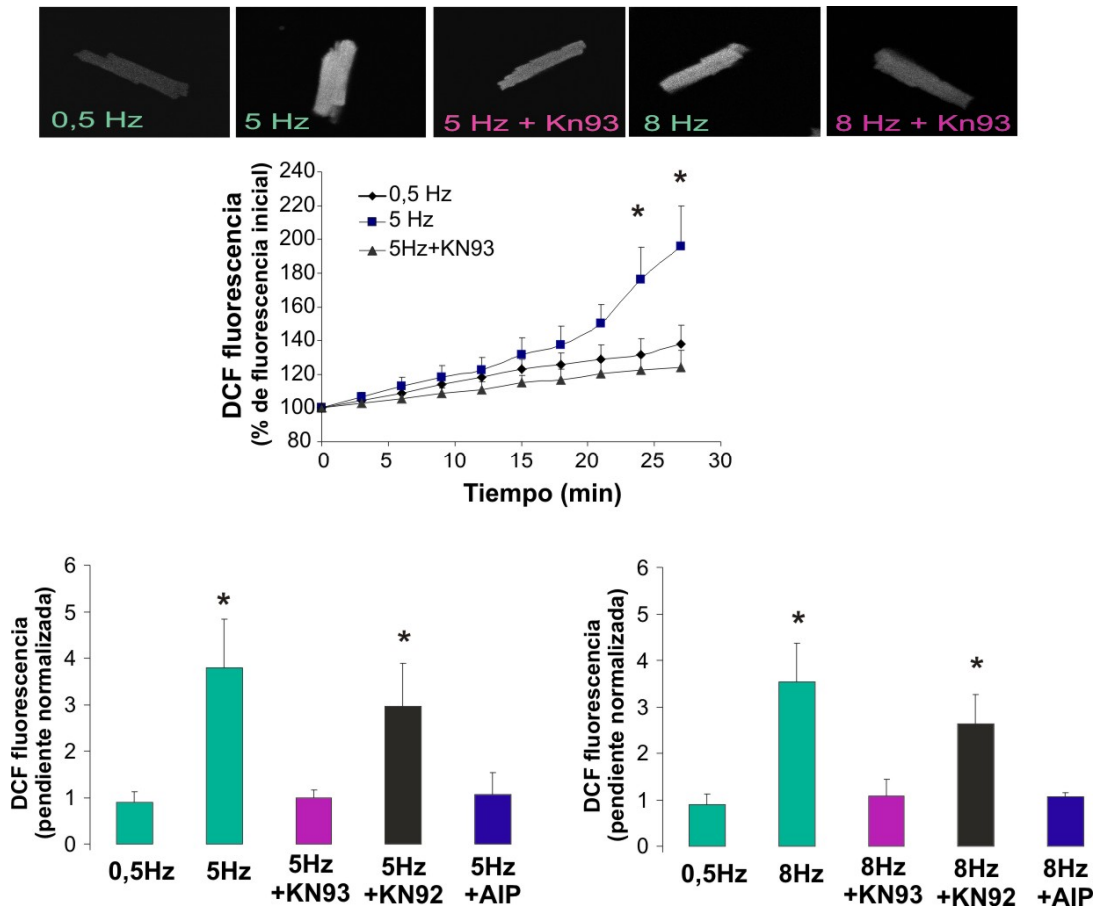
### La producción de ROS inducida por MR depende de CaMKII

Tomados en conjunto, los resultados hasta aquí mostrados indican que el MR reduce la viabilidad celular por un mecanismo que requiere a CaMKII, ROS y los RyR2.

Los resultados mostrados en la figura 29 indican que las ROS no se requieren para la activación de CaMKII de modo que su producción debe ser dependiente de CaMKII o producirse por una vía independiente de esta quinasa. Para disecar entre estas dos posibilidades, realizamos experimentos midiendo la producción de ROS inducida por MR en presencia y ausencia de KN93, KN92 y AIP.

Como se observa en las imágenes de fluorescencia típicas y los resultados promedio

presentado en la figura 36, el MR aumenta la producción de ROS y este aumento es prevenido por el inhibidor de CaMKII, KN93. Por otro lado, el MR no logró aumentar la producción de ROS en presencia del inhibidor más específico de CaMKII, el AIP. En cambio, el MR aumentó significativamente la producción de ROS en presencia del análogo inactivo del KN93, KN92. Paralelamente, se realizaron experimentos en cardiomiocitos aislados de ratones transgénicos AC3-I en los que se midió la producción de ROS inducida por MR a las diferentes frecuencias de estimulación. Se observó que los cardiomiocitos de los ratones transgénicos controles AC3-C a 5 Hz tuvieron un aumento de fluorescencia del  $131 \pm 3\%$  (N= 4) versus un  $97 \pm 10\%$  en los AC3-I (N= 4); estos resultados sugieren que la activación de CaMKII es necesaria para la producción de ROS inducida por MR.



**Figura 36:** Imágenes representativas de fluorescencia (CM-H2DCFDA fluorescencia) que muestran el efecto del MR sobre la producción de ROS en ausencia y en presencia de  $2,5 \mu\text{M}$  KN93. Los resultados promedios muestran el curso del tiempo de la producción de ROS inducido por MR en ausencia y presencia de KN93 y la pendiente normalizada CM-H2DCFDA (la pendiente de aumento de fluorescencia registrada durante el período en el que la célula es marcapaseada a 5 u 8 Hz es normalizado con respecto a la pendiente de aumento de fluorescencia registrado durante el marcapaseo a 0,5 Hz) en ausencia y presencia de KN93, KN92 (N= 7) y AIP (N= 6). KN93 y AIP redujeron significativamente el aumento de CM-



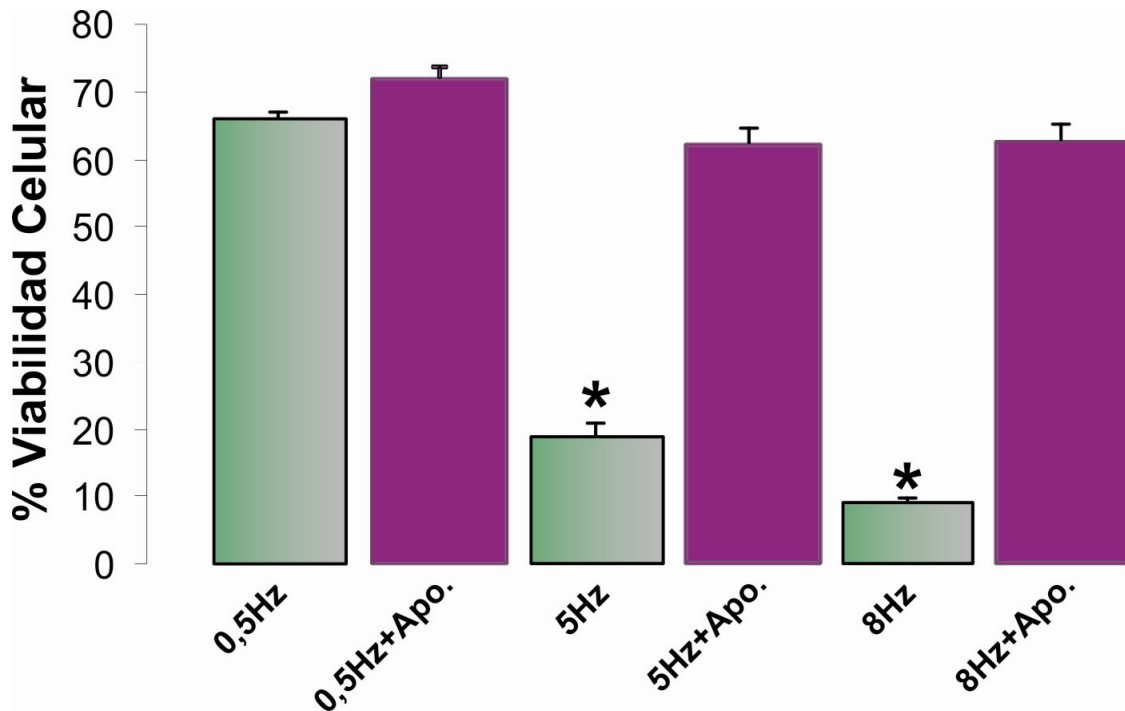
*H2DCFDA fluorescencia a 5 y 8 Hz mientras que la producción de ROS aumentó significativamente a 5 y 8 Hz en presencia de KN92. \* P < 0,05 con respecto a 5Hz+KN93 y 5Hz+AIP N= 7, \* P < 0,05 con respecto a 8Hz+KN93 y 8Hz+AIP N= 7; \* P < 0,05 con respecto a 5Hz+KN93 y 5Hz+AIP N= 7, \* P < 0,05 con respecto a 8Hz+KN93 y 8Hz+AIP N= 7.*

En virtud de que el resultado de que CaMKII promueve la producción de ROS es sumamente interesante y novedoso, a continuación decidimos explorar el mecanismo por el cual CaMKII podría promover la producción de ROS.

### **Rol de la producción de ROS inducida por MR**

Consistentemente con nuestros resultados, otros estudios han mostrado un aumento de la producción de ROS inducida por MR (Heinzel y col., 2006; Yamamoto y col., 2006). Sin embargo, la fuente de ROS todavía no está completamente definida. Varias líneas de evidencia han relacionado la producción de ROS inducida por MR con la activación de la NADPH oxidasa (NADPHox) (Sánchez y col., 2005) y resultados recientes indican que CaMKII puede activar varias isoformas de esta oxidasa (Pandey y col., 2011; Nishio y col., 2012).

Por lo tanto, para determinar el posible origen de ROS, decidimos realizar experimentos en cardiomiocitos aislados de rata Wistar macho de 3 meses de edad y marcapaseados a las diferentes frecuencias (0,5, 5 y 8Hz) en presencia del inhibidor de la NADPHox de membrana, Apocinina a una concentración de 300  $\mu$ M. Dado que nuestros resultados muestran que la muerte celular inducida por MR es dependiente de un aumento en la producción de ROS (Figura 29), usaremos la disminución de la viabilidad celular como un sensor biológico de la producción de ROS. Como se puede observar en la figura 37 la presencia de Apocinina previene la muerte celular en cardiomiocitos aislados inducida por MR.



**Figura 37:** Gráficos promedios y representativos del efecto de la Apocinina. La presencia del inhibidor de NADHPox previene la muerte celular en cardiomiocitos aislados y marcapaseados a altas frecuencias (5 y 8Hz). N= 5 por cada grupo \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz.

Estos resultados sugieren que las ROS producidos en nuestro modelo de MR podrían provenir, al menos en parte de la activación CaMKII-dependiente de la NADPHox.

### **Mecanismos involucrados en la modulación de los RyR2 por MR**

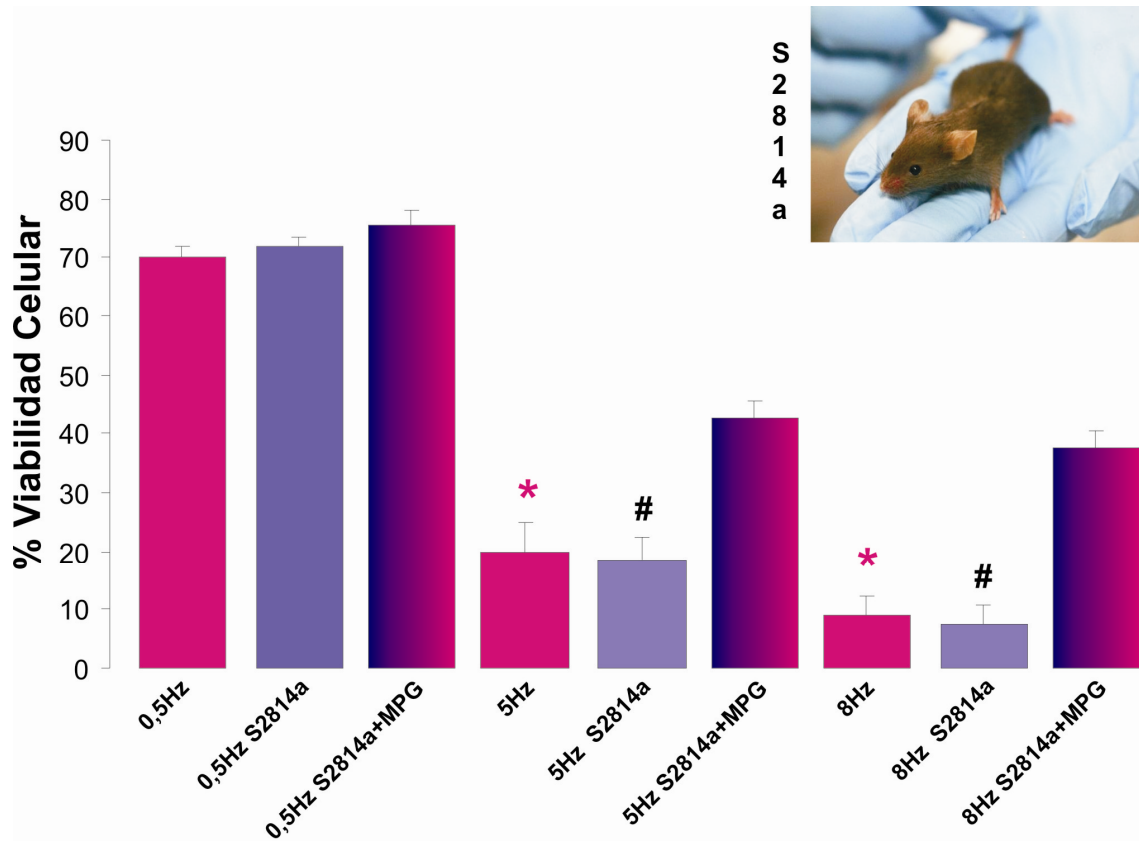
Dado que la función del RyR2 se puede modular al menos en parte, por modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación y/o la oxidación y que CaMKII podría favorecer ambas modificaciones ya sea, a través de su fosforilación en el sitio Ser2814 o a través de un aumento en la producción de ROS. Examinamos el rol de estas modificaciones en el contexto de MR. Para examinar el rol de la fosforilación del RyR2 usamos cardiomiocitos de ratones mutantes que tienen el sitio de fosforilación serina 2814 del RyR2 (específico de CaMKII) mutado a alanina (S2814a) y por lo tanto no fosforilable.

En la figura 38 se observa que el MR produce una disminución en la viabilidad celular similar en cardiomiocitos de ratones mutantes (S2814a) y en cardiomiocitos aislados de ratones silvestres, indicando que la fosforilación del RyR2 en el sitio específico de

CaMKII, Ser2814, no estaría involucrado en la muerte celular inducida por MR.

Por otra parte, la figura 38 también muestra que los cardiomiocitos aislados de ratones S2814a pre-tratados con el barredor de ROS, MPG están protegidos de la muerte celular inducida por MR.

Estos resultados sugieren que sería la oxidación y no la fosforilación del RyR2 que estaría modulando la actividad del receptor que resultaría en el aumento en las ondas de Ca<sup>2+</sup> asociadas con la muerte celular inducida por MR.

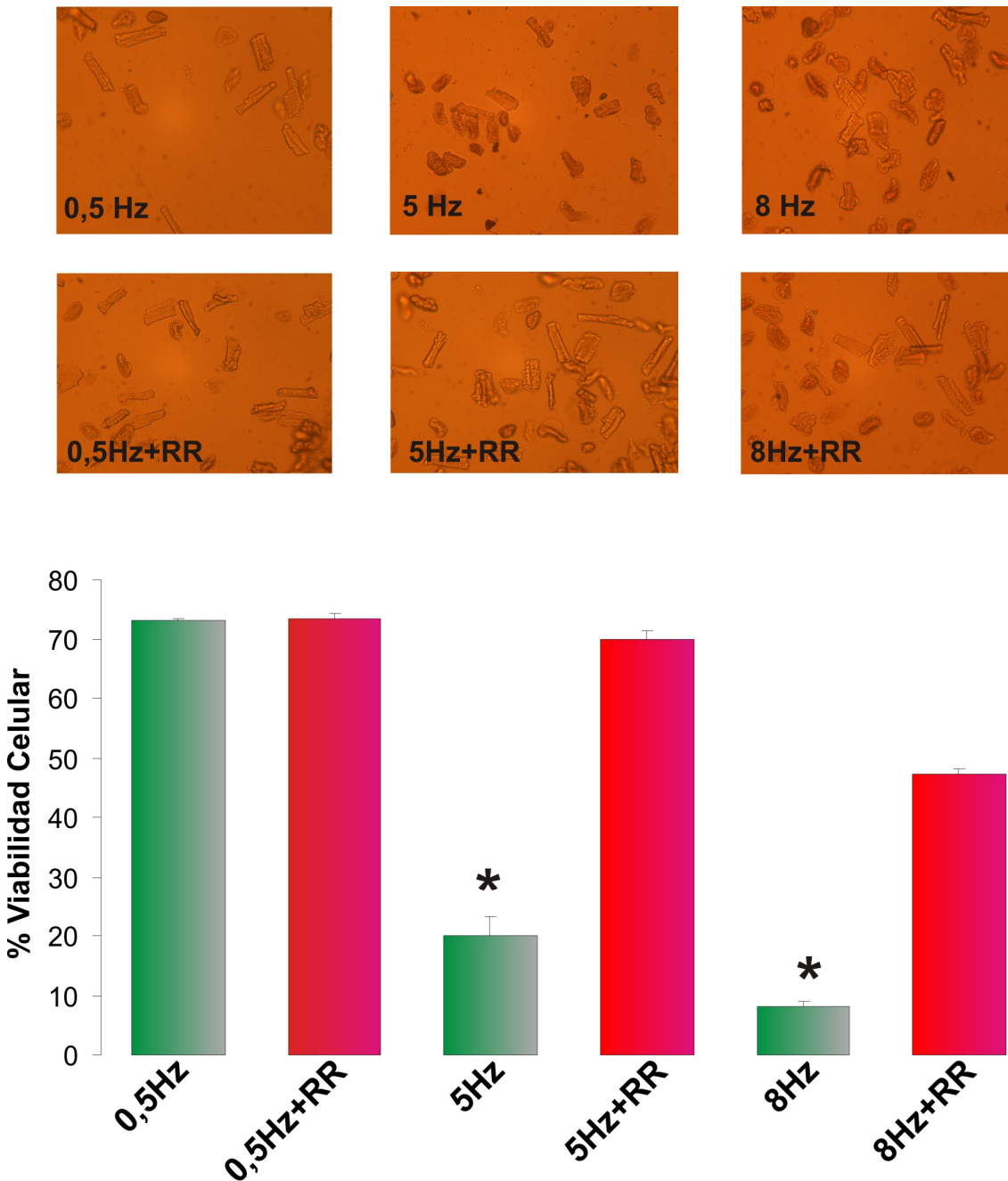


**Figura 38:** Efecto del MR sobre la viabilidad celular en cardiomiocitos aislados con el sitio de fosforilación de RyR2, Serina 2814, mutado a Alanina (S2814a). El MR reduce significativamente la viabilidad de los cardiomiocitos S2814a del mismo modo que en su control silvestre la muerte celular sin embargo, se previno, al menos en parte, en presencia del barredor de ROS, MPG N= 6 para cada grupo \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5 Hz, #  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz S2814a+MPG.

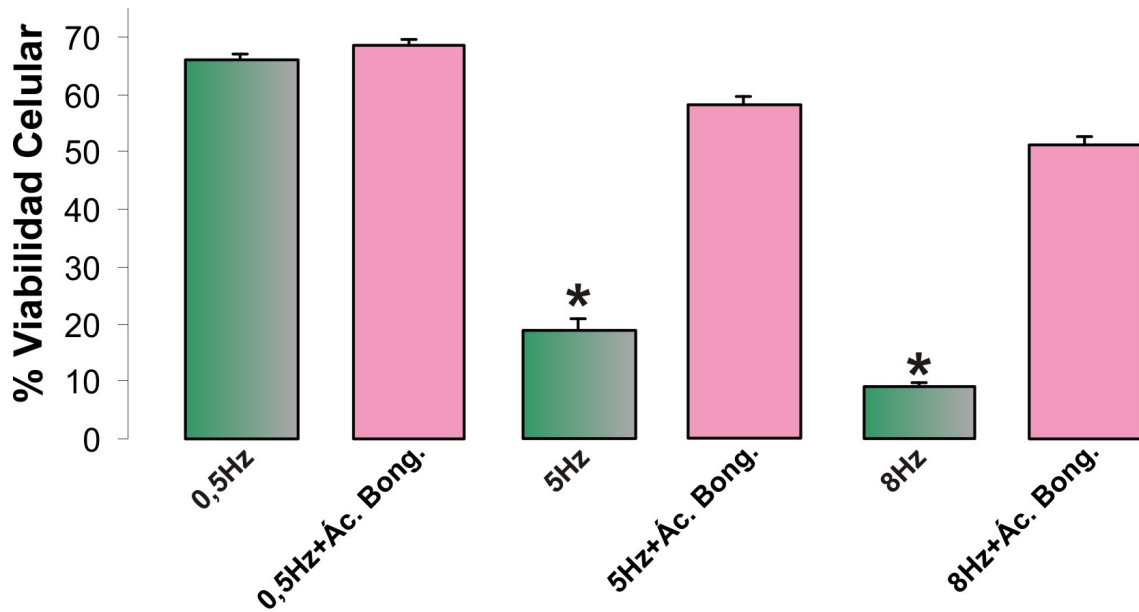
### Rol de la mitocondria en la muerte celular inducida por MR

Para examinar si el mecanismo que subyace a la muerte celular inducida por MR es debido a que la liberación espontánea de Ca<sup>2+</sup> del RS en forma de ondas de Ca<sup>2+</sup>

promueve la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> de la mitocondria, resultando en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y en consecuencia la activación de la cascada apoptótica, inhibimos la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria a través del uniporter mitocondrial usando 5 µM de Ruthenium Red e inhibimos la apertura del mPTP usando 10 µM de ácido bongkrecico como se puede observar en las figuras 39 y 40, ambos inhibidores previnieron la muerte celular inducida por MR.



**Figura 39:** Fotos representativas y gráficos promedio del efecto del Ruthenium Red (RR) en la muerte celular inducida por MR. Se observa que a altas frecuencias la presencia del inhibidor RR previene la muerte celular. N= 5 por cada grupo \* P < 0,05 con respecto a 0,5Hz.



**Figura 40:** Resultados promedio del efecto del Ácido Bongkrecico. La presencia del inhibidor del mPTP previene la muerte celular en cardiomiocitos aislados y marcapaseados a altas frecuencias (5 y 8Hz). N= 5 por cada grupo \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz.

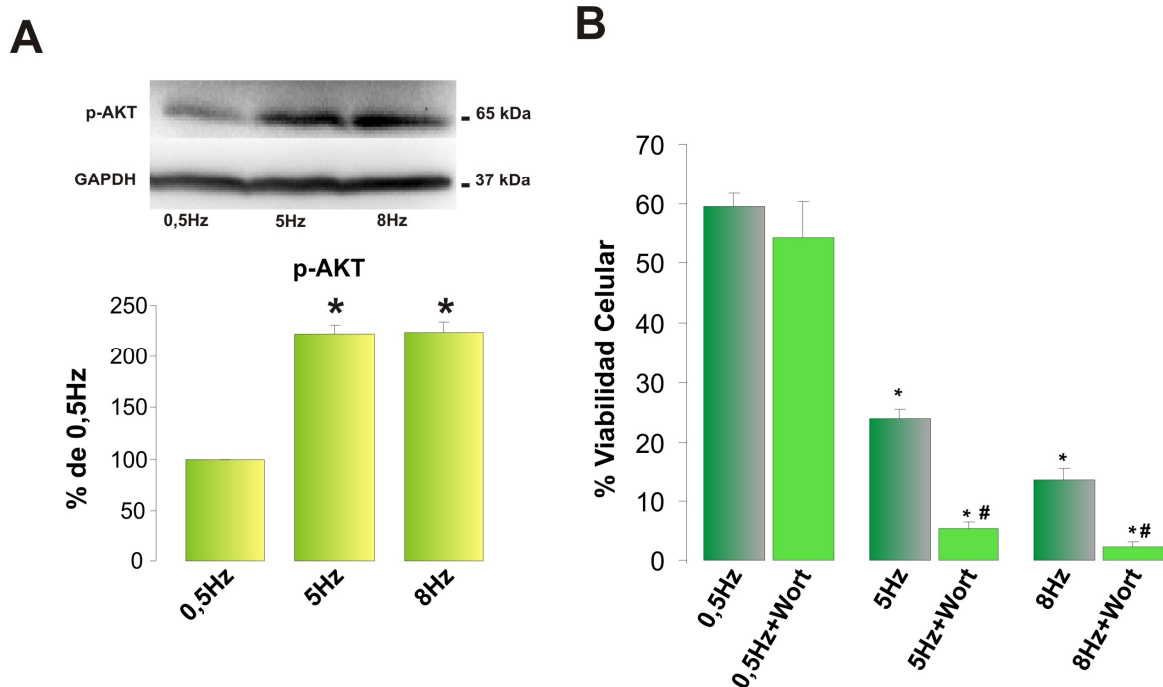
### ***\*Rol de la vía PI3K/AKT en la muerte celular inducida por MR***

#### **La inhibición de la vía PI3K/AKT exacerba los efectos deletéreos del MR sobre la viabilidad de los cardiomiocitos**

Se ha demostrado que a elevadas frecuencias de estimulación eléctrica se promueve la activación temprana de la quinasa de supervivencia, AKT (Kuramochi y col., 2006). Recientemente hemos demostrado que CaMKII media la apoptosis inducida por el digitálico, Ouabaina, y que este proceso se ve contrarrestado por la activación de la vía PI3K/AKT que sirve para proteger contra un daño mayor (Sapia y col., 2010). Para examinar si la vía PI3K/AKT también posee un papel protector en la muerte celular inducida por MR, realizamos experimentos en cardiomiocitos aislados de rata Wistar macho de 3 meses de edad, en presencia y ausencia de 1 mM del inhibidor de PI3K, Wortmanina.

La figura 41 muestra el efecto del MR sobre la actividad de AKT y la viabilidad celular. El MR aumentó significativamente la actividad de AKT y la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT aumentó significativamente el número de células muertas en comparación a las marcapaseadas en ausencia del inhibidor. Estos resultados

confirman que el MR además de la activación de una cascada apoptótica, desencadenada por la activación de CaMKII, activa simultáneamente una cascada protectora que involucra la cascada PI3K/AKT. La activación de esta vía es, sin embargo, insuficiente para prevenir completamente la muerte celular inducida por MR. Experimentos controles mostraron que Wortmanina no afectó por sí misma la viabilidad celular en células en reposo.



**Figura 41:** A) Blots representativos y resultados promedio muestran que el MR aumenta significativamente la actividad de AKT (p-AKT)  $N=5$  \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5Hz. B) Gráfico de barras que muestra los resultados promedio ( $N=8$ ) del efecto del MR sobre la viabilidad celular, ya sea en ausencia o presencia de 1 mM del inhibidor de PI3K Wortmanina (Wort). La inhibición de la vía PI3K/AKT aumentó significativamente el número de células muertas producidas por MR.  $N=8$  \*  $P < 0,05$  con respecto a 0,5 Hz; #  $P < 0,05$  con respecto a 5 y 8 Hz sin Wortmanina.

# DISCUSIÓN

La taquicardia sostenida en pacientes y modelos experimentales de animales sometidos a estimulación rápida promueve una remodelación mecánica y eléctrica que conduce a la insuficiencia cardíaca congestiva (IC) (Spinale y col., 1994; Valente y col., 1998; Nakamura y col., 2002) y varios trabajos sugieren que la muerte celular por apoptosis contribuye a este remodelamiento adverso (Kuramochi y col., 2006; Liu y col., 1995; Hanna y col., 2004). Sin embargo, los mecanismos subcelulares que subyacen a la muerte celular de los cardiomiocitos a altas frecuencias cardíacas aún no se han determinado.

Utilizando un modelo celular de marcapaseo rápido (MR), Kuramochi y colaboradores demostraron que la muerte celular inducida por MR es un evento temprano que se asocia con la activación de diferentes quinasas de estrés (Erk, AKT, JNK y p38MAPK) (Kuramochi y col., 2006). Sin embargo, el estudio de Kuramochi y colaboradores no proporcionó evidencia directa del rol causal de estas quinasas en la muerte celular inducida por MR. Por otro lado, Hanna y colaboradores también observaron la inducción temprana de apoptosis en un modelo canino de MR. Sin embargo, la activación de la señalización de MAPK no se observó hasta 5 semanas después de iniciado el MR (Hanna y col., 2004). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de las MAPK no estaría involucrada en la muerte celular inducida por MR. Esta conclusión es consistente con nuestros resultados en los que observamos que el MR reduce la viabilidad celular en asociación con un aumento de la actividad de la p38MAPK sin embargo, la inhibición de esta MAPK con su inhibidor específico, SB202190 no previno la muerte celular inducida por MR. Estos resultados nos permiten concluir que p38MAPK se activa frente al MR, pero no se encuentra involucrada en la muerte celular inducida por MR.

Se sabe que el MR aumenta los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular (Allen y col., 1978) y también ha sido descrito que la elevación sostenida de  $Ca^{2+}$  intracelular promueve la muerte celular de los cardiomiocitos (Orrenius y col., 2003). Por otro lado, también se ha visto que el MR aumenta el estrés oxidativo (Heinzel y col., 2006) y evidencia experimental demuestra que previniendo el estrés oxidativo con antioxidantes se puede inhibir la apoptosis de los cardiomiocitos en un modelo de insuficiencia cardíaca inducida por MR (Qin y col., 2003). Estos resultados sugieren que la elevación de  $Ca^{2+}$  y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) podrían ser responsables de la

activación de la cascada apoptótica inducida por MR.

La proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaMKII) es una treonina/serina quinasa ubicua que es activada canónicamente por la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y recientemente, se ha demostrado que su actividad también puede ser modulada por oxidación dependiente de ROS (Erickson y col., 2008; Palomeque y col., 2009). Por otra parte, la activación sostenida de CaMKII puede ser proapoptótica (Zhang y col., 2004). De hecho, evidencia experimental de nuestro laboratorio demuestra que la activación de CaMKII es un evento crítico en la cascada de señalización que conduce a la apoptosis en la injuria por isquemia/reperfusión, en la toxicidad por digitálicos y durante la estimulación sostenida con Angiotensina II (AngII) (Vila Petroff y col., 2007; Sapia y col., 2010; Palomeque y col., 2009). Estos resultados sugieren que CaMKII podría ser el blanco del  $\text{Ca}^{2+}$  y de la producción de ROS intracelular que durante el MR podrían mantener sostenida la actividad de la quinasa, favoreciendo así el proceso de apoptosis. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó la hipótesis de que el MR aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la producción de ROS, que resulta en la activación de CaMKII que promueve la apoptosis de las células cardíacas.

Los resultados presentados en esta tesis muestran por primera vez que CaMKII media la apoptosis inducida por MR y proporcionan evidencia que sugiere que el mecanismo subyacente para la muerte celular inducida por MR implica la producción de ROS, CaMKII-dependiente, que conduce, al menos en parte, a la oxidación del receptor de rianodina tipo 2 (RyR2), que resulta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS durante el período diastólico. Esta liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico, como ha sido demostrado anteriormente por nuestro y otros laboratorios, resulta en la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y la activación de la cascada apoptótica (Zhang y col., 2010; Salas y col., 2010). Nuestros resultados muestran además que la muerte celular inducida por MR se puede prevenir mediante agentes que reducen la probabilidad de apertura de los RyR2, sugiriendo la posibilidad de utilizar estabilizadores de los RyR2 como una estrategia terapéutica para reducir el remodelado adverso asociado con la taquicardia y para prevenir el deterioro en la función cardíaca asociado con esta entidad patológica.

### **CaMKII media la muerte celular inducida por MR**

Los resultados de esta tesis, muestran claramente que el MR disminuye la viabilidad de los cardiomiocitos mediante la promoción de apoptosis y necrosis (Resultados Figura 14, 15 y 16). Hemos demostrado que la estimulación de células a 5 Hz y 8 Hz (alta



frecuencia) durante 1 hora reduce significativamente la viabilidad celular en comparación con las que se mantienen a 0,5 Hz (baja frecuencia) o sin estimulación (control). Esta disminución de la viabilidad es al menos en parte debido a apoptosis ya que la misma se encontró asociada con un aumento de la actividad de Caspasa3a, uno de los efectores finales de la cascada apoptótica, y con un aumento de la relación de Bax/Bcl2. Recordando que las proteínas proapoptótica, Bax, y la antiapoptótica, Bcl2, forman heterodímeros que se localizan en la membrana externa mitocondrial, estos resultados sugieren la participación de las mitocondrias en el proceso de apoptosis.

Se ha demostrado que CaMKII es un intermediario común a través del cual diversos estímulos deletéreos pueden desencadenar la apoptosis de los cardiomiocitos (Zhu y col., 2007). Por otro lado, se sabe que el MR aumenta dos moduladores fundamentales de la actividad de CaMKII, el Ca<sup>2+</sup> y las ROS (Vila Petroff y col., 2003; Heinzl y col., 2006; Yamamoto y col., 2006). Por lo tanto, investigamos el papel que juega CaMKII en la muerte celular inducida por MR.

Confirmando resultados previos, observamos que bajo nuestras condiciones experimentales, el MR aumentó significativamente el Ca<sup>2+</sup> diastólico y sistólico, así como la producción de ROS en los cardiomiocitos aislados (Figura 25 y 26). Consistentemente, observamos que el MR aumentó la actividad de CaMKII (p-CaMKII) y que el KN93, un inhibidor farmacológico de CaMKII previene la reducción de la viabilidad celular y el aumento de los índices de apoptosis (relación Bax/Bcl2 y la actividad de Caspasa3a) inducida por MR. Estos resultados sugieren que CaMKII estaría involucrada en la muerte celular y en la apoptosis inducida por MR. Confirmando la participación de CaMKII en la muerte celular inducida por MR observamos que ratones transgénicos que expresan el péptido inhibidor para CaMKII (AC3-I) estaban protegidos de los efectos deletéreos de las altas frecuencias de estimulación y que la sobreexpresión de CaMKII exacerba los efectos deletéreos del MR (Figura 24). Los presentes hallazgos, combinando la inhibición farmacológica y la manipulación genética de CaMKII descartan potenciales efectos inespecíficos del KN93 y proporcionan evidencia sólida que indica que CaMKII está implicada mecanísticamente en los efectos deletéreos del MR sobre la viabilidad celular.

Como se indicó previamente, nosotros planteamos la hipótesis que el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la producción de ROS inducidos por MR, contribuyen a la activación sostenida de CaMKII. Sin embargo, no pudimos observar una disminución en la actividad de CaMKII cuando los protocolos de MR se realizaron en presencia del barredor de ROS, MPG. En cambio, observamos que el aumento de la actividad de CaMKII y de la muerte celular inducido por MR se podían prevenir con un bloqueante de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, Nifedipina, usado para inhibir la entrada de Ca<sup>2+</sup>

producida durante el MR. Estos resultados indican que durante el MR, CaMKII es activada por la elevación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y no por la oxidación dependiente de ROS.

Se han informado anteriormente resultados similares a los nuestros, mostrando un aumento de la producción de ROS inducida por MR (Heinzel y col., 2006). Sin embargo, la fuente de estas ROS todavía no está completamente definida. Varias líneas de evidencia han relacionado la producción de ROS inducida por MR con la activación de la NADPH oxidasa (Sánchez y col., 2005; Yamamoto y col., 2006) e informes recientes indican que CaMKII puede activar varias isoformas de esta oxidasa (Nishio y col., 2012; Pandey y col., 2011). Nuestros resultados muestran que inhibir CaMKII con KN93 o AIP impide el aumento en la producción de ROS inducida por MR mientras que el KN92 no lo previene (Figura 36), indicando que la producción de ROS inducida por MR es CaMKII-dependiente. Confirmando estos resultados, los cardiomiocitos aislados de ratones AC3-I no mostraron un aumento en la producción de ROS inducida por MR en tanto que, los AC3-C si lo hicieron. Más aún, usando el inhibidor de la NADPH oxidasa, Apocinina, pudimos prevenir la muerte celular inducida por MR (Figura 37). Teniendo en cuenta los resultados que indican que la muerte celular inducida por MR es mediada por CaMKII, estos resultados sugieren que CaMKII podría promover la producción de ROS a través de activar a la NADPH oxidasa.

Actualmente es ampliamente aceptado que la elevación de ROS es un factor crítico para el daño cardíaco y la muerte celular (Kinugawa y col., 2000). En consecuencia, se ha demostrado que los barredores de ROS atenúan la apoptosis (Qin y col., 2003) y la disfunción contráctil de los cardiomiocitos (Kinugawa y col., 2000). Nuestros resultados muestran que el barredor de ROS, MPG, evita tanto el aumento de la muerte celular así como también el aumento de los índices de apoptosis (actividad de la Caspasa3a y la relación Bax/Bcl2), demostrando que las ROS están involucradas en la muerte celular y la apoptosis inducida por MR.

Los mecanismos subyacentes a la apoptosis dependiente de CaMKII todavía no han sido completamente dilucidados. Evidencia reciente de nuestro laboratorio obtenida en el contexto de la isquemia y reperfusión, sugiere que CaMKII puede promover apoptosis al alterar el acoplamiento entre la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático (RS) y la retoma de Ca<sup>2+</sup> por la mitocondria, resultando en la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Salas y col., 2010).

Desde hace varios años se conoce que la interacción entre el RS y la mitocondria está implicada en el desencadenamiento de señales apoptóticas (Chen y col., 2005; Joiner y col., 2012). Dando sustento al rol crítico de la interacción RS/mitocondria en la apoptosis asociada con la activación de CaMKII, Zhang y colaboradores concluyeron, usando ratones transgénicos que carecen de fosfolambam (PLB) y sobreexpresan CaMKII $\delta$ c, que CaMKII al aumentar la fosforilación del RyR2 conduce a un aumento de la pérdida de Ca<sup>2+</sup> por el RS que eleva el Ca<sup>2+</sup> mitocondrial y resulta en un aumento en la muerte celular (Zhang y col., 2010). Otra evidencia que demuestra la importancia de la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial en la muerte celular inducida por CaMKII proviene del trabajo de Joiner y colaboradores (Joiner y col., 2012). En este trabajo se mostró que CaMKII también puede regular directamente la retoma mitocondrial de Ca<sup>2+</sup> a través del uniporter mitocondrial, que conduce a la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial y la apertura del mPTP. Teniendo en cuenta estos antecedentes exploramos que la muerte celular inducida por MR es al menos en parte debida a un aumento en la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el RS a través de los RyR2, dependiente de CaMKII, con la consecuente retoma y sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> por la mitocondria. Para probar que los RyR2 están involucrados en la muerte celular inducida por MR, utilizamos dos compuestos distintos, conocidos por reducir la probabilidad de apertura de los RyR2, 1) el anestésico, Tetracaína, y 2) el  $\beta$ -bloqueante Carvedilol. Los resultados muestran que, tanto la Tetracaína como el Carvedilol impidieron la muerte celular inducida por MR (Figura 34 y 35). Además, obtuvimos resultados similares usando un análogo del Carvedilol pero que presenta un mínimo efecto  $\beta$ -bloqueante, el VKI186. Estos resultados excluyen la posibilidad de que los efectos beneficiosos observados del Carvedilol estén relacionados con su capacidad  $\beta$ -bloqueante y no con su acción como un estabilizador del RyR2 (Figura 34) (Zhou y col., 2011).

Para obtener una mayor comprensión del mecanismo subyacente a la apoptosis inducida por MR dependiente de CaMKII, evaluamos la frecuencia de ondas de Ca<sup>2+</sup> como índice de pérdida de Ca<sup>2+</sup> del RS y examinamos la contribución de las mitocondrias usando inhibidores de la retoma por el uniporter mitocondrial y del mPTP, Ruthenium red y Ácido bongkrecico, respectivamente. Los resultados muestran que el MR, aumentó significativamente la frecuencia de las ondas de Ca<sup>2+</sup> y que estos eventos se redujeron significativamente por la presencia del inhibidor de CaMKII, KN93. Además observamos que tanto el Ruthenium red como el Ácido Bongkrecico son capaces de prevenir la muerte celular inducida por MR. A pesar de que se ha demostrado que el Ruthenium red es poco específico (Hajnóczky y col., 2006), tomados en conjunto estos resultados nos permiten concluir, al igual que Zhang y colaboradores (Zhang y col., 2010) que la activación de CaMKII inducida por MR

conduce, al menos en parte, a un aumento de la probabilidad de apertura del RyR2 y la pérdida de Ca<sup>2+</sup> por el RS, que resultaría en la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial, la apertura del mPTP y la consecuente activación de la cascada apoptótica.

La probabilidad de apertura del RyR2 puede ser modulada, al menos en parte, por fosforilación y/u oxidación (Niggli y col., 2013). Así, durante el MR, el aumento CaMKII-dependiente, de la probabilidad de apertura del RyR2 podría ser debido a la fosforilación directa del sitio del RyR2 específico de CaMKII (serina 2814) y/o al aumento de la producción de ROS y la posterior oxidación del RyR2. Para disecar entre estas posibilidades utilizamos cardiomiocitos aislados de ratones mutantes con el sitio Serina 2814 del RyR2 mutado a Alanina y, por tanto, no fosforilable por CaMKII. Sorprendentemente, estos cardiomiocitos no estaban protegidos contra la muerte celular inducida por MR. Sin embargo, la muerte celular inducida por MR se previno cuando estos cardiomiocitos se sometieron a MR pero en presencia del barredor de ROS, MPG. Estos resultados indican que la fosforilación CaMKII-dependiente del RyR2 no es suficiente para activar la cascada apoptótica. En contraste, la capacidad del MPG para prevenir la muerte celular inducida por MR en los cardiomiocitos aislados de ratones mutantes S2814a sugiere que la oxidación del RyR2 juega un rol central en el aumento de la probabilidad de apertura del RyR2 que conduce a una pérdida de Ca<sup>2+</sup> por el RS, y en consecuencia a la muerte de los cardiomiocitos en condiciones de MR. En concordancia con esta interpretación observamos que en presencia de MPG se previene la muerte celular inducida por MR pero no la actividad de CaMKII que permanece aumentada.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis, muestran el papel fundamental de CaMKII y los RyR2 en la muerte celular inducida por MR y sugieren que el uso de inhibidores de la CaMKII podría ser de potencial beneficio terapéutico. Sin embargo, la naturaleza ubicua de CaMKII y sus efectos sobre distintos blancos proteicos argumentan en contra de su uso como una herramienta terapéutica. Para ser efectiva, la inhibición farmacológica de CaMKII requeriría como mínimo un compuesto selectivo hacia la isoforma de CaMKII cardiaca. Sin embargo, estos compuestos aun no están disponibles.

Por otro lado, la demostración de que los RyR2 juegan un papel crucial en el desarrollo de la muerte celular inducida por MR nos permite postular un enfoque terapéutico alternativo, que implica el concepto de "estabilización de los RyR2". El término "estabilización" se refiere a la posibilidad de reducir la apertura espontánea de los RyR2 en el período diastólico sin afectar a la liberación sistólica. Así, los compuestos

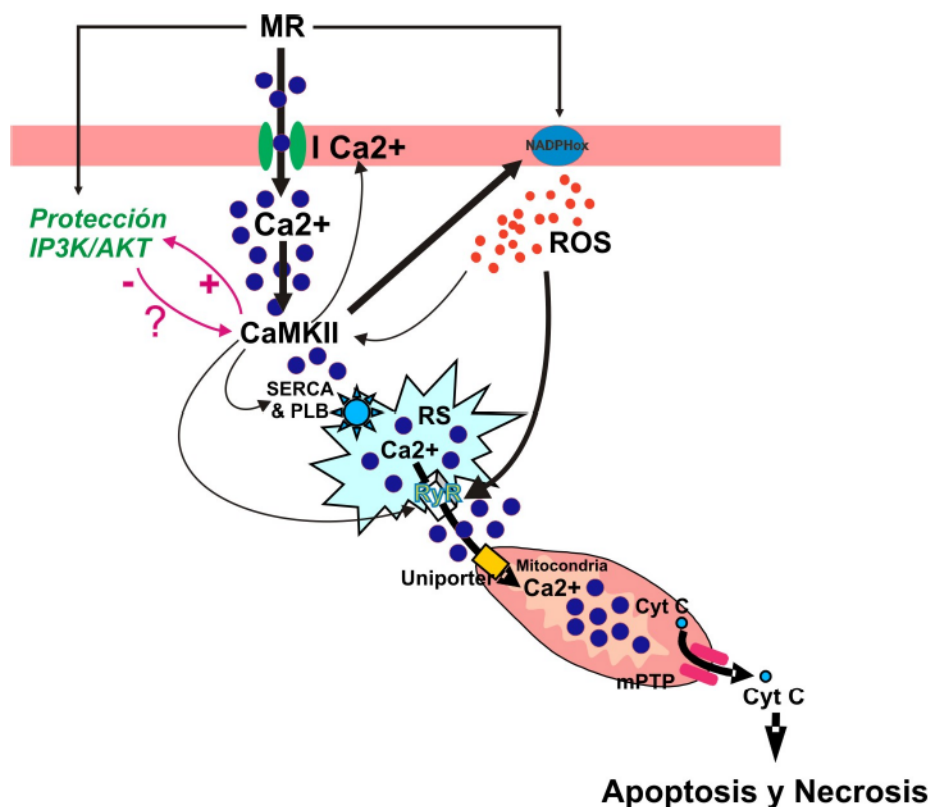
que son capaces de estabilizar los RyR2 podrían utilizarse para prevenir la muerte celular inducida por MR sin los efectos indeseables de la inhibición global de CaMKII. En este contexto, Sacherer y colaboradores mostraron que el bloqueante JTV-519 (K201) es capaz de estabilizar a los RyR2 y reducir la pérdida de Ca<sup>2+</sup> del RS inducida por el digitálico Ouabaina (Sacherer y col., 2012) y estudios recientes de Zhuo y colaboradores muestran que el Carvedilol y sus análogos son capaces de prevenir las arritmias inducidas por la sobrecarga y consecuente pérdida de Ca<sup>2+</sup> del RS (Zhuo y col., 2011). Estos resultados, sumados a los mostrados en esta tesis en los que pudimos prevenir la muerte celular inducida por MR, usando distintos estabilizadores del RyR (Tetracaína, Carvedilol, VKI186) sugieren que el uso de estabilizadores de los RyR2 podría ser un enfoque prometedor para el tratamiento de la muerte celular inducida por MR u otras patologías que involucren la pérdida de Ca<sup>2+</sup> del RS a través de los RyR2.

### **Rol de la vía PI3K/AKT en la muerte celular inducida por MR**

Se ha demostrado que el MR induce la activación temprana de la vía PI3K/AKT (Kuramochi y col., 2006). Al igual que las observaciones de Kuramochi y colaboradores, observamos en nuestros experimentos que el MR promueve la activación temprana de AKT (Figura 41A). En cardiomiocitos, la cascada de PI3K/AKT ha sido implicada en la supervivencia en respuesta a la isquemia y reperfusión, el estrés oxidativo, la hipoxia, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica y también que protege contra la apoptosis (Kimura y col., 2004; Remy y col., 2004; Rosenzweig y col., 1997). Por otro lado, ha sido demostrado que la activación de CaMKII podría ser perjudicial en todas estas situaciones (Couchonnal y col., 2008). Estos antecedentes sugieren la posibilidad que la activación crónica y deletérea de CaMKII promueva la activación simultánea de la vía protectora PI3K/AKT. Consistentemente con esta posibilidad, cuando utilizamos 1  $\mu$ M del inhibidor de PI3K, Wortmanina, observamos que la inhibición de la cascada de PI3K/AKT exacerba los efectos deletéreos del MR. Estos resultados sugieren que la muerte celular inducida por MR es contrarrestada por el efecto protector de la activación simultánea de la cascada PI3K/AKT. De todos modos, la activación de esta vía no es lo suficientemente efectiva como para prevenir completamente la muerte celular inducida por MR. Interesantemente, hallazgos previos de nuestro laboratorio han demostrado que durante otra intervención que promueve apoptosis de cardiomiocitos CaMKII-dependiente, como es el tratamiento crónico con digitálicos,

también se activa simultáneamente la señalización PI3K/AKT que juega un papel protector al reducir el grado de apoptosis (Sapia y col., 2010). Estos resultados sugieren que la señalización de PI3K/AKT podría estar corriente abajo de CaMKII y formar parte de un bucle de retroalimentación negativa, en el que su activación requiera a CaMKII y que una vez activada, la vía PI3K/AKT, inhiba a CaMKII. Nuestros resultados no permiten confirmar esta hipótesis sin embargo, estudios recientes indican que CaMKII promueve la supervivencia dependiente de la vía PI3K/AKT en macrófagos derivados de médula ósea tratados con TNF $\alpha$  (Tano y col., 2012). En apoyo de esta posibilidad y un estudio reciente en el tejido nervioso muestra que el óxido nítrico (NO), un mensajero corriente abajo de señalización de PI3K/AKT, puede nitrosilar a CaMKII e inhibir su actividad (Song y col., 2008). Estos antecedentes sumados al hecho de que la señalización PI3K/AKT es capaz de rescatar de la apoptosis CaMKII-dependiente inducida por diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo: MR y tratamiento crónico con digitálicos, nos lleva a especular que la señalización PI3K/AKT podría modular negativamente la actividad de CaMKII.

En resumen, como se observa en la representación esquemática de la figura 42, concluimos que la entrada Ca<sup>2+</sup> inducida por MR activa a CaMKII promoviendo apoptosis, al menos en parte, mediante la producción de ROS que altera la función del RyR2, que en consecuencia conduce al aumento de la liberación del Ca<sup>2+</sup> diastólico y la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial. Por otro lado, el MR activa simultáneamente una cascada antiapoptótica que implica a la vía PI3K/AKT que es sin embargo, insuficiente para suprimir completamente la muerte celular. Finalmente, nuestros resultados muestran que la estabilización del RyR2 puede prevenir la muerte celular inducida por MR y sugerimos el uso potencial de estos agentes (Carvedilol y VKI186) para el tratamiento de la remodelación adversa asociada con la taquicardia crónica tales como la que se produce en pacientes con taquicardia supraventricular paroxística o la fibrilación auricular.



**Figura 42:** Esquema representativo que resume los principales y posibles eventos secuenciales que conducen a la muerte celular inducida por MR. Las flechas gruesas representan las rutas preferenciales mostrando que el MR induce el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular que activa a CaMKII, que a su vez fosforila varios sustratos aguas abajo y adicionalmente promueve la producción de ROS. Estos ROS oxidan el RyR2 favoreciendo la pérdida de  $Ca^{2+}$  por el RS que resultaría en la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  mitocondrial, la apertura del mPTP y la consecuente activación de la cascada apoptótica. MR (marcapaseo rápido); PLB (fosfolamban); RyR2 (receptor de rianodina tipo 2); NADPHox (NADPH oxidasa); mPTP (poro de transición de permeabilidad mitocondrial); Cyt C (citocromo C).

# CONCLUSIONES

- Podemos concluir que el MR promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula que activaría a CaMKII que en consecuencia promueve la activación de la cascada apoptótica.
- La activación de CaMKII promueve la liberación de ROS y estos, a la oxidación del RyR2 resultando en la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  por el mismo y la consecuente sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria que llevaría a la liberación de Citocromo C y activación de caspasas efectoras.
- Además, el MR activa simultáneamente una cascada antiapoptótica, la vía PI3K/AKT, que protege, pero sin embargo es insuficiente para suprimir completamente la apoptosis.
- Finalmente nuestros resultados indican que los estabilizadores del RyR2 (Carvedilol y VKI186) pueden prevenir la muerte celular inducida por MR, sugiriendo el potencial uso de estos agentes para el tratamiento de los efectos adversos asociados con la taquicardia crónica.



# BIBLIOGRAFÍA

- 01 Adrain, C. and S.J. Martin, The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 390-7.
- 02 Allen DG, Blinks JR. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature.* 1978; 5663: 509-13.
- 03 Ambrosino, C., y Nebreda, A.R. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell.* 2001; 93: 47-51.
- 04 Anderson, M.E., A.P. Braun, H. Schulman, and B.A. Premack, Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca (2+)-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1994; 5: 854-61.
- 05 Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998; 5381: 1305-8.
- 06 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.* 2009; 7: 2342-7.
- 07 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; 32: 22943-52.
- 08 Baines, C.P. and J.D. Molkenin, STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 1: 47-62.
- 09 Bellon, S., Fitzgibbon, M.J., Fox, T., Hsiao, H.M., y Wilson, K.P. The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure.* 1999; 7: 1057-1065.
- 10 Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., y Marshall, C.J. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol.* 1998; 8: 1049-1057.
- 11 Berra, E., Diaz-Meco, M.T., y Moscat, J. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 1998; 273: 10792-10797.
- 12 Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M.T., y Moscat, J. Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 4346-4354.
- 13 Bers DM. Excitation contraction coupling and cardiac contractile force. 2001; Kluwer Academic Publishers.
- 14 Bers DM, Bassani JW, Bassani RA. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 779: 430-42.
- 15 Bishopric, N.H., P. Andreka, T. Slepak, and K.A. Webster, Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 2: 141-50.
- 16 Bkaily G, Sperelakis N, Doane J. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. *Am J Physiol.* 1984; 2: 1018-26.
- 17 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: 248-54.

- 18 Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., y Davis, R.J. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 2003; 17: 1969-1978.
- 19 Braun, A.P. and H. Schulman, The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 417-45.
- 20 Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., y Gustin, M.C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* 1993; 259: 1760-1763.
- 21 Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999; 6: 857-68.
- 22 Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J Biol Chem.* 2001; 16: 13402-10.
- 23 Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H., y Nordheim, A. CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene.* 1996; 13: 2087-2096.
- 24 Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., y Goldsmith, E.J. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell.* 1997; 90: 859-869.
- 25 Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G., y Frisch, S.M. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell.* 1997; 90: 315-323.
- 26 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.* 2009; 33: 14144-9.
- 27 Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C,. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene.* 2001; 42: 6073-83.
- 28 Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, Berretta R, Potts ST, Marsh JD, Houser SR. Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res.* 2005; 10: 1009-17.
- 29 Colucci WS, Braunwald E, Pathophysiology of heart failure. En: Braunwald E de. *Heart disease.* 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1997; 5: 394-420.
- 30 Colucci WS. Apoptosis in the heart. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1224-6.
- 31 Couchonnal LF, Anderson ME. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda).* 2008; 23: 151-9.
- 32 Court, N.W., dos Remedios, C.G., Cordell, J., y Bogoyevitch, M.A. Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3). *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 413-426.
- 33 Crompton, M., The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999; 2: 233-49.
- 34 Cuenda, A., y Dorow, D.S. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem J.* 1998; 1: 11-15.
- 35 Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR. Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca (2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 1: 25-32.
- 36 Curran J, Tang L, Roof SR, Velmurugan S, Millard A, Shonts S, Wang H, Santiago D, Ahmad U, Perryman M, Bers DM, Mohler PJ, Ziolo M, Shannon TR. Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation. *PLoS One.* 2014; 2: 87495.

- 37 Dashti, S.R., Efimova, T., y Eckert, R.L. MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276: 8059-8063.
- 38 Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J.L., y Patel, R. p38 Mitogenactivated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol Biol Cell.* 2003; 14: 2071-2087.
- 39 Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., y Davis, R.J. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 1995; 267: 682-685.
- 40 DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 8: 975-84.
- 41 Di Carlo MN, Said M, Ling H, Valverde CA, De Giusti VC, Sommesse L, Palomeque J, Aiello EA, Skapura DG, Rinaldi G, Respress JL, Brown JH, Wehrens XH, Salas MA, Mattiazzi A. CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 74: 274-83.
- 42 Doza, Y.N., Cuenda, A., Thomas, G.M., Cohen, P., y Nebreda, A.R. Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Lett.* 1995; 364: 223-228.
- 43 Duckett, D.R., Bronstein, S.M., Taya, Y., y Modrich, P. hMutSalpha- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 12384-12388.
- 44 Enslin, H., Raingeaud, J., y Davis, R.J. Selective activation of p38 mitogenactivated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem.* 1998; 273: 1741-1748.
- 45 Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 2008; 133: 462-474.
- 46 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; 3: 462-74.
- 47 Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., y Alnemri, E.S. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 7464-7469.
- 48 Fernández-Solá J, Nicolas-Arfelis JM. Apoptosis e implicaciones clínicas. *Med Interna.* 1999; 17: 425-68.
- 49 Ferrero, P., M. Said, G. Sanchez, L. Vittone, C. Valverde, P. Donoso, A. Mattiazzi, and C. Mundiña-Weilenmann, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca<sup>2+</sup>-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 3: 281-91.
- 50 Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 481-507.
- 51 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; 11: 10109-18.

- 52 Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., y Han, J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science*. 2002; 295: 1291-1294.
- 53 Ge, B., Xiong, X., Jing, Q., Mosley, J.L., Filose, A., Bian, D., Huang, S., y Han, J. TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J Biol Chem*. 2003; 278: 2286-2293.
- 54 George CH, Lai FA. Developing new anti-arrhythmics: clues from the molecular basis of cardiac ryanodine receptor (RyR2) Ca<sup>2+</sup>-release channel dysfunction. *Curr Pharm Des*. 2007; 31: 3195-211.
- 55 Gill C, Mestri R, Smali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease-anovel therapeutic target?. *FASEB J*. 2002; 16: 135-146.
- 56 Gonano LA, Sepúlveda M, Rico Y, Kaetzel M, Valverde CA, Dedman J, et al. Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; 4: 947-57.
- 57 Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*. 1999; 85: 856-866.
- 58 Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E. NO-dependent CaMKII activation during  $\beta$ -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 2013; 3: 392-401.
- 59 Griffith, L.C., Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J Neurosci*. 2004; 39: 8394-8.
- 60 Grueter CE, Colbran RJ, Anderson ME. CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction. *J Mol Med (Berl)*. 2007; 1: 5-14.
- 61 Guatimosin S, Dilly K, Santana LF, Jafri MS, Sobie EA, Lederer WJ. Local Ca<sup>2+</sup> signaling and EC coupling in heart: Ca<sup>2+</sup> sparks and the regulation of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34: 941-50.
- 62 Hajjar RL, del Monte F, Matsui T, Rosenzweig. Prospects for gene herapy for heart failure. *Circ Res*. 2000; 86: 616-21.
- 63 Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Yi M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in apoptosis. *Cell Calcium*. 2006; 5-6: 553-60.
- 64 Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., y Manthey, C.L. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol*. 1999; 162: 4246-4252.
- 65 Hamet P, Richard L, Dam T-V, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995; 26: 642-8.
- 66 Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., y Ulevitch, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994; 265: 808-811.
- 67 Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 2004; 2: 236-44.
- 68 Hazzalin, C.A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M.J., Cohen, P., y Mahadevan, L.C. p38/ERK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol*. 1996; 6: 1028-1031.
- 69 He TC, Zhou S, Costa LT, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl Acad. Sci*. 1998; 95: 2509-2514.
- 70 Heinzl FR, Luo Y, Dodoni G, Boengler K, Petrat F, Di Lisa F, de Groot H, Schulz R, Heusch G. Formation of reactive oxygen species at increased contraction frequency in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2006; 2: 374-82.

- 71 Henkart, P.A. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity*. 1996; 4: 195-201.
- 72 Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB; Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, *Nature reviews, drug discovery*. 2005; 4: 988-1004.
- 73 Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*. 1992; 3: 419-29.
- 74 Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999; 6: 713-21.
- 75 Huang, C., Ma, W.Y., Maxiner, A., Sun, Y., y Dong, Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem*. 1999; 274: 12229-12235.
- 76 Huang, S., Jiang, Y., Li, Z., Nishida, E., Mathias, P., Lin, S., Ulevitch, R.J., Nemerow, G.R., y Han, J. Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity*. 1997; 6: 739-749.
- 77 Hudmon, A., H. Schulman, J. Kim, J.M. Maltez, R.W. Tsien, and G.S. Pitt, CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation. *J Cell Biol*, 2005; 3: 537-47.
- 78 Iwamoto, T., Y. Pan, S. Wakabayashi, T. Imagawa, H.I. Yamanaka, and M. Shigekawa, Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem*. 1996; 23: 13609-15.
- 79 James TN, St Martin E, Willis PW, Lohr TO. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways. *Circulation*. 1996; 93: 1424-38.
- 80 Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., y Han, J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*; 1996; 271: 17920-17926.
- 81 Jiménez C, Jones DR, Rodríguez-Viciana P, González-García A, Leonardo E, Wennstrom S, et al. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Embo J*. 1998; 3: 743-53.
- 82 Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, Gao Z, Luczak ED, Hall DD, Fink BD, Chen B, Yang J, Moore SA, Scholz TD, Strack S, Mohler PJ, Sivitz WI, Song LS, Anderson ME. CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*. 2012; 7423: 269-73.
- 83 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptosis and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996; 74: 86-107.
- 84 Keyse, S.M. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1265: 152-160.
- 85 Keyse, S.M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; 12: 186-192.
- 86 Kimura A, Ohmichi M, Kawagoe J, Kyo S, Mabuchi S, Takahashi T, et al. Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene*. 2004; 26: 4505-15.
- 87 Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, Utsumi H, Takeshita A. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res*. 2000; 5: 392-8.
- 88 Kirkegaard, T. and M. Jaattela, Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 4: 746-54.

- 89 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; 1: 55-63.
- 90 Kothakota S. Caspase 3-generated fragmento f gelsolin: effector of mophological change in apoptosis. *Science*. 1997; 278: 294-298.
- 91 Kulacekaren P, Scavone CA, Rogers DS. Endothelium-1 and TGF- $\beta$  independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009; 4: 484-93.
- 92 Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., y Young, P.R. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 235: 533-538.
- 93 Kuramochi Y, Guo X, Sawyer DB, Lim CC. Rapid electrical stimulation induces early activation of kinase signal transduction pathways and apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Exp Physiol* 2006; 91:773–80.
- 94 Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR. Role of CaMKII $\delta$  phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107: 10274–9.
- 95 Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.F., Moller, N.P., y Ullrich, A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. 1196; 93: 4355-4359.
- 96 Lee, L.F., Li, G., Templeton, D.J., y Ting, J.P. (1998). Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem*. 1998; 273: 28253-28260.
- 97 Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., y Han, J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 228: 334-340.
- 98 Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., y Karin, M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science*. 1995; 268: 286-290.
- 99 Lindemann, J.P. and A.M. Watanabe, Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem*. 1985; 7: 4516-25.
- 100 Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid entricular pacing in dogs. *Lab Invest. Cell Res*. 1995; 1: 110-21.
- 101 Luo J, Deng Z-H, Luo X, Tang N, Song W-X, Cheng J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, Vogelstein B, He T-C. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Natura Protocols*. 2007; 2: 1236.
- 102 Maier LS, Bers DM. Role of Ca (2+)/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2007; 73: 631-40.
- 103 Maier, L.S., Ca (2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the heart. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 740: 685-702.
- 104 Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1190-6.
- 105 McKenna WJ, Thiene G, Nava A. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1994; 71: 215-8.
- 106 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; 12: 1354-62.

- 107 Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr., y Ashwell, J.D. Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle*. 2005; 4: 1189-1192.
- 108 Molnar, A., Theodoras, A.M., Zon, L.I., y Kyriakis, J.M. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J Biol Chem*. 1997; 272: 13229-13235.
- 109 Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., y Nishida, E. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF $\alpha$  and cellular stresses. *Embo J*. 1997; 16: 7045-7053.
- 110 Mundiña-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; 52: 33561-7.
- 111 Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, et al. Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation. *Circulation*. 2002; 106: 362–7.
- 112 Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1182-9.
- 113 Nebreda, A.R., y Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25: 257-260.
- 114 Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., y Lin, A. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 $\beta$  mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1998; 273: 16415-16420.
- 115 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; 1-3: 307-13.
- 116 Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Poláková E, Shirokova N. Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca (2+) signaling and EC-coupling. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833: 866-75.
- 117 Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, et al. Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 52: 1103–11.
- 118 Ohkusu-Tsukada, K., Tominaga, N., Udono, H., y Yui, K. (2004). Regulation of the maintenance of peripheral T-cell anergy by TAB1-mediated p38  $\alpha$  activation. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 6957-6966.
- 119 Ono, K., y Han, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000; 12: 1-13.
- 120 Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 552-65.
- 121 Palomeque J, Valverde CA, Velez Rueda JO, Salas MA, Mattiazzi A, Vila Petroff M. CaMKII mediates angiotensin II-induced cardiomyocytes apoptosis: role of Ca $^{2+}$ , ROS and p38 MAPK. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44: 764.
- 122 Palomeque J, Delbridge L, Petroff MV. Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; 14: 5118-33.
- 123 Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, et al. Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca $^{2+}$  dependence of Ca $^{2+}$ -calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* 2009; 105: 1204–12.
- 124 Palomeque J, Vila Petroff MG, Mattiazzi A. Pacing staircase phenomenon in the heart: from Bodwitch to the XXI century. *Heart Lung Circ*. 2004; 4: 410-20.
- 125 Palomeque J, Sapia L, Hajjar RJ, Mattiazzi A, Vila Petroff M. Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 1: 96-106.

- 126 Pandey D, Gratton JP, Rafikov R, Black SM, Fulton DJ. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Mol Pharmacol* 2011; 80: 407–15.
- 127 Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., y Cobb, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22: 153-183.
- 128 Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino, Benito M and Nebreda AR. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 922–933.
- 129 Porzio, M.A. and A.M. Pearson, *Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.* *Biochim Biophys Acta,* 1977; 1: 27-34.
- 130 Qin F, Shite J, Liang CS. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis and improve cardiac function in CHF: association with changes in MAPK pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 2: 822-32.
- 131 Raugeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., y Davis, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogenactivated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995; 270: 7420-7426.
- 132 Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol.* 2004; 4: 358-65.
- 133 Rosenzweig KE, Youmell MB, Palayoor ST, Price BD. Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNAdependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clin Cancer Res.* 1997; 7: 1149-56.
- 134 Sacherer M, Sedej S, Wakula P, Wallner M, Vos MA, Kockskamper J, Stiegler P, Sereinigg M, von Lewinski D, Antoons G, Pieske BM, and Heinzl FR. JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium. *Br J Pharmacol.* 2012; 167: 493-504.
- 135 Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SK, Maier LS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2009; 6: 664-75.
- 136 Said M, Becerra R, Valverde CA, Kaetzel MA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Wehrens XH, Vittoni L, Mattiazzi A. Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 6: 936-44.
- 137 Salas MA, Valverde CA, Sánchez G, Said M, Rodriguez JS, Portiansky EL, Kaetzel MA, Dedman JR, Donoso P, Kranias EG, Mattiazzi A. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 6: 1298-306.
- 138 Sánchez G, Pedrozo Z, Domenech RJ, Hidalgo C, Donoso P. Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 6: 982-91.
- 139 Sanchez-Prieto, R., Rojas, J.M., Taya, Y., y Gutkind, J.S. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 2000; 60: 2464-2472.
- 140 Sapia L, Palomeque J, Mattiazzi A, Petroff MV. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 3: 459-68.
- 141 Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P and Fisher PB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 10054–10059.



- 142 Schneider, D., E. Gerhardt, J. Bock, M.M. Muller, H. Wolburg, F. Lang, and J.B. Schulz, Intracellular acidification by inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger leads to caspase-independent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis. *Cell Death Differ.* 2004; 7: 760-70.
- 143 Schulman, H. and P. Greengard, Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". *Proc Natl Acad Sci.* 1978; 11: 5432-6.
- 144 Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Konietzka I, Rauen U, Heusch G. Stress kinase phosphorylation is increased in pacing-induced heart failure in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 5:2084-90.
- 145 Schworer, C.M., R.J. Colbran, and T.R. Soderling, Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>-(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem.* 1986; 19: 8581-4.
- 146 Shi, Z., Resing, K.A., y Ahn, N.G. Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr Opin Struct Biol.* 2006; 16: 686-692.
- 147 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; 28: 13333-41.
- 148 Song T, Hatano N, Kambe T, Miyamoto Y, Ihara H, Yamamoto H, Sugimoto K, Kume K, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y. Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 2008; 2: 223-31.
- 149 Spinale FG, Eble DM, Mukherjee R, Johnson WS, Walker JD. Left ventricular and myocyte structure and function following chronic ventricular tachycardia in rabbits. *Basic Res Cardiol* 1994; 89: 456–67.
- 150 Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001; 3: 3-10.
- 151 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; 6: 683-9.
- 152 Takeda, K., A. Matsuzawa, H. Nishitoh, K. Tobiume, S. Kishida, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and H. Ichijo, Involvement of ASK1 in Ca<sup>2+</sup>-induced p38 MAP kinase activation. *EMBO Rep.* 2004; 2: 161-6.
- 153 Takekawa, M., Maeda, T., y Saito, H. Protein phosphatase 2 $\alpha$  inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J.* 1998; 17: 4744-4752.
- 154 Tamura, S., Hanada, M., Ohnishi, M., Katsura, K., Sasaki, M., y Kobayashi, T. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem.* 2000; 269: 1060-1066.
- 155 Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D.A., Saurin, A.T., Jiang, J., Heads, R.J., Martin, J.L., Davis, R.J., Flavell, R.A., y Marber, M.S. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res.* 2003; 93, 254-261.
- 156 Tano JY, Lee RH, Vazquez G. Involvement of calmodulin and calmodulin kinase II in tumor necrosis factor alpha-induced survival of bone marrow derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 1: 178-84.
- 157 Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., y Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J.* 2001; 20: 466-479.
- 158 Tesis doctoral "Apoptosis inducida por Angiotensina II: Rol kinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina II" Jorge Omar Velez Rueda.
- 159 Torgerson, R.R. and M.A. McNiven, The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing. *J Cell Sci.* 1998; 19: 2911-22.

- 160 Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A, et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998; 152: 479–84.
- 161 Valverde C, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Salas M, Palomeque J, Vila Petroff M, Mattiazzi A. Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: A property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J. Physiol.* 2005; 562: 801-13.
- 162 Venetucci LA, Trafford AW, Díaz ME, O'Neill SC, Eisner DA. Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca<sup>2+</sup> release and increase Ca<sup>2+</sup> transient amplitude in adult ventricular myocytes. *Circ Res.* 2006; 10: 1299-305.
- 163 Verhagen, A.M. and D.L. Vaux, Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis.* 2002; 2: 163-6.
- 164 Verheij, M., Ruiters, G.A., Zerp, S.F., van Blitterswijk, W.J., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., y Bartelink, H. The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother Oncol.* 1998; 47: 225-232.
- 165 Vila Petroff MG, Palomeque J, Mattiazzi AR. Na (+)-Ca (2+) exchange function contraction frequency inotropy in the cat myocardium. *J Physiol.* 2003; 3: 801-17.
- 166 Vila Petroff, M., M.A. Salas, M. Said, C.A. Valverde, L. Sapia, E. Portiansky, R.J. Hajjar, E.G. Kranias, C. Mundiña-Weilenmann, and A. Mattiazzi, CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2007; 4: 689-98.
- 167 Wagner, S. and L.S. Maier, Modulation of cardiac Na (+) and Ca (2+) currents by CaM and CaMKII. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006; 1: 26-33.
- 168 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; 3: 285-94.
- 169 Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II $\delta$  is required for late I (Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res.* 2011; 5: 555-65.
- 170 Wang Q, Wang X, Hernandez A, Hellmich MR, Gatalica Z, Evers BM. Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2002; 39: 36602-10.
- 171 Wang, X., McGowan, C.H., Zhao, M., He, L., Downey, J.S., Fearn, C., Wang, Y., Huang, S., y Han, J. Involvement of the MKK6-p38 $\gamma$  cascade in gamma radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 4543-4552.
- 172 Watanabe, H., de Caestecker, M.P., y Yamada, Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 14466-14473.
- 173 Waxham, M.N. and J. Aronowski, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is phosphorylated by protein kinase C in vitro. *Biochemistry.* 1993; 11: 2923-30.
- 174 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: 161-75.
- 175 Wenzel S., Taimor G., Piper HM., Schlueter KD., Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF- $\beta$  expression in adult ventricular cardiomyocytes *FASEB Journal.* 2001; 12: 2291-3.

- 176 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: 843-9.
- 177 Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in cardiac myocyte excitation-contraction coupling. *J Clin Invest.* 2006; 116: 675-82.
- 178 Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995; 270: 1326-1331.
- 179 Yamamoto E, Lai ZF, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y, Ito T, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens.* 2006; 10: 2057-69.
- 180 Yee, A.S., Paulson, E.K., McDevitt, M.A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Zamzami, N. and G. Kroemer, The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 1: 67-71.
- 181 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.
- 182 Zarubin, T., and Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005; 15: 11-18.
- 183 Zhang T, Brown JH. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 476-86.
- 184 Zhang T, Guo T, Mishra S, Dalton ND, Kranias EG, Peterson KL, Bers DM, Brown JH. Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKII $\delta$ (C) transgenic mice. *Circ Res.* 2010; 106: 354-362.
- 185 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; 4: 409-17.
- 186 Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Wang A, Smith CD, Xie C, Chen W, Zhang J, Tian X, Jones PP, Zhong X, Guo A, Chen H, Zhang L, Zhu W, Yang D, Li X, Chen J, Gillis AM, Duff HJ, Cheng H, Feldman AM, Song LS, Fill M, Back TG, Chen SR. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Nat Med.* 2011; 8: 1003-9.
- 187 Zhu W, Woo AY, Yang D, Cheng H, Crow MT, Xiao RP. Activation of CaMKII $\delta$ (C) is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2007; 282: 10833-10839.
- 188 Ziegler-Heitbrock, H.W., Blumenstein, M., Kafferlein, E., Kieper, D., Petersmann, I., Endres, S., Flegel, W.A., Northoff, H., Riethmuller, G., and Haas, J.G. In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology.* 1992; 75: 264-268.